



MARCÍLIA SANTOS ROSADO CASTRO

***Enterococcus* spp e *Pseudomonas* spp isolados de ambiente de processamento de produtos lácteos: identificação, formação de biofilmes multi-espécies e controle por agentes sanitizantes**

Campinas - SP

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

MARCÍLIA SANTOS ROSADO CASTRO

***Enterococcus spp e Pseudomonas spp isolados de ambiente de
processamento de produtos lácteos: identificação, formação de
biofilmes multi-espécies e controle por agentes sanitizantes***

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Tecnologia de Alimentos.

Este exemplar corresponde à versão final da tese
defendida pela aluna Marcília Santos Rosado Castro,
e orientada pelo Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye.

Assinatura do Orientador

Campinas - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

C279e Castro, Marcília Santos Rosado
Enterococcus spp. e *Pseudomonas* spp. isolados de ambiente de processamento de produtos lácteos: identificação, formação de biofilmes multi-espécies e controle por agentes sanitizantes / Marcília Santos Rosado Castro. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biofilmes. 2. *Enterococcus*. 3. *Pseudomonas*. 4. Microbiologia Preditiva. 5. Sanitizantes. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas* spp. isolated environment processing of dairy products: identification, formation of multi-species biofilms and control of sanitizers

Palavras-chave em inglês:

Biofilms

Enterococcus

Pseudomonas

Predictive microbiology

Sanitizers

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Arnaldo Yoshiteru Kuaye [Orientador]

Ernani Porto

José Luiz Pereira

Rodrigo Rodrigues Petrus

Walkíria Hanada Viotto

Data da defesa: 11-12-2012

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Orientador – DTA / FEA / UNICAMP

Prof. Dr. Ernani Porto

Membro Titular – LAN / ESALQ / USP

Prof. Dr. José Luiz Pereira

Membro Titular – DCA / FEA / UNICAMP

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus

Membro Titular – FZEA / USP

Prof^a Dra. Walkíria Hanada Viotto

Membro Titular – DTA / FEA / UNICAMP

Dra. Izildinha Moreno

Membro Suplente – TECNOLAT / ITAL

Prof^a Dra. Luciana Maria Ramires Esper

Membro Suplente – Faculdade de Farmácia / UFF

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

Membro Suplente – DTA / FEA / UNICAMP

A Deus e a Nossa Senhora,
aos meus pais José Francisco e Marta,
ao meu marido Wellington,
as minhas irmãs Márcia e Marli,
aos meus sobrinhos Ingrid, Vitor e Manuela,
dedico.

O sonho

Sonhe com aquilo que você quiser.

Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em
seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por
suas vidas.

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a vida, por todo amor e bondade, e a Nossa Senhora pela proteção de mãe e por estar comigo em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis.

Aos meus pais José Francisco e Marta por todo amor, dedicação, por me apoiarem sempre em minhas decisões e pela presença incondicional.

Ao meu marido Wellington, por todo amor, compreensão, incentivo, por sempre caminhar junto comigo. Você torna minha vida muito mais feliz. Te amo!!

As minhas irmãs Márcia e Marli pelo carinho, conselhos, presença e apoio.

Aos meus "pequeninos" Ingrid, Vitor e Manuela por todo carinho e amor. Sinto muita saudade de vocês!!

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela orientação, confiança depositada, ensinamentos e por todo apoio durante todos estes anos de mestrado e doutorado.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Ernani Porto, Dra. Izildinha Moreno, Prof. Dr. José Luiz Pereira, Prof^a Dra. Luciana Maria Ramires Esper, Prof. Dr. Marcelo Cristianini, Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus e Prof^a. Dra. Walkíria Hanada Viotto, pela disponibilidade, valiosas sugestões e correções da tese.

A Dra. Dirce Kabuki, que tão bem me acolheu no laboratório, pela amizade, ensinamentos, todo apoio e colaboração durante todos estes anos.

A Meg e Graciela pela valiosa amizade, por toda disponibilidade e grande contribuição para realização deste trabalho.

As companheiras do laboratório de Higiene e Legislação: Ana Cláudia, Dona Denir, Isa, Luciana, Maria Amélia e Marisa pela ajuda e momentos compartilhados desde o mestrado.

A Cecília por toda amizade, preciosa ajuda e disponibilidade e a sua família que muito admiro e que tão bem nos acolheu em Barretos: Maria José, Nilton, e Ana Cláudia. Muito obrigada!!

A minha amiga Adriana. Sinto-me muito honrada em ser amiga de uma pessoa como você. Obrigada por ser minha amiga em todos os momentos!

A Deise, Hélio, Juliana e Gisele pela amizade e por toda ajuda desde que chegamos a Barretos.

Aos amigos, Edsom, Andréia, Paulo e Bibiana, por todos os momentos de descontração que vivemos juntos em Campinas. Vocês serão nossos amigos sempre!!

Ao Instituto Federal de São Paulo - *Campus* Barretos, pela liberação de 12 horas semanais para autocapacitação, o que possibilitou a conclusão deste trabalho.

Aos amigos da área de Alimentos do IFSP: Claudinéia Soares e Tiago Barretto. Tenho aprendido muito com vocês. Muito obrigada pela amizade e por tornarem nosso ambiente de trabalho tão harmonioso.

A amiga Luciane Paschoal pelo auxílio e correções na redação do resumo em inglês.

Aos colegas de trabalho do IFSP. Muito obrigada pelo incentivo e colaboração.

Aos amigos Chico e Meg, que abriram as portas da sua casa e nos receberam com tanto carinho nas idas a Campinas.

Aos amigos do DTA, por todos os momentos de descontração e ensinamentos compartilhados.

A Renata Celeghini e Diana pela ajuda e bons momentos compartilhados.

Aos todos os funcionários do DTA, Biblioteca e Secretaria de Pós-Graduação pela contribuição na realização deste trabalho.

A Indústria de Laticínios que permitiu a realização das coletas, pelo apoio e colaboração fundamental para realização deste trabalho.

A Fundação André Tosello pela cultura bacteriana concedida.

A Universidade Estadual de Campinas, a Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de estudo concedida.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

RESUMO	xxix
ABSTRACT	xxxix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Micro-organismos psicrotróficos: consequências na qualidade do leite	3
2.1.1 Presença em leite e derivados	3
2.1.2 Produção de Enzimas lipolíticas e proteolíticas	5
2.2 Características do gênero <i>Enterococcus</i>	10
2.2.1 Bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> em produtos lácteos	12
2.3 Características do gênero <i>Pseudomonas</i>	16
2.3.1 Bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> em produtos lácteos	18
2.4 Adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos	21
2.4.1 Fatores que influenciam na adesão e formação de biofilmes bacterianos	26
2.4.2 Formação de biofilmes por bactérias dos gêneros <i>Enterococcus</i> e <i>Pseudomonas</i>	30
2.4.3 Inativação de micro-organismos aderidos em superfícies utilizadas na indústria de alimentos	34
2.4.3.1 Ácido peracético, hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina	36
3 OBJETIVOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Isolamento de bactérias dos gêneros <i>Enterococcus</i> e <i>Pseudomonas</i> em ambiente de indústria de processamento de produtos lácteos	40
4.1.1 Características da indústria	40
4.1.2 Coleta das amostras	40
4.1.2.1 Ar ambiente	41
4.1.2.2 Leite cru	42
4.1.2.3 Leite pasteurizado	42
4.1.2.4 Massa do Queijo	43
4.1.2.5 Queijos	43
4.1.2.6 Soro de queijo	43

4.1.2.7 Amostras de superfícies do ambiente de processamento	44
4.2 Análise das amostras coletadas	48
4.2.1 Contagem de bactérias dos gêneros <i>Enterococcus</i> e <i>Pseudomonas</i>	48
4.2.2 Preparo e plaqueamento das amostras	49
4.2.3 Isolamento, confirmação e identificação de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i>	50
4.2.3.1 Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> pela técnica da PCR	51
4.2.4 Isolamento, confirmação e identificação de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i>	52
4.2.4.1 Identificação das espécies de <i>Pseudomonas</i> pela técnica da PCR	53
4.3 Influência do tempo e temperatura de armazenamento no desenvolvimento de mesófilos aeróbios e bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> e <i>Pseudomonas</i> no leite cru	54
4.4 Avaliação da capacidade proteolítica das bactérias isoladas	55
4.5 Avaliação da capacidade lipolítica das bactérias isoladas	55
4.6 Avaliação da formação de biofilmes	56
4.6.1 Preparo de cupons de aço inoxidável	56
4.6.2 Determinação da formação do biofilme bacteriano	57
4.6.2.1 Determinação do número de células aderidas	61
4.6.2.2 Análise estatística dos resultados	62
4.6.2.3 Verificação experimental do modelo encontrado	62
4.7 Microscopia eletrônica de varredura	63
4.8 Avaliação da eficiência de diferentes sanitizantes em relação ao biofilme formado	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 Avaliação microbiológica do ambiente de processamento de queijo Minas Frescal	67
5.1.1 Bactérias do gênero <i>Enterococcus</i>	67
5.1.1.1 Matéria-Prima	67
5.1.1.2 Ambiente de processamento	68
5.1.1.3 Produto final	72

5.1.2 Bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i>	73
5.1.2.1 Matéria-Prima	73
5.1.2.2 Ambiente de processamento	74
5.1.2.3 Produto final	76
5.1.3 Contagem de mesófilos aeróbios	77
5.1.3.1 Matéria-Prima	77
5.1.3.2 Ambiente de processamento	78
5.1.3.3 Produto final	81
5.2 Influência do tempo e temperatura de armazenamento no desenvolvimento de mesófilos aeróbios e bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> e <i>Pseudomonas</i> no leite cru	82
5.2.1 Bactérias do gênero <i>Enterococcus</i>	82
5.2.2 Bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i>	85
5.2.3 Mesófilos Aeróbios	87
5.3 Caracterização das espécies de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i>	90
5.4 Caracterização das espécies de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i>	93
5.5 Avaliação da capacidade lipolítica e proteolítica de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> e <i>Pseudomonas</i>	96
5.6 Avaliação da formação de biofilme	101
5.6.1 Formação de biofilme por <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> em superfície de aço inoxidável	102
5.6.1.1 Modelagem da adesão e formação de biofilme por <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	105
5.6.2 Formação de biofilme por <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em superfície de aço inoxidável	109
5.6.2.1 Modelagem da adesão e formação de biofilme por <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	111
5.6.3 Formação de biofilme pela interação entre <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i> em superfície de aço inoxidável	115
5.6.3.1 Modelagem da formação de biofilme pela interação entre <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i>	120

5.6.4 Verificação experimental dos modelos encontrados	124
5.7 Microscopia eletrônica de varredura	126
5.8 Avaliação da eficiência de diferentes sanitizantes em relação ao biofilme formado	130
6 CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS	137
APÊNDICES	161

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas da formação de biofilme bacteriano por microscopia eletrônica	24
Figura 2	Estágios de desenvolvimento de biofilme bacteriano segundo Monroe	25
Figura 3	Ordenha do leite tipo A destinado a produção do queijo Minas Frescal	163
Figura 4	Tanques de recepção do leite cru, localizados na sala de recepção	164
Figura 5	Recebimento do leite pasteurizado refrigerado no tanque de processamento de queijo Minas Frescal	164
Figura 6	Verificação do ponto de corte (a) e corte (b) da massa do queijo durante o processamento do queijo Minas Frescal	165
Figura 7	Armazenamento dos queijos Minas Frescal embalados em câmara fria a 5 °C	166
Figura 8	Mesa em aço inoxidável localizada na sala de processamento de queijos	168
Figura 9	Estante em polipropileno localizada na câmara fria de armazenamento do queijo Minas Frescal	168
Figura 10	Seladora à vácuo para acondicionamento dos queijos Minas Frescal em embalagens de polietileno, localizada na sala de processamento de queijo	169
Figura 11	Equipamento utilizado na ordenha mecânica para obtenção do leite destinado ao processamento de queijo Minas Frescal	169
Figura 12	Maçanetas localizadas na câmara fria (a) e sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C (b))	170
Figura 13	Mangueira conectada ao equipamento de bombeamento de leite, localizada na sala de processamento de queijos	170

- Figura 14 Pisos localizados nas salas de recepção (a), pasteurização (b), 171
queijos (c), armazenamento dos utensílios para produção do
queijo (refrigerada a 9 °C) (d), câmara fria (e) e sala de
ordenha (f)
- Figura 15 Paredes localizadas nas salas de recepção (a), pasteurização 172
(b), queijos (c), armazenamento dos utensílios para produção do
queijo (refrigerada a 9 °C) (d), câmara fria (e) e sala de
ordenha (f)
- Figura 16 Ralos localizados nas salas de processamento de queijos (a) e 173
armazenamento dos utensílios para produção do queijo
(refrigerada a 9 °C)(b)
- Figura 17 Rodo localizado nas sala de armazenamento dos utensílios para 173
produção do queijo (refrigerada a 9 °C)
- Figura 18 Tanque de processamento do queijo Minas Frescal (a), 174
localizado na sala de processamento de queijos, com destaque
para o dreno de saída do soro (b)
- Figura 19 Tanques de recepção do leite cru, localizados na sala de 175
recepção do leite cru. Tanque 1 (a) e Tanque 2 (b)
- Figura 20 Fôrmas em polietileno, com capacidade para 0,5kg, utilizadas no 176
processamento de queijo Minas Frescal
- Figura 21 Lira em aço inoxidável utilizada no processamento de queijo 176
Minas Frescal
- Figura 22 Mexedor em aço inoxidável utilizado no processamento de 177
queijo Minas Frescal
- Figura 23 Termômetro digital utilizado no processamento de queijo Minas 177
Frescal
- Figura 24 Frasco contendo os cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, 57
suspensos por fios de poliamida.

Figura 25	Contagem de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> (logUFC.mL ⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura	83
Figura 26	Contagem de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> (logUFC.mL ⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura	86
Figura 27	Contagem de Mesófilos Aeróbios (logUFC.mL ⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura	89
Figura 28	Superfícies resposta e curvas de contorno em função do tempo de contato e temperatura de exposição para formação de biofilme em aço inoxidável. a) <i>Enterococcus faecium</i> e b) <i>Enterococcus faecalis</i>	108
Figura 29	Superfícies resposta e curvas de contorno em função do tempo de contato e temperatura de exposição para formação de biofilme em aço inoxidável. a) <i>Pseudomonas fluorescens</i> e b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	114
Figura 30	Superfícies resposta e curvas de contorno em função do tempo de contato e temperatura de exposição para formação de biofilme em aço inoxidável. a) <i>E.faecium</i> e <i>E.faecalis</i> , b) <i>P.fluorescens</i> e <i>P.aeruginosa</i> e c) Contagem total	123
Figura 31	Fotomicrografia de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, não submetido ao processo de adesão, observada por microscopia eletrônica de varredura nos aumentos de: a) 600 x, b) 800 x	126
Figura 32	Fotomicrografias de aço inoxidável AISI 304 observadas por MEV, submetidas ao processo de adesão por isolados de <i>Enterococcus faecium</i> após 48 horas. a) aumento de 600x (a 27 °C), b) aumento de 1500x (a 27 °C), c) aumento de 6 00x (a 37 °C), d) aumento de 1500x (a 37 °C)	127

- Figura 33 Fotomicrografias de aço inoxidável AISI 304 observadas por 128
MEV, submetidas ao processo de adesão por isolados de
Enterococcus faecalis após 48 horas. a) aumento de 1000x (a 27
°C), b) aumento de 3000x (a 37 °C)
- Figura 34 Fotomicrografias de aço inoxidável AISI 304 observadas por 128
MEV, submetidas ao processo de adesão por isolados de
Pseudomonas fluorescens após 48 horas. a) aumento de 600x
(a 27 °C), b) aumento de 1500x (a 37 °C)
- Figura 35 Fotomicrografias de aço inoxidável AISI 304 observadas por 129
MEV, submetidas ao processo de adesão por isolados de
Pseudomonas aeruginosa após 48 horas. a) aumento de 600x (a
27 °C), b) aumento de 1500x (a 37 °C)
- Figura 36 Fotomicrografias de aço inoxidável AISI 304 observadas por 129
MEV, submetidas ao processo de adesão pela interação entre
Enterococcus faecium, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas
fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* após 48 horas. a)
aumento de 600x (a 27 °C), b) aumento de 1500x (a 37 °C)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos do crescimento de micro-organismos psicrotróficos antes do tratamento térmico no leite cru, na qualidade de produtos lácteos	7
Tabela 2	Descrição dos <i>primers</i> utilizados para identificação das espécies <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>	52
Tabela 3	Descrição dos <i>primers</i> utilizados para identificação das espécies <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i>	54
Tabela 4	Delineamento composto central rotacional para relação entre as variáveis temperatura de exposição e tempo de contato	58
Tabela 5	Origem das cepas das bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> e <i>Pseudomonas</i> utilizadas na avaliação da formação de biofilme bacteriano	60
Tabela 6	Experimentos para validação dos modelos propostos na avaliação da formação de biofilmes por <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> e pela junção destas espécies	63
Tabela 7	Contagem de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> na matéria-prima destinada à produção de queijo Minas Frescal	67
Tabela 8	Contagem de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal	70
Tabela 9	Contagem de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> na massa, soro e no queijo Minas Frescal	72
Tabela 10	Contagem de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> na matéria-prima destinada à produção de queijo Minas Frescal	73
Tabela 11	Contagem de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal	75
Tabela 12	Contagem de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> na massa, soro e no queijo Minas Frescal	77
Tabela 13	Contagem de mesófilos aeróbios na matéria-prima destinada à produção de queijo Minas Frescal	78

Tabela 14	Contagem de mesófilos aeróbios no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal	79
Tabela 15	Contagem de mesófilos aeróbios na massa, soro e no queijo Minas Frescal	81
Tabela 16	Contagem de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> (logUFC.mL ⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura	82
Tabela 17	Contagem de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> (logUFC.mL ⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura	85
Tabela 18	Contagem de Mesófilos Aeróbios (logUFC.mL ⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura	88
Tabela 19	Número de isolados identificados de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos	91
Tabela 20	Número de isolados identificados de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos	94
Tabela 21	Comparação entre o número de isolados que apresentaram resultados positivos para atividade proteolítica e número total de isolados identificados de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> , presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos	96
Tabela 22	Comparação entre o número de isolados que apresentaram resultados positivos para atividade lipolítica e número total de isolados identificados de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> , presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos	97

Tabela 23	Comparação entre o número de isolados que apresentaram resultados positivos para atividade proteolítica e número total de isolados identificados de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> , presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos	99
Tabela 24	Comparação entre o número de isolados que apresentaram resultados positivos para atividade lipolítica e número total de isolados identificados de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> , presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos	100
Tabela 25	Contagem de <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> no leite UH após dois dias de incubação	102
Tabela 26	Formação de biofilme por <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> em superfície de aço inoxidável, em função do tempo de contato e temperatura de incubação	103
Tabela 27	Coeficientes de regressão para a formação de biofilme por <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> , avaliada em $\log\text{UFC.cm}^{-2}$	105
Tabela 28	Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por <i>Enterococcus faecium</i> em aço inoxidável	106
Tabela 29	Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por <i>Enterococcus faecalis</i> em aço inoxidável	106
Tabela 30	Contagem de <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no leite UHT após dois dias de incubação	109
Tabela 31	Formação de biofilme por <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em superfície de aço inoxidável, em função do tempo de contato e temperatura de incubação	110
Tabela 32	Coeficientes de regressão para a formação de biofilme por <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , avaliada em $\log\text{UFC.cm}^{-2}$	112

Tabela 33	Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por <i>Pseudomonas fluorescens</i> em aço inoxidável	112
Tabela 34	Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em aço inoxidável	113
Tabela 35	Contagem da interação entre <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i> no leite UHT após dois dias de incubação	116
Tabela 36	Formação de biofilme pela interação entre <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i> em superfície de aço inoxidável, em função do tempo de contato e temperatura de incubação	117
Tabela 37	Coeficientes de regressão para a formação de biofilme pela interação entre <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i> , avaliada em logUFC.cm ⁻²	120
Tabela 38	Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> em aço inoxidável	121
Tabela 39	Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em aço inoxidável	121
Tabela 40	Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme por <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i> em aço inoxidável	121
Tabela 41	Comparação entre os resultados experimentais e previstos pelos modelos, de acordo com os experimentos 1, 2, 3, 4 e 5, para formação de biofilme em aço inoxidável a 25 °C por 3 dias de armazenamento	125
Tabela 42	Redução da população nos biofilmes formados por <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> e pela junção das espécies, após 10 minutos de contato com os sanitizantes ácido peracético, hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina	131

Tabela 43	Resultados dos testes bioquímicos e da técnica da PCR para confirmação e identificação das bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> isoladas de matéria-prima, produtos e ambiente de processamento de produtos lácteos	178
Tabela 44	Resultados dos testes bioquímicos e da técnica da PCR para confirmação e identificação das bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> isoladas de matéria-prima, produtos e ambiente de processamento de produtos lácteos	192
Tabela 45	Resultados referentes à avaliação da capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas pelas bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> isoladas de matéria-prima, produtos e ambiente de processamento de produtos lácteos	206
Tabela 46	Resultados referentes à avaliação da capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas pelas bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> isoladas de matéria-prima, produtos e ambiente de processamento de produtos lácteos	216

RESUMO

Na elaboração de produtos lácteos, a qualidade do leite cru é um fator de grande importância. Alguns micro-organismos psicrótrópicos produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas, além de apresentar capacidade formar biofilmes em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados no processamento. Dentre estes micro-organismos, estão bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas*. Neste trabalho, os objetivos principais foram avaliar a presença de bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* produtoras de enzimas proteolíticas e lipolíticas, em ambientes de processamento de produtos lácteos, a possível formação de biofilmes mono e multi-espécies em superfície de aço inoxidável AISI 304 e seu controle por agentes sanitizantes. As coletas de amostras foram realizadas durante as etapas de processamento de queijo Minas Frescal. Bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas* e mesófilos aeróbios foram detectadas em amostras de matéria-prima, superfícies de contato e produto final. Também foram coletadas amostras de leite cru de duas outras indústrias, denominadas leite cru 3 e leite cru 4. O armazenamento das amostras de leite cru a 4, 7 e 10 °C por 2, 4 e 8 dias, permitiu observar a influência do tempo e temperatura no desenvolvimento bacteriano. O aumento do tempo e temperatura promoveu a elevação das contagens de mesófilos aeróbios, *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp.. Foram obtidos 315 isolados do gênero *Enterococcus* e 310 do gênero *Pseudomonas*. Dentre os isolados identificados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), o gênero *Enterococcus* apresentou 35,05% de *E.faecium* e 64,95% de *E.faecalis*, e o gênero *Pseudomonas*, 23,87% de *P.aeruginosa* e 76,18% de *P.fluorescens*. A partir da análise da atividade proteolítica das bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas*, foram observados resultados positivos em 49,52 e 71,29%, respectivamente. Para atividade lipolítica, estes percentuais foram de 38,73 e 98,38%, respectivamente. A avaliação da formação de biofilmes mono e multi-espécies foi realizada em cupons de aço inoxidável AISI 304, com rugosidade média de 0,366µm, nos tempos 0; 1,2; 4; 6,8 e 8 dias e nas temperaturas 7; 13; 27; 41 e 47°C, segundo

delineamento composto central rotacional. Foram realizados cinco delineamentos, para avaliação da formação de biofilme por *E.faecium*, *E.faecalis*, *P.fluorescens*, *P.aeruginosa* e pela junção das espécies. O inóculo inicial utilizado foi aproximadamente $1 \times 10^2 \text{ UFC.cm}^{-2}$. A análise de variância mostrou ajuste significativo para todos os delineamentos, permitindo a construção de modelos capazes de prever a adesão em função do tempo e temperatura. Faixas de combinações de tempo e temperatura que permitiram a formação dos biofilmes foram determinadas. Bactérias do gênero *Enterococcus* inibiram o desenvolvimento das bactérias do gênero *Pseudomonas*. A microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualização das topografias, bactérias aderidas e produção de exopolissacarídeos. A ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} de Cloro Residual Total (CRT), ácido peracético a 300 mg.L^{-1} e digluconato de clorexidina a 400 mg.L^{-1} , em relação aos biofilmes formados foi avaliada. O ácido peracético foi o sanitizante mais eficiente, no entanto na maior parte dos ensaios, os micro-organismos não foram totalmente eliminados, evidenciando a dificuldade de sanitização das superfícies após a formação do biofilme.

ABSTRACT

In the preparation of dairy products, the quality of raw milk is a factor of great importance. Some psychrotrophic produce lipolytic and proteolytic enzymes, and present the capacity to form biofilms on surfaces of equipment and utensils used in processing. Among these microorganisms are bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Enterococcus*. In this study, the main objectives were to evaluate the presence of bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Enterococcus* which produce lipolytic and proteolytic enzymes in environments where dairy products are produced, the possible formation of biofilms mono and multi-species on the surface of stainless steel AISI 304 and its control by sanitizers. The sample collection were collected in processing of Minas cheese. Bacteria of the genera *Enterococcus* and *Pseudomonas*, and mesophilic aerobic were detected in samples of raw materials, contact surfaces and the final product. Samples of raw milk from two other industries, denominated raw milk 3 and raw milk 4 were also collected. The storage of raw milk samples at 4, 7 and 10°C for 2, 4 and 8 days allowed to observe the influence of time and temperature on bacterial growth. The increasing time and temperature promoted an increase in counts of aerobic mesophiles, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas* spp. in all collected samples. We obtained 315 isolates of the genus *Enterococcus* and 310 of the genus *Pseudomonas*. Among the isolates identified by PCR, the genus *Enterococcus* indicated 35.05% of *E.faecium* and 64.95% of *E.faecalis*, and *Pseudomonas* indicated 23.87% of *P.aeruginosa* and 76.18% of *P.fluorescens*. From the analysis of the proteolytic activity of bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Enterococcus* positive results were observed in 49.52 and 71.29%, respectively. To lipolytic activity these percentages were 38.73 and 98.38%, respectively. The evaluation of the mono and multi-species biofilm formation was developed in coupons of stainless steel AISI 304, with roughness average of 0.366µm, in times of 0, 1.2, 4, 6.8 and 8 days and in temperatures of 7 , 13, 27, 41 and 47°C, according to a central composite design. Five designs were developed for evaluation of biofilm formation by *E.faecium*, *E.faecalis*, *P.fluorescens*, *P.aeruginosa* and by junction of

all species. The initial inoculum used was approximately 1×10^2 CFU.cm⁻². The analysis of variance indicated the significant adjustment for all designs, allowing the construction of models capable of predicting the adhesion according to of time and temperature. The optimum intervals of time and temperature for the formation of biofilms were determined for each design. Bacteria of the genus *Enterococcus* inhibited the growth of bacteria of the genus *Pseudomonas*. The scanning electron microscopy allowed the visualization of topographies, the adhered bacteria and the production of exopolysaccharides. The action of sodium hypochlorite 100mg.L⁻¹ of Total Residual Chlorine (TRC), peracetic acid 300mg.L⁻¹ and chlorhexidine gluconate 400mg.L⁻¹ in relation to formed biofilms was evaluated. Peracetic acid was the most effective sanitizing, however in most tests, the microorganisms were not completely eliminated, which demonstrates the difficulty of sanitization of surfaces after formation of the biofilm.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do leite cru é um fator de grande importância para o produto final. A estocagem sob refrigeração, desde sua obtenção, reduz as perdas econômicas, principalmente devido à acidificação por bactérias mesofílicas. No entanto, permite a seleção de bactérias psicotróficas relacionadas a problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios.

As bactérias psicotróficas apresentam capacidade de se desenvolver mesmo em temperaturas de refrigeração, e muitas estirpes produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes que alteram tanto o leite quanto seus derivados.

As enzimas produzidas durante a multiplicação destes micro-organismos, podem gerar problemas de qualidade como alteração de sabor e odor, redução da vida de prateleira dos produtos, redução do rendimento industrial na fabricação de queijos e gelificação de leite longa vida.

Estas bactérias podem contaminar os produtos lácteos de diversas formas, tanto pelo contato com fezes de animais, água contaminada, ar ambiente, pêlo de animal ou equipamentos de ordenha, processamento e armazenamento.

Apresentam capacidade de aderir e formar biofilmes em superfícies utilizadas desde a obtenção da matéria-prima até o produto final. Os mecanismos de adesão e formação de biofilmes bacterianos têm sido muito estudados nos últimos anos, na tentativa de compreender e controlar os processos, pois além de aumentar a resistência à ação de sanitizantes, podem constituir um constante foco de contaminação dos alimentos.

Bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* estão dentre os micro-organismos psicotróficos capazes de aderir com possível formação de biofilme em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados no processamento de alimentos.

A utilização de modelos matemáticos preditivos é uma importante ferramenta para avaliação e controle da formação de biofilmes bacterianos na

indústria de alimentos, pois podem auxiliar na definição dos fatores que interferem neste processo, evidenciando sua influência.

Este trabalho combina a avaliação da adesão e formação de biofilme por *Enterococcus* sp. e *Pseudomonas* sp., produtoras de enzimas lipolíticas e proteolíticas, com a utilização de modelos matemáticos preditivos para avaliar a influência de variáveis como tempo de contato e temperatura de exposição, além de avaliar a eficiência da ação de sanitizantes normalmente utilizados na indústria de alimentos, frente ao biofilme formado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micro-organismos psicrotróficos: consequências na qualidade do leite

O leite é considerado um alimento muito rico por conter praticamente todos os nutrientes necessários os seres humanos. Em consequência, propicia também o crescimento de inúmeros micro-organismos que encontram neste uma fonte de nutrientes necessários ao seu desenvolvimento (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

De acordo com a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o leite deve ser refrigerado até 3 horas após a ordenha, sendo a temperatura de no máximo 4 °C quando em tanque por expansão direta, ou no máximo 7 °C quando em tanque por imersão. Esta Instrução Normativa determina ainda, que o tempo entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento que irá beneficiá-lo deve ser de no máximo 48 horas, sendo até 24 horas o mais recomendado (BRASIL, 2011).

No entanto, as bactérias psicrotróficas são capazes de se desenvolver mesmo sob temperaturas de refrigeração, abaixo de 7 °C, embora sua temperatura ótima de crescimento seja aquela que caracteriza os mesófilos, próxima a ambiente (entre 20 e 25 °C) (FRANK; YOUSEF, 2004).

Estes micro-organismos são considerados ubiqüitários e o solo, a poeira, o ar, a água, a vegetação e as fezes são suas fontes principais (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Assim produtos lácteos podem ser contaminados principalmente por micro-organismos psicrotróficos a partir do suprimento de água de qualidade inadequada, falhas nos procedimentos de higienização e por mastite (JAY, 2005).

2.1.1 Presença em leite e derivados

Embora os micro-organismos psicrotróficos representem menos que 10% da microbiota total do leite fresco obtido em condições higiênico-sanitárias satisfatórias, podem chegar a 75% sob condições inadequadas (NIELSEN, 2002).

De acordo com Sørhaug e Stepaniak (1997), pode-se considerar a multiplicação destes micro-organismos como um dos principais fatores que influenciam a qualidade da matéria-prima mantida a 7 °C ou menos, por períodos prolongados.

Vários gêneros de bactérias psicrotróficas são relatados como presente em leite e derivados, dentre eles destacam-se *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter* (COUSIN, 1982), *Bacillus*, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* (COLLINS, 1981) e *Enterococcus* (GELSOMINO et al., 2001; DOMIG; MAYER. KNEIFEL, 2003; FRANZ, et al., 2003).

Diversos fatores influenciam no aumento da contagem de psicrotróficos no leite. Temperatura de armazenamento e o tempo de estocagem constituem, para muitos autores, os principais fatores (PINTO; MARTINS, VANETTI, 2006; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; ARCURI et al., 2008; SANVIDO, 2009).

Segundo Cousin (1982), outro importante fator é a variação sazonal, pois ocorre um decréscimo na contagem destes micro-organismos no leite produzido no verão, quando comparado ao inverno.

Vidal–Martins et. al. (2005), encontraram diferentes contagens de bactérias psicrotróficas no leite cru coletado em uma mesma indústria no Estado de São Paulo, nos meses de janeiro e abril de 2003. As contagens médias foram de $2,0 \times 10^9$ e $4,4 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ nos meses de janeiro e abril, respectivamente. Os autores relacionaram esta diferença à influência das estações do ano, já que foi verificado o decréscimo das contagens do verão para o outono, e às práticas de produção e manuseio na propriedade rural.

A contagem inicial destes micro-organismos no leite cru é de grande importância na qualidade final de todos os produtos lácteos, pois, mesmo sob refrigeração, podem produzir grandes quantidades de enzimas lipolíticas e proteolíticas, que rapidamente alteram os produtos (CRAVEN; MACAULEY, 1992).

Nos últimos anos vários estudos foram realizados para determinação da contagem de micro-organismos psicrotróficos no leite cru. Alguns destes estudos

relacionaram a contagem de bactérias psicrotróficas com o tempo e temperatura de armazenamento da matéria-prima.

Pinto, Martins e Vanetti (2006) avaliaram a qualidade do leite cru na região da Zona da Mata Mineira. A contagem média de bactérias psicrotróficas no leite cru refrigerado nesta região variou entre $2,0 \times 10^2$ e $1,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ nas amostras coletadas em tanques individuais, $8,9 \times 10^2$ e $3,2 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ nos tanques coletivos e entre $5,6 \times 10^5$ e $6,4 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ nos silos industriais.

Sanvido (2009) observou contagens de micro-organismos psicrotróficos no leite cru, armazenado a 5 °C, de $2,6 \times 10^3$, $7,7 \times 10^6$ e $6,9 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, a 0, 4 e 7 dias de armazenamento, respectivamente.

Em outro estudo realizado por Ramos (2009) para avaliação do efeito da refrigeração sobre o leite de ovelha, a contagem de psicrotróficos no leite cru aumentou de 5,14 log UFC.mL⁻¹ logo após a ordenha, para 6,25 log UFC.mL⁻¹ após 3 dias a 4 °C e 7,38 log UFC.mL⁻¹ após 3 dias a 8 °C.

Em pesquisa realizada no agreste de Pernambuco, Silva et al. (2011), verificaram uma contagem média de bactérias psicrotróficas no leite resfriado imediatamente após a ordenha, de $3,4 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, e de $7,3 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ no leite após 24 horas de refrigeração.

Franciosi et. al. (2011), avaliaram a contagem de psicrotróficos no leite cru destinado a produção do queijo Grana Trentino, na Itália, e observaram contagem média destes micro-organismos de aproximadamente $7,9 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹.

2.1.2 Produção de Enzimas lipolíticas e proteolíticas

De acordo com Cousin (1982), micro-organismos psicrotróficos são capazes de exercer atividades bioquímicas mesmo quando submetidos a temperaturas próximas a 0 °C

Segundo FOX (1989), as bactérias psicrotróficas produzem enzimas proteolíticas quando sua contagem excede 10^6 UFC.mL⁻¹. Pinto, Martins e Vanetti (2006) afirmam que a fabricação de produtos a partir do leite cru contendo contagens de psicrotróficos superiores a esta, é considerada imprudente.

Adams, Barach e Speck (1975), afirmaram que esta contagem pode ser ainda menor. Os autores citam que bactérias psicotróficas podem produzir as enzimas que causam alteração da matéria-prima quando presentes a partir da contagem de 1×10^4 UFC.mL⁻¹.

No entanto, de acordo com Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009), não existe uma correlação direta entre as contagens de psicotróficos e a atividade proteolítica, já que possivelmente a composição da microflora de bactérias psicotróficas presentes no leite cru influencia no desenvolvimento da proteólise. Os autores afirmam que apenas algumas espécies de micro-organismos psicotróficos são as responsáveis pela produção das enzimas termorresistentes.

Embora estas bactérias não sobrevivam à pasteurização, a maioria das enzimas produzidas são termorresistentes, resistindo até mesmo ao tratamento de Ultra Alta Temperatura (UHT) no leite (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As enzimas, produzidas durante a multiplicação destes micro-organismos, promovem a degradação de gorduras e proteínas do leite, geram problemas de qualidade, alteração de sabor e odor, redução da vida de prateleira dos produtos, redução do rendimento industrial na fabricação de queijos e gelificação de leite longa vida (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

O efeito adverso sobre a qualidade do leite e produtos lácteos oriundos do crescimento de micro-organismos psicotróficos no leite cru é apresentado na Tabela 1, adaptada de Sørhaug e Stepaniak (1997).

Tabela 1. Efeitos do crescimento de micro-organismos psicrotróficos antes do tratamento térmico no leite cru, na qualidade de produtos lácteos

Produto	Psicrotróficos no leite cru (log UFC.mL ⁻¹)	Efeitos na qualidade
Leite UHT	5,9	Gelificação após 20 semanas
	6,9 – 7,2	Gelificação após 2 a 10 semanas, odor estranho, sabor amargo
Leite em pó	6,3 – 7,0	Redução da estabilidade ao calor, aumento da formação de espumas em leite reconstituído
Leite pasteurizado	5,5	Sabor inferior, quando comparado ao leite pasteurizado fresco
	7 - 8	Menor vida de prateleira Depósito no trocador de placas
Queijo massa dura	6,5 – 7,5	Rancidez
	7,5 – 8,3	Sabor diferente, predomínio de gosto de ranço e sabão Menor rendimento
Queijo Cottage	5,0 – 7,8	Gosto amargo
Manteiga	Não determinado	Rápido desenvolvimento de rancidez
logurte	7,6 – 7,8	Gosto amargo, sabor adocicado, dependendo da microflora específica

Fonte: Adaptado de SØRHAUG; STEPANIAK (1997)

Estas enzimas proteolíticas ou lipolíticas podem estar naturalmente presentes no leite ou serem produzidas por micro-organismos contaminantes (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Quando proteases extracelulares produzidas pelos micro-organismos psicrotróficos são liberadas no leite, ocorre o aumento da atividade proteolítica resultando na degradação de proteínas, com produção de pequenos peptídios, e consequente surgimento de sabores amargos. A caseína é o principal substrato que sofre proteólise no leite, devido a sua alta concentração e susceptibilidade, enquanto as proteínas do soro são mais resistentes (VERDI et. al., 1987).

Enzimas lipolíticas possuem capacidade de hidrolisar os triglicerídeos, que constituem a gordura do leite, em ácidos graxos de cadeia curta, incluindo os ácidos butírico, capróico, caprílico e cáprico, principais responsáveis pelos odores desagradáveis e rancificação do leite e derivados (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003). A lipase natural presente no leite é uma enzima termossensível, e, portanto é inativada pela pasteurização. No entanto, as lipases bacterianas são termicamente resistentes, podendo causar alterações na gordura do leite mesmo após o processamento térmico (FOX, 1989).

Em pesquisa realizada na Índia, os autores Kumaresan, Annalvilli e Sivakumar (2007) demonstraram a influência do tempo e temperatura de estocagem na produção de enzimas por bactérias psicotróficas. A partir da quantificação da atividade proteolítica e lipolítica em 52 amostras de leite cru, foi observado aumento da proteólise e lipólise durante o armazenamento a 0, 3, 5, 7 e 14 dias para as amostras armazenadas a 4 e 7 °C. Durante o armazenamento a 2 °C o aumento da proteólise e lipólise foram considerados significativos apenas após 5 dias de armazenamento.

Aylward, O'Leary e Langlois (1980), verificaram que o rendimento de queijo Cottage diminuiu de 2,5 a 3,0% por dia de estocagem do leite cru a 5 °C, após a contagem de bactérias psicotróficas atingirem 10^6 UFC.mL⁻¹.

Banks et al. (1988), observaram diminuição do rendimento de queijo Cheddar, somente quando a contagem de bactérias psicotróficas no leite cru armazenado por 4 dias a 6 °C foi superior a 1×10^7 UFC.mL⁻¹.

Em outra pesquisa realizada por Cardoso (2006), o crescimento de bactérias psicotróficas no leite cru armazenado a 10 °C promoveu o aumento do nitrogênio total perdido no soro e a redução do rendimento (L/Kg) de queijo Minas Frescal em 6,78%.

Alterações também são relatadas em leite UHT, pois a qualidade e vida de prateleira deste produto estão diretamente relacionadas à qualidade do leite cru utilizado para sua fabricação. Enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por micro-organismos psicotróficos alteram o leite UHT, causando defeitos sensoriais como o gosto amargo, produzido pela liberação de peptídeos hidrofóbicos, e sabor

de ranço, devido ao aumento dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (DATTA; DEETH, 2001).

Devido ao fato de sua estocagem ser realizada a temperatura ambiente por longos períodos de tempo, pode ocorrer o aparecimento do fenômeno de gelificação, por ação das proteases sobre as proteínas do leite, principalmente a caseína, e modificações nas propriedades sensoriais, principalmente no sabor (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Neste caso a proteólise está associada à ação da plasmina e enzimas termorresistentes produzidas por micro-organismos psicrotróficos contaminantes. A plasmina, protease alcalina natural do leite, é altamente termoestável. Geralmente a plasmina é a responsável pela gelificação de um leite obtido a partir de uma matéria-prima de boa qualidade, e as proteases produzidas por micro-organismos pela gelificação de um leite obtido a partir de uma matéria-prima de qualidade insatisfatória, sendo esta última a mais comum (DATTA; DEETH, 2001).

Em estudo realizado por Vidal-Martins et al. (2005), com o objetivo de acompanhar a vida de prateleira de leite UHT, os autores avaliaram possíveis alterações na viscosidade e evolução do índice proteolítico durante 120 dias de armazenamento. A contagem média de psicrotróficos no leite cru variou de $4,0 \times 10^6$ a $3,8 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹. Os autores observaram aumento do índice proteolítico e da viscosidade aparente no decorrer do armazenamento, relacionado à produção de proteases pelas bactérias psicrotróficas presentes no leite cru. As alterações foram mais evidentes para as amostras com maior contagem inicial de psicrotróficos.

Topçu, Numanoğlu e Saldamlı (2006) avaliaram o efeito da qualidade do leite cru em relação à proteólise do leite UHT armazenado a 25 °C por 180 dias. O leite UHT produzido a partir de leite cru considerado de baixa qualidade, com contagem padrão em placas de $2,2 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹, de psicrotróficos de $4,8 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹, apresentou elevados níveis de proteólise, o que resultou na redução da vida de prateleira do produto.

Em outro estudo, Friedrich et al. (2010) verificaram a presença e concentração de casinomacropeptídeo (CMP) no leite UHT. A presença de CMP

pode indicar fraude por adição de soro de queijo no leite, ou deterioração causada por ação de enzimas produzidas por psicrotróficos. Os autores verificaram que no dia em que foi processado a concentração de CMP no leite UHT foi de 15,15 mg L⁻¹, no sexto dia esse valor já havia aumentado para 45,06 mg L⁻¹, chegando a 182,06 mg L⁻¹ após 49 dias de armazenamento. O aumento da concentração de CMP no leite UHT foi atribuído pelos autores a possível presença de enzimas produzidas por micro-organismos psicrotróficos no leite cru.

Problemas envolvendo leite em pó também foram relatados na literatura. Celestino, Iyer e Roginski (1997) avaliaram os efeitos do armazenamento refrigerado do leite cru na qualidade de leite em pó integral. Os autores verificaram que o armazenamento do leite cru a 4 °C por 48 horas resultou em aumento da concentração de ácidos graxos livres quando comparado ao produzido com leite cru fresco. Observaram ainda um aumento de aproximadamente nove vezes da atividade lipolítica no produto.

Segundo Perko (2011), as indústrias e produtores de leite se deparam hoje com um grande dilema a ser resolvido. Embora a coleta diária do leite refrigerado nas propriedades rurais seja totalmente inviável do ponto de vista econômico, os efeitos do armazenamento prolongado também podem resultar em grandes prejuízos e baixa qualidade do produto final, o que evidencia a necessidade de novos estudos no sentido de minimizar tais problemas.

2.2 Características do gênero *Enterococcus*

Bactérias do gênero *Enterococcus* eram classificadas como *Streptococcus* do grupo sorológico D de Lancefield, por possuírem o antígeno relacionado aos isolados provenientes do trato gastrointestinal. Mas estudos moleculares, baseados na hibridização e sequenciamento do RNAr 16S, levaram a divisão deste grupo, na década de 1980, em *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus* (HARTMAN; DEIBEL; SIEVERDING, 2001; GIRAFFA, 2002).

Enterococcus são micro-organismos ubiqüitários, presentes no solo, plantas, em diversos alimentos. Fazem parte da microbiota do trato intestinal de

vertebrados e são capazes de sobreviver mesmo sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade (GIRAFFA, 2003).

São descritos como bactérias produtoras de L-ácido láctico, homofermentativos, cocos, Gram positivos, catalase negativa, anaeróbicos facultativos, e se diferem dos demais cocos homofermentadores por apresentarem crescimento a 10 e 45 °C, a pH 9,6, em presença de até 6,5% de NaCl e 40% de sais biliares (GELSOMINO et al., 2001; DOMIG; MAYER. KNEIFEL, 2003; FRANZ, et al., 2003).

Apresentam temperatura ótima de crescimento a 35 °C, embora sejam capazes de crescer em ampla faixa de temperatura, que vai de 10 a 45 °C. Podem sobreviver durante 30 minutos a 60 °C, suportar grandes variações no pH e a maioria das espécies é relativamente resistente ao congelamento (LECLERC; DEVRIESE; MOSSEL, 1996; FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999).

Compreendem mais de 20 espécies, sendo que *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* estão presentes em maior número, especialmente em alimentos (GIRAFFA, 2003) e amostras de origem clínica (BRADLEY; FRAISE, 1996).

Estas são espécies comensais do trato gastrointestinal, sendo encontradas em contagens que variam entre 10^4 e 10^8 UFC.g⁻¹ de material digestivo (BRADLEY; FRAISE, 1996).

Segundo Leclerc, Devriese e Mossel (1996), dentre as espécies de *Enterococcus*, *E. faecalis* é considerada a mais comum em fezes humanas, sendo encontrada em concentrações de até $10^5 - 10^7$ UFC.g⁻¹ de fezes. Os autores afirmam ainda que no trato intestinal de gado leiteiro a espécie mais comum é *E. faecium*.

Além de estarem associadas à deterioração de alguns alimentos, como carnes e derivados, estas bactérias podem causar diversas doenças em humanos. Por serem patógenos oportunistas, normalmente as doenças por *Enterococcus* estão relacionadas a pessoas com sistema imunológico debilitado (FRANZ et al., 2003).

São constantemente relatados como causadores de infecções hospitalares como bacteremia, endocardites e infecções de trato urinário, sendo os pacientes imuno-comprometidos ou em tratamento intensivo os principais afetados. O maior interesse está voltado aos *Enterococcus* vancomicina-resistente (VRE), já que este é um antibiótico amplamente ministrado em casos de infecções múltiplas (MORANDI et al., 2006).

2.2.1 Bactérias do gênero *Enterococcus* em produtos lácteos

Frequentemente presentes em leite e derivados, as bactérias do gênero *Enterococcus* podem contaminá-lo por diversas maneiras, como por contato direto com fezes de animais, ou indireto através de água contaminada, ar ambiente, pêlo de animal ou equipamentos de ordenha e armazenamento (GELSOMINO et al., 2001).

Ocorrem naturalmente como “*Non Starter Lactic Acid Bactéria*” em grande variedade de queijos produzidos a partir de leite cru ou pasteurizado, devido ao fato de ser um micro-organismo termodúrico capaz de resistir à pasteurização, refrigeração e ao processo de maturação (GIRAFFA, 2003).

Assim sua presença em produtos lácteos pasteurizados normalmente ocorre devido à resistência térmica ou a recontaminação após o tratamento térmico, o que pode resultar em problemas de deterioração no produto (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997).

Perri (2010) observou contagens de bactérias do gênero *Enterococcus* que variaram entre 2,50 e 6,39 logUFC.mL⁻¹ no leite cru, de 0,78 e 0,95 log UFC.mL⁻¹ no leite imediatamente após a pasteurização e de 1,69 e 4,41 logUFC.mL⁻¹ no leite pasteurizado após 24 horas de armazenamento refrigerado a 5 °C. Neste estudo, embora a pasteurização tenha diminuído a contaminação do leite por este micro-organismo, o mesmo não foi eliminado e se desenvolveu mesmo armazenado sob refrigeração.

Tebaldi et al. (2008), identificaram bactérias psicrótróficas isoladas em diversos tanques de refrigeração. Das dezesseis propriedades analisadas, oito indicaram a presença de *Enterococcus*, sendo *E. durans*, *E. faecium* e *E. faecalis*

as estirpes predominantes. Neste estudo 92% das estirpes avaliadas quanto à produção de enzimas proteolíticas apresentaram resultado positivo.

Estas bactérias, relacionadas a várias características tecnológicas em queijos (por exemplo a capacidade acidificante), geralmente apresentam baixa atividade proteolítica e peptidolítica e capacidade de metabolizar o citrato em componentes sápidos e aromáticos como acetato, acetaldeído e diacetil, participando possivelmente do desenvolvimento de sabor e aroma durante a maturação (GIRAFFA, 2003).

Foulquié-Moreno et al. (2006), afirmaram que como consequência do metabolismo do citrato, as bactérias do gênero *Enterococcus* desempenham um importante papel no desenvolvimento do flavour de produtos lácteos fermentados como os queijos.

Franz et al. (2003) também destacaram sua importância na produção dos queijos europeus fabricados em países do Mediterrâneo. Segundo os autores, o aroma característico destes queijos, produzidos a partir de leite cru ou pasteurizado, se deve a presença destas bactérias.

Sarantinopoulos, Kalantzopoulos e Tsakalidou (2001) verificaram a capacidade de *E. faecalis* FAIR-E 229, pertencente ao banco de culturas da Universidade de Ghent, na Bélgica, em metabolizar o citrato, com produção de diacetil em diferentes substratos. O micro-organismo foi capaz de metabolizar o citrato em todos os substratos utilizados.

Em outro estudo, Sarantinopoulos et al. (2001) avaliaram a capacidade de 56 isolados de *E. faecalis* e 57 de *E. faecium* em metabolizar o citrato presente no leite. Os autores verificaram que 84% dos isolados de *E. faecalis* metabolizaram acima de 84% do citrato em 6 horas a 37 °C, enquanto apenas 7% dos isolados de *E. faecium* tiveram o mesmo desempenho. Os resultados demonstraram que esta característica é dependente das espécies do gênero.

A capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas por bactérias do gênero *Enterococcus* tem sido relatada por diversos pesquisadores (GIRAFFA, 2002; GIRAFFA, 2003; GARDINI et al. 2001; PERRI, 2010; FRANZ et al., 2003).

A produção de enzimas proteolíticas por *Enterococcus* é descrita por Araújo (2008) como fator fundamental para obtenção da textura e sabor característicos de queijos maturados.

Gardini et al. (2001) avaliaram a influência do pH, temperatura e concentração de NaCl na atividade proteolítica de *E. faecalis* EF37. Os autores realizaram um Delineamento Composto Central, com faixas que variaram de 5,4 a 7,0 para o pH, 2 a 6% para a concentração de NaCl e 16 a 44 °C para a temperatura. A atividade proteolítica foi afetada principalmente pela temperatura de incubação e concentração de NaCl, enquanto o efeito do pH foi considerado pequeno dentro da faixa estudada. Neste estudo, a atividade proteolítica máxima foi observada na faixa de temperatura entre 32 e 38 °C e concentração de NaCl de 3,2%.

Segundo Foulquié-Moreno et al. (2006) os lipídios podem contribuir para o sabor do queijo, de três formas: por serem uma fonte de ácidos graxos de cadeia curta, que são convertidos a compostos sápidos e aromáticos; por serem a causa de oxidação de ácidos graxos, levando a formação de aldeídos insaturados e consequente sabor de ranço; por serem solventes para compostos sápidos aromáticos produzidos não apenas por lipídios. Assim a ação de enzimas lipolíticas, como a lipase natural do leite ou as produzidas por micro-organismos psicrotóxicos, podem conferir aos queijos, principalmente os maturados, propriedades tecnológicas desejáveis.

A atividade lipolítica das bactérias deste gênero é, geralmente, relativamente baixa e variável entre as espécies (SARANTINOPOULOS et al., 2001). Estes autores observaram que estirpes selecionadas de *E. faecalis* apresentaram maior atividade lipolítica, seguido das espécies *E. durans* e *E. faecium*.

Vários estudos realizados nos últimos anos evidenciam a presença de bactérias do gênero *Enterococcus* em produtos lácteos, especialmente em queijos devido às suas alterações desejáveis neste produto.

Segundo Giraffa (2003), em queijos tradicionais como Manchego, Mozzarella, Monte Veronese, Fontina, Caprino, Serra, Venaco e Comte, estas

bactérias influenciam positivamente no processamento e maturação. Nestes queijos, os níveis destas bactérias na massa podem chegar de 4 a 6 logUFC.g⁻¹ e no final do período de maturação, de 5 a 7 logUFC.g⁻¹.

Dolci et al. (2008) identificaram a presença de *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. casseliflavus* no queijo artesanal Raschera PDO, produzido na região do Piemonte na Itália. Bactérias deste gênero também foram observadas em queijos artesanais produzidos na região da Serra da Canastra, em Minas Gerais (RESENDE et al., 2011) e em leite cru, pingo, coalhada e queijo Minas Frescal produzido em fazendas da região da Serra do Salitre, em Minas Gerais (LIMA et al., 2009).

Em 1974, Efthymiou et al. encontram contagens de bactérias do gênero *Enterococcus* de 4,66, 7,34, 4,07, 4,93, 6,83, 7,23, 5,86 e 6,36 logUFC.g⁻¹ em queijos Gouda, Kefalotyri, Extra Sharp Cheddar, Sharp Cheddar, Fontina, Port Salut, Mild Cheddar e Blue cheese, respectivamente.

Em outra pesquisa, Gelsomino et al. (2001) observaram contagem média de 4,2 logUFC.g⁻¹ em queijo Cheddar.

Segundo Girrafa (2002), as etapas de processamento de alguns alimentos, como por exemplo a salga e a defumação, dificultam o desenvolvimento de diversos micro-organismos, e como nestas condições as bactérias do gênero *Enterococcus* apresentam resistência, podem se multiplicar e se sobressair no produto final.

Mamede (2008) observou que embora durante a produção de queijo de Coalho a salga não tenha afetado significativamente ($p>0,05$) o número de bactérias do gênero *Enterococcus*, este foi favorecido pelo cozimento da massa. Observou-se também que o número destas bactérias e a produção de diacetil aumentaram durante o tempo de armazenamento do produto. O autor sugere que o aumento da produção de diacetil, com consequente sabor e aroma de manteiga, característicos deste queijo, possivelmente estão associados à presença e ao desenvolvimento de *Enterococcus*.

Embora a maior parte das pesquisas envolvendo *Enterococcus* em produtos lácteos sejam focadas em queijos, a presença destas bactérias também tem sido observadas em outros produtos.

Koluman, Akan e Çakiroğlu (2009) avaliaram a presença de *Enterococcus* em diversos alimentos comercializados na cidade de Ankara, na Turquia. Dentre eles estas bactérias foram encontradas em 25% das amostras de iogurte, 10% das amostras de sobremesa láctea, 60% das amostras de *Cream cheese*, 60% das amostras de queijo Cheddar e em 70% das amostras de queijo branco Turco.

Gomes et al. (2008) avaliaram a presença de *Enterococcus* em 120 amostras de alimentos, sendo 30 de queijos, 30 de produtos cárneos, 30 de vegetais, 11 de leite pasteurizado e 19 de leite cru, e encontraram o micro-organismo em todas as classes de alimentos analisadas, o que demonstra a ampla capacidade de sobrevivência e multiplicação em diferentes condições.

Na Europa, bactérias do gênero *Enterococcus* são amplamente utilizadas como probióticos, principalmente em produtos lácteos e suplementos alimentares farmacêuticos, sendo indicadas para o tratamento de doenças como diarreias associada a antibióticos, síndrome do intestino irritável, redução do colesterol e regulação do sistema imune (FRANZ et al., 2011).

No entanto, embora algumas estirpes de *Enterococcus* sejam importantes para maturação de alguns queijos e amplamente utilizadas como probióticas em alguns países, e tenham seus benefícios bem estabelecidos, o surgimento de estirpes resistentes a antibióticos e o aumento da associação destes as doenças humanas, têm gerado preocupação quanto à sua utilização. Principalmente pela possibilidade de que genes que codificam fatores de virulência sejam transferidos para outras estirpes probióticas (FRANZ et al., 2003).

2.3 Características do gênero *Pseudomonas*

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são micro-organismos que se caracterizam por serem Gram-negativos, aeróbios, não formadores de esporos e possuir forma de bastonete reto ou ligeiramente curto. Sua motilidade ocorre através de um ou vários flagelos polares, e raramente são imóveis (CORNELIS, 2008).

São micro-organismos ubiqüitários, e, portanto são largamente distribuídos na natureza, como solo, água, superfícies de plantas e diversos alimentos

(RAMOS; FILLOUX, 2004). Apresentam capacidade de crescimento em meio ácido e são catalase e oxidase positiva (CORNELIS, 2008).

Por serem psicrotróficas, as bactérias deste gênero apresentam capacidade de multiplicação a temperaturas de refrigeração, além de possuírem intensa atividade metabólica, com produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 2005).

Segundo Sørhaug e Stepaniak (1997), o gênero *Pseudomonas* inclui espécies capazes de apresentar um curto tempo de geração sob refrigeração, entre 0 e 7 °C, além de uma temperatura mínima de crescimento de até -10 °C.

Em virtude destas características, *Pseudomonas* são frequentemente relatadas como deterioradoras de alguns alimentos, como pescados, carnes e derivados, aves, leite e derivados, mantidos sob refrigeração. Nestes produtos podem ser responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis, além de limosidade superficial (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

Algumas espécies, produtoras de pigmentos verde fluorescentes, estão envolvidas na deterioração de alimentos como as carnes frescas, enquanto outras espécies são consideradas como patógenos humano oportunistas ou fitopatogênicas, causando perdas na produção de vegetais (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

Considerada como patógeno oportunista por geralmente causar infecção apenas em indivíduos com o sistema imunológico debilitado, *P. aeruginosa* é um dos principais agentes de infecção hospitalar. A difícil erradicação da infecção causada por este micro-organismo, em virtude da sua ampla expressão de fatores de virulência e resistência natural ou adquirida a muitos antibióticos e desinfetantes, tornam esta uma bactéria de grande importância clínica (LINCOPAN; TRABULSI, 2008).

Dentre as espécies deterioradoras deste gênero, destaca-se a *P. fluorescens*, capaz de adaptar-se rapidamente a diferentes condições ambientais e de produzir enzimas termoestáveis, é responsável pela perda de aceitabilidade de diversos alimentos, sendo a causa de diversas alterações, principalmente na aparência e aroma de alguns produtos (FORSYTHE, 2002).

2.3.1 Bactérias do gênero *Pseudomonas* em produtos lácteos

Por constituírem parte do grupo de micro-organismos psicrotróficos, as bactérias do gênero *Pseudomonas* são consideradas como importantes agentes na deterioração em leite e derivados (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Segundo Cousin (1982), Eneroth, Ahrné e Molin (2000), Pinto, Martins e Vanetti (2006) e Wiedmann et al. (2000), dentre as bactérias psicrotróficas contaminantes, *Pseudomonas* constitui o gênero mais encontrado nos produtos lácteos refrigerados.

Podem contaminar o leite por diversas formas, como pelo suprimento de água de qualidade inadequada e procedimentos de higiene insatisfatórios na fonte de produção ou na indústria de laticínios (ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000).

Apesar de representarem apenas 10% da microbiota inicial no leite cru, possuem reduzido tempo de geração a baixas temperaturas, tornando-se predominantes em produtos armazenados refrigerados (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Eneroth, Ahrné e Molin (2000), verificaram que o gênero *Pseudomonas* constituiu 77% dos isolados obtidos em amostras de leite cru, pasteurizado e de ambientes da indústria de laticínios. Em pesquisa realizada por Pinto, Martins e Vanetti (2006), as bactérias deste gênero representaram 94,2% do total de micro-organismos psicrotróficos quantificados em leite cru coletado de silo industrial. Craven e Macauley (1992) reportaram que 87% das bactérias psicrotróficas isoladas de leite pasteurizado armazenado a 4 °C pertenciam ao gênero *Pseudomonas*.

Os resultados obtidos por Sanvido (2009) demonstram a capacidade das bactérias deste gênero em se multiplicar rapidamente mesmo a baixas temperaturas. Na avaliação do efeito do armazenamento do leite cru sobre sua qualidade microbiológica observou-se contagens de 2,63, 5,90 e 6,64 logUFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas spp.*, após 0, 4 e 7 dias de armazenamento a 5 °C, respectivamente.

A grande capacidade de deteriorar diversos tipos de alimentos, e consequentemente gerar enormes prejuízos às indústrias, fez com que nos

últimos anos, algumas pesquisas fossem desenvolvidas com o objetivo de avaliar a presença de bactérias deste gênero em produtos lácteos e identificar as espécies predominantes.

Bedeltavana, Haghkhah e Nazer (2010), realizaram contagens e identificação de micro-organismos contaminantes em várias etapas do processo de pasteurização. Segundo os autores *P. fluorescens* respondeu por 40, 42 e 60% do total de micro-organismos contaminantes no caminhão isotérmico de transporte do leite cru, no silo industrial e na entrada do pasteurizador, respectivamente.

Em outro estudo Franciosi et al. (2011) identificaram 138 isolados de leite integral, leite desnatado e creme destinados a fabricação de queijo Grana Trentino, em uma indústria de laticínios na Itália. Os autores encontraram contagens de 3,9, 5,2 e 2,5 UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas* spp. no leite integral, creme e leite desnatado, respectivamente.

Estas bactérias apresentam capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, secretadas durante o armazenamento do leite cru, e que permanecem mesmo após os tratamentos térmicos aplicados, pasteurização ou UHT, alterando e reduzindo a vida útil do produto final (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Embora a faixa de temperatura ótima para produção destas enzimas esteja entre 20 e 30 °C, as bactérias deste gênero são capazes de sintetizá-las mesmo a baixas temperaturas (McKELLAR, 1982). Os resultados obtidos pelo autor demonstraram que a produção de proteases por *P. fluorescens* a 5 °C correspondeu a 55% do total produzido a 20 °C.

A produção de proteases termorresistentes também foi observada por Adams, Barach e Speck (1975). Os autores isolaram bactérias psicrófilas de leite cru estocado a 4°C por uma semana, e verificaram que todos os isolados do gênero *Pseudomonas* produziram a enzima.

Em outro estudo, Morales, Fernández-García e Nuñez (2005) avaliaram o efeito da presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* no leite cru destinado a fabricação de queijos. Os autores identificaram 122 compostos voláteis em queijos

inoculados como $5,0 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de *Pseudomonas* e armazenados por 12 dias a 10 °C, devido a produção de enzimas extracelulares.

Entretanto, a produção destas enzimas proteolíticas e lipolíticas é dependente da estirpe de *Pseudomonas*, e em geral *P. fluorescens* é a mais associada à deterioração de produtos lácteos, embora outras espécies como *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. putida* também sejam frequentemente encontradas (WIEDMANN et al., 2000). Nesta pesquisa a avaliação de 66 isolados de *Pseudomonas* provenientes de leite cru e processado, indicou que 58% dos isolados apresentavam capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas. Assim como no estudo anterior, a espécie predominante foi *P. fluorescens*.

A partir da caracterização de 55 isolados de *P. fluorescens* de leite cru, os autores Wang e Jayarao (2001), observaram que 80, 91 e 58% das estirpes foram proteolíticas a 7, 22 e 32 °C, respectivamente. No entanto, apenas 7, 44 e 7% dos isolados apresentaram atividade lipolítica nas mesmas condições de temperatura.

Em estudo realizado por Arcuri et al. (2008), bactérias contaminantes em leite cru refrigerado das regiões da Zona da Mata de Minas Gerais e sudeste do Rio de Janeiro foram isoladas e identificadas. Dos isolados, *Pseudomonas* foi o gênero predominante, e destes a espécie *P. fluorescens* foi a mais comum (37,6%). Além disto, nesta pesquisa foi observado que 60,57% dos isolados identificados como sendo do gênero *Pseudomonas*, apresentaram atividade lipolítica e proteolítica a 4, 7, 10 e 21 °C.

Em manteiga, as bactérias deste gênero causam a chamada “mancha de superfície”, ou putrefação, caracterizada também pelo forte odor devido a presença de alguns ácidos orgânicos (JAY, 2005). Wang e Frank (1981) verificaram que 55% dos micro-organismos psicotróficos presentes em 52 amostras comerciais de manteiga pertenciam ao gênero *Pseudomonas*.

Kumar et al. (2011) isolaram e caracterizaram micro-organismos responsáveis pela deterioração de diversos tipos de alimentos, dentre eles foram analisadas amostras de leite, queijo, sorvete, manteiga e creme de leite. Dos

isolados de produtos lácteos, 44,44, 22,22, 22,22 e 11,11% pertenciam aos gêneros *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Micrococcus*, respectivamente.

A gelificação do leite UHT também é frequentemente atribuída a presença de enzimas produzidas por *Pseudomonas* no produto. Gaucher et al. (2011) avaliaram durante 92 dias, a estabilidade de leite UHT produzido a partir de leite inoculado com *P. fluorescens* CNRZ 798. Os resultados demonstraram que as enzimas produzidas pela bactéria, promoveram a hidrólise da caseína presente no leite, o que desestabilizou o produto durante o armazenamento.

2.4 Adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos

Superfícies de equipamentos e utensílios utilizadas nas indústrias de alimentos são frequentemente relatadas como passíveis da formação de biofilmes microbianos, principalmente como consequência da grande disponibilidade de nutrientes aos micro-organismos (BERESFORD; ANDREW; SHAMA, 2001).

A primeira publicação com a descrição dos biofilmes foi realizada por Zobell, em 1943, que ao estudar o crescimento de bactérias marinhas em cascos de navios, principalmente em superfícies de vidro, metal e plástico que estavam submersas, verificou que a presença de matérias orgânicas e outras partículas adsorvidas nessas superfícies favoreciam a adesão destas bactérias. Além disso, o autor observou que quando maior o tempo de contato, maior era a adesão.

Surgiram então várias definições para o termo biofilme bacteriano. Criado, Suárez e Ferreirós (1994), afirmaram que os biofilmes são constituídos por bactérias aderidas às superfícies, envolvidas por uma camada de partículas de matéria orgânica, formando depósitos aos quais os micro-organismos estão aderidos por meio de filamentos, de origem polissacarídica ou protéica, denominados glicocalix.

Definição semelhante foi proposta por Costerton et al. (1995). Os autores definiram os biofilmes como uma comunidade complexa e estruturada de micro-organismos, que envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, encontram-se aderidos entre si e/ou a uma superfície ou interface.

Segundo Donlan e Costerton (2002), os biofilmes são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, em cuja formação os micro-organismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética.

No entanto, Hood e Zotolla (1997) afirmaram que embora a presença de exopolissacarídeos auxilie na retenção de nutrientes e na proteção da estrutura do biofilme, a adesão de bactérias a superfícies não está condicionada a sua presença. Alguns micro-organismos apresentam capacidade de adesão e formação de biofilme mesmo em ausência de exopolissacarídeos como demonstrado por Akutsu (2001). O autor verificou contagens médias de 4,00 UFC.cm⁻² de esporos de *Bacillus spothermodurans* em superfícies de aço inoxidável com diferentes formatos (cilíndrico, Tê e curva de 90°).

Em 2007, Schneider propôs uma definição para biofilmes microbianos com a finalidade de permitir a clara diferenciação das células planctônicas, e incluir todas as formas de vida microbiana com características de biofilme. Assim, os biofilmes foram definidos como “comunidades de micro-organismos, aderidas a superfícies ou suspensas em solução, cujas células podem ou não estar envoltas por uma matriz de exopolímeros, onde a posição espacial relativa dos organismos individuais é fixa durante uma geração e relativamente fixa também nas gerações seguintes”.

De acordo com Ubbink e Zammaretti (2007), a adesão de micro-organismos a superfícies é um fenômeno que ocorre naturalmente em meios aquosos, e é dependente das propriedades superficiais, como tensão superficial e composição da superfície, das interfaces dos suportes de adesão, como aço, mármore, polímeros, etc., e das membranas dos micro-organismos. Os autores afirmam que as propriedades microbiológicas e as características do meio circundante, tais como pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, são determinantes para o processo.

Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídios, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros compostos, que formam uma

estrutura capaz de protegê-los, permitindo que se desenvolvam em cultivo puro ou em associação com outros micro-organismos (MOSTELLER; BISHOP, 1993).

Durante o processo de formação do biofilme as células que se aderem são denominadas de sésseis, enquanto que as que permanecem livres são denominadas de planctônicas (ANDRADE; BRIDEGMAN; ZOTOLLA, 1998).

Os dados da literatura divergem para a contagem mínima de células aderidas a partir da qual se considera que houve formação de biofilme. De acordo com Andrade, Bridegman e Zotolla (1998), neste caso, a contagem de células sésseis presentes por cm^2 , deve ser de no mínimo 10^7 UFC. Entretanto Ronner e Wong (1993), consideram que o número mínimo de células aderidas deve ser de 10^5 UFC. cm^{-2} , enquanto que para Wirtanen, Husmark e Mattila-Sandholm (1996), esta contagem pode ser ainda menor, 10^3 UFC. cm^{-2} .

Vários mecanismos para explicar a adesão bacteriana em superfícies de contato foram propostos. A teoria, descrita por Marshall, Stout e Mitchell (1971), afirma que a adesão em superfícies sólidas é um processo que acontece em duas etapas, sendo a primeira delas denominada de reversível e a segunda de irreversível. Na etapa reversível, os micro-organismos se encontram aderidos à superfície apenas por forças de Van der Waals e interações eletrostáticas, facilitando sua remoção. Já a segunda etapa é considerada irreversível, uma vez que o tempo de aderência inclui adesão física da célula à superfície por material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzido pelos micro-organismos, denominado matriz de glicocalix.

De acordo com Characklis (1990) a adsorção reversível resulta principalmente de interação de forças de longa distância e de fraca especificidade, enquanto adesão irreversível pode ser considerada como resultante de interações de forças de curta distância mais definitivas e de alta especificidade.

Para Zottola e Sasahara (1994), a adesão ocorre a partir da deposição dos micro-organismos em uma superfície de contato, seguido da fixação, interação com a superfície e início do crescimento, quando a massa celular atinge determinada concentração, a ela são agregados nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, formando-se o que se denomina de biofilme bacteriano.

Watnick e Kolter (2000), afirmam que os micro-organismos se aproximam da superfície, formando uma associação provisória com a própria superfície e outros micro-organismos. Ocorre a formação de microcolônias e produção de exopolissacarídeos, que passam a estabilizar a associação. Após esta etapa forma-se uma estrutura tridimensional que consiste no biofilme microbiano. Quando as condições tornam-se desfavoráveis, alguns micro-organismos se desprendem e assim poderão colonizar outras superfícies. A Figura 1 foi apresentada pelos autores para exemplificar a teoria.

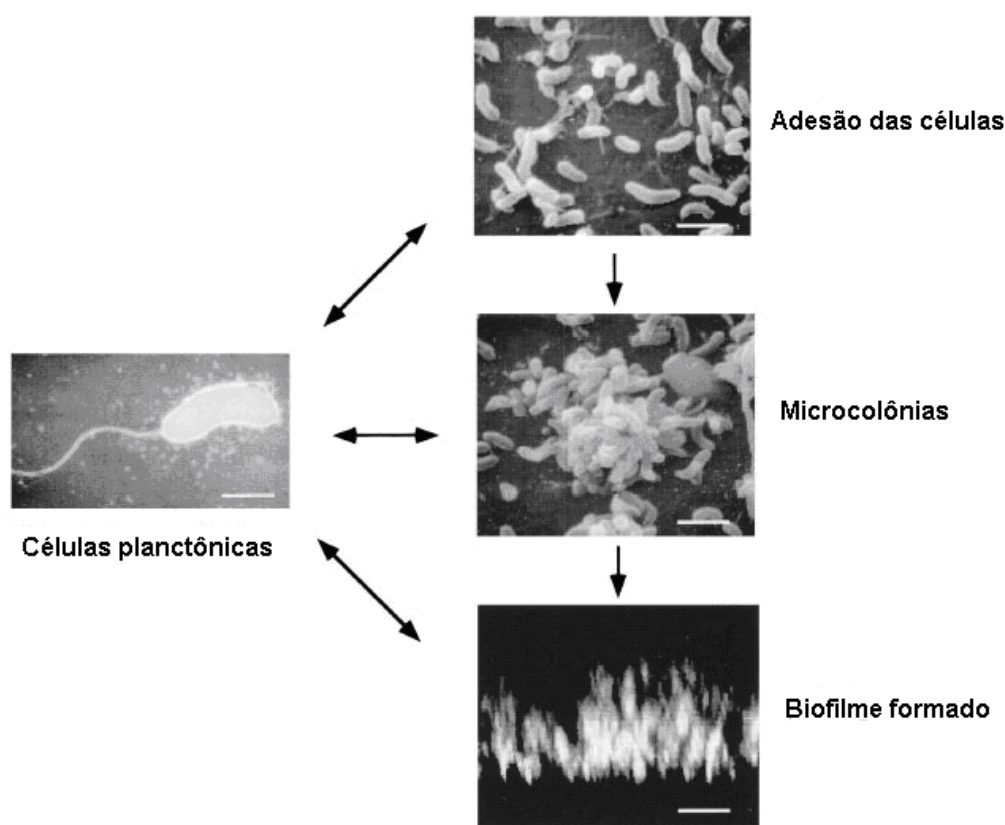


Figura 1: Etapas da formação de biofilme bacteriano por microscopia eletrônica

Fonte: Watnick; Kolter (2000)

Nota: Adaptado pela autora

Proposta semelhante a esta foi apresentada por Monroe (2007). Esta teoria define a maturação do biofilme como um processo complexo que envolve cinco estágios para seu total desenvolvimento (FIGURA 2). Os autores sugerem que o

biofilme só é formado a partir de células pioneiras capazes de se aderir as superfícies e criar condições favoráveis à adesão das demais células. Assim, dispositivos capazes de inibir a adesão inicial das células pioneiras, por exemplo, a alteração das características físicas e das propriedades da superfície, como a hidrofobicidade, podem auxiliar no controle do processo.

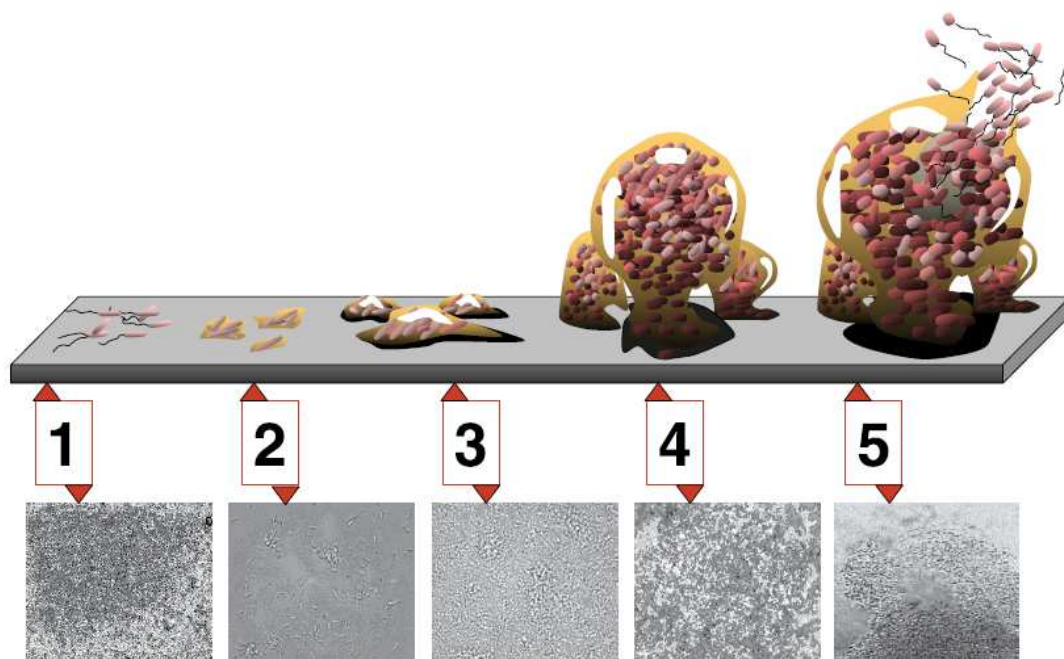


Figura 2: Estágios de desenvolvimento de biofilme bacteriano segundo Monroe

Estágio 1: Adesão inicial. Estágio 2: Adesão irreversível. Estágio 3: Maturação inicial. Estágio 4: Maturação. Estágio 5: Desagregação de células. Cada estágio de desenvolvimento no diagrama está acompanhado por uma fotomicrografia eletrônica da formação de um biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: Monroe (2007)

Crédito da imagem: D. Davies

Nota: Adaptado pela autora

O estágio de desagregação de células do biofilme é de fundamental importância e motivo de preocupação para as indústrias de alimentos. Nesta fase, além da contaminação dos alimentos por micro-organismos alteradores e/ou patogênicos, outros pontos da superfície poderão ser contaminados, iniciando-se

um novo ciclo de formação do biofilme, e aumentando os pontos de contaminação (NORWOOD; GILMOUR, 1999).

Segundo Forsythe (2002), a liberação de grandes partículas de biomassa no meio, pode promover a contaminação dos alimentos em altos níveis.

Após a formação, os biofilmes microbianos apresentam resistência aos sanitizantes muito superior quando comparados às células planctônicas, uma vez que suas características estruturais e a produção de exopolissacarídeos desempenham papéis de proteção a agentes químicos e estresses físicos (BLASCHEK; WANG; AGLE, 2007).

2.4.1 Fatores que influenciam na adesão e formação de biofilmes bacterianos

Muitos são os fatores que exercem influência no processo de adesão e formação de biofilmes bacterianos. Hidrofobicidade, carga da superfície, temperatura, presença de substrato, aparatos celulares como pili, fímbrias e flagelos, estão dentre estes fatores (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Diferenças existentes entre as superfícies utilizadas no processamento de alimentos e a configuração dos equipamentos em relação à facilidade ou não de limpeza e sanitização, também influenciam no processo da adesão bacteriana. Segundo Pereira et al. (2000), a morfologia das superfícies, como sua composição, rugosidade e porosidade, podem ser determinantes para este processo.

Segundo Bower, McGuire e Daeschel (1996), as superfícies utilizadas nas indústrias de alimentos diferem em suas microtopografias, podendo apresentar fendas ou fissuras em tamanhos suficientes para alojar micro-organismos, e assim protegê-los dos procedimentos de higienização por serem regiões de difícil acesso.

Bonaventura et al. (2008) avaliaram a capacidade de 44 cepas de *Listeria monocytogenes*, isoladas de amostras de alimentos e ambientes da indústria, em formar biofilme em superfícies de aço inoxidável, vidro e poliestireno nas temperaturas de 4, 12, 22 e 37 °C. Os resultados demonstraram que a superfície

com maior índice de formação de biofilme foi o vidro, seguido do poliestireno e aço inoxidável independentemente da temperatura. Para todas as superfícies, quanto maior a temperatura, maior foi a adesão bacteriana. Este estudo avaliou ainda a influência da hidrofobicidade na formação do biofilme, e verificou que o aumento da temperatura, resultou em um considerável aumento na medida de hidrofobicidade da bactéria.

A hidrofobicidade está relacionada a componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa dos micro-organismos, assim as interações poderão influenciar a adesão de micro-organismos, seja em superfícies de processamento ou na própria superfície do alimento (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

O estudo realizado por Careli et al. (2009) também comprova a influência do tipo de superfície. A adesão de *P. fluorescens* em diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos foi avaliada. Os cupons foram imersos em caldo nutriente contendo aproximadamente 10^3 a 10^4 UFC.mL⁻¹. Os resultados demonstram que após 10 horas de incubação a 28 °C, *P. fluorescens* foi capaz de aderir ao aço inoxidável, como uma contagem média de 5,0 logUFC.cm⁻², e na superfície do granito e mármore a 6,1 logUFC.cm⁻². Os autores verificaram também que nestas condições de temperatura e concentração inicial de inóculo, o número de células aderidas duplicou em 29,5 minutos em aço inoxidável, e em apenas 9,01 e 11,41 minutos para o granito e mármore, respectivamente.

Em avaliação da adesão de *Salmonella enteritidis* em aço inoxidável temperaturas de incubação que variaram de 5 a 37 °C, pH de 4,5 a 7,4 e concentração de NaCl de 0,5 a 10,5%, Giaouris, Chorianopoulos e Nychas (2005), observaram maior taxa de adesão para a combinação de 20 °C, pH 7,4 e 0,5% de NaCl. Os resultados demonstraram que além da temperatura, fatores como pH e substrato também interferem no processo de formação de biofilme bacteriano.

Segundo Chaves (2004), o pH afeta as propriedades superficiais dos micro-organismos e das superfícies sólidas, aumentando ou diminuindo a repulsão eletrostática entre os mesmos, com consequente interferência no processo de adesão de formação de biofilme.

A importância do tempo de contato ficou clara no estudo realizado por Parizzi et al. (2004). Imediatamente após a imersão de cupons de aço inoxidável em caldo BHI a 30 °C, contendo uma contagem inicial de aproximadamente 10^3 a 10^4 UFC.cm⁻¹ de *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus*, a adesão avaliada por contagem padrão em placas foi em média de 1,23 e 1,62 log UFC.cm⁻² respectivamente. Após 10 horas de contato a adesão observada foi de 4,0 e 4,5 log UFC.cm⁻² respectivamente.

O tipo de substrato também desempenha um importante papel neste processo. Segundo Boari (2009), o leite é um substrato que pode beneficiar o processo de adesão e formação de biofilmes, já que possui uma constituição rica em carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, além da alta atividade de água e pH próximo a neutralidade.

A formação de biofilmes por bactérias psicotróficas isoladas de leite, foi fortemente influenciada pelo meio de cultivo em pesquisa realizada por Viana (2006). Os meios nutricionalmente mais ricos favoreceram o desenvolvimento bacteriano e consequentemente a formação de biofilme.

A produção de substâncias extracelulares pelas bactérias, os denominados exopolissacarídeos (EPS), pode ser considerada o fator de maior relevância para fixação e proteção dos micro-organismos em superfícies, pois afetam a porosidade, densidade, conteúdo de água, propriedades de absorção e estabilidade mecânica do biofilme (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007).

Estes biopolímeros que envolvem os micro-organismos no biofilme, consistem não somente de polissacarídeos, mas também de quantidades consideráveis de proteínas, ácido nucléico e lipídios (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007).

Os agregados de células bacterianas envoltos por EPS formam uma matriz altamente organizada e hidratada, que conferem ao biofilme proteção contra as variações do ambiente e a difusão de antibacterianos (LINCOPAN; TRABULSI, 2008).

O *quorum sensing* (QS) é outro fator que recentemente tem sido considerado de grande importância para a formação de biofilmes microbianos.

Consiste de um sistema de comunicação entre célula-célula, dependente da densidade populacional. As bactérias, neste sistema, sintetizam compostos sinalizadores de baixo peso molecular, denominados de autoindutores (AIs), que irão modular e influenciar a formação do biofilme, modulando também outras funções como esporulação, produção de bacteriocinas, expressão de fatores de virulência, produção de proteases e pigmentação, além de favorecer o acesso a nutrientes (VIANA, 2006).

A pesquisa realizada por Araújo et al. (2012) evidenciou a capacidade de síntese de homoserinas lactonas acilada (AHLs), moléculas sinalizadoras, por *Enterobacter sakazakii* cultivada em caldo Luria Bertani (LB). Pinto (2005) observou a produção de AHLs por 47 de um total de 53 bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado. A produção destas moléculas sinalizadoras por *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolítica* e *Serratia proteamaculans*, também foram detectadas por Dourou et al. (2011), que verificou também que estas moléculas foram capazes de interferir no crescimento de *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*.

As espécies envolvidas na formação do biofilme influenciam em sua estrutura final. As condições ambientais ou capacidade de produção de inibidores, como bacteriocinas, podem favorecer determinadas espécies e reduzir o desenvolvimento de outras (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

Com o objetivo de comprovar essa influencia, Boari et al. (2009) avaliaram a formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*. Utilizando o leite como substrato, os pesquisadores analisaram a formação de biofilme por mono e multiespécies, a partir de um inoculo inicial de aproximadamente 10^5 UFC.mL⁻¹ de cada micro-organismo. Em monocultivo, *S. aureus* formou biofilme após 48 horas a 18 °C, e após 5 dias a 7 °C. Em cultivo combinado, *S. aureus* formou biofilme apenas a 18 °C após 4 dias. Já *A. hydrophila* foi capaz de formar biofilme a 4 °C após 4 dias, e a 7 e 18 °C após 2 dias. Segundos os autores o fato da *A. hydrophila* apresentar um desempenho reprodutivo superior ao *S. aureus*, esta consegue se sobressair no processo de adesão devido à competição.

Resultado semelhante foi observado por Pompermayer e Gaylarde (2000). Em pesquisa sobre a adesão de *S. aureus* e *Escherichia coli*, em condição de mono e multicultivo, também concluíram que o melhor desempenho de *S. aureus* aconteceu em culturas monoespécies. Segundo os pesquisadores, há uma superioridade de micro-organismos Gram-negativos em se aderir e formar biofilmes devido a seus aparatos celulares, como flagelos, e menor tempo de geração, garantindo sua predominância quando comparados aos Gram-positivos.

De acordo com Marques (2004) estas variações podem ocorrer até mesmo para uma mesma espécie isolada de diferentes amostras. O pesquisador verificou que diferentes cepas de *E. faecalis* isoladas de amostras clínicas, apresentaram comportamento distinto durante a formação de biofilme em superfície de vidro. Algumas cepas foram capazes de formar biofilme, enquanto outras apenas de aderir à superfície.

2.4.2 Formação de biofilmes por bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas*

Uma grande variedade de micro-organismos apresentam capacidade de adesão e formação de biofilme em superfícies utilizadas no processamento de alimentos, podendo, conseqüentemente, levar a decomposição dos alimentos e/ou transmissão de doenças (WONG, 1998).

Originários de diversas fontes primárias de contaminação dentro da cadeia alimentar, o envolvimento destes micro-organismos no processo de adesão e formação de biofilme em equipamentos e utensílios utilizados durante o processamento de alimentos pode ocorrer em vários níveis de intensidade e sua liberação poderá trazer conseqüências indesejáveis a qualidade do alimento, podendo alterá-lo ou mesmo torná-lo um veículo de patógenos (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

Assim micro-organismos deteriorantes e patogênicos capazes de aderir a superfícies de processamento podem originar problemas de ordem pública ou econômica.

Entre as espécies bacterianas alteradoras associadas à formação de biofilmes, incluem-se *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* sp. (CRIADO; SUÁREZ; FERREIRÓS, 1994), *Pseudomonas fluorescens* (ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000; WIEDMANN et al., 2000; WANG; JAYARAO, 2001), *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997; GELSOMINO et al., 2001; GIRAFFA, 2003).

É importante ressaltar que para um mesmo gênero e uma mesma espécie, as estirpes alteradoras também podem ser patogênicas, sendo que sua diferenciação só se torna possível a partir de estudos a nível molecular.

Segundo Andrade, Bridgeman e Zottola (1998), as bactérias do gênero *Enterococcus* apresentam capacidade de aderência em aço inoxidável, e devido a características como capacidade de crescimento a baixas temperaturas e resistência a pasteurização, a presença destas implica na necessidade da utilização correta das temperaturas de estocagem do leite e um adequado programa de limpeza e sanitização.

Em estudo realizado por Rosado (2009), a capacidade de formação de biofilme por *Enterococcus faecium*, isolado de queijo de coalho em superfície de aço inoxidável, foi avaliada através de um Delineamento Composto Central. Neste estudo os fatores tempo e temperatura de exposição influenciaram o processo de formação de biofilme, sendo que a faixa ótima de combinações variou de 3 a 7,5 dias e 22 a 43 °C. Após 4 dias de incubação a 25 °C (ponto central do delineamento) a contagem observada foi em média de 5,90 logUFC.cm⁻².

Gelsomino et al. (2002), avaliaram a fonte de contaminação do leite cru destinado a produção de queijo Cheddar. A contagem das bactérias deste gênero no leite cru após três horas da ordenha foi em média de 7,3 x 10³ UFC.mL⁻¹ e no queijo de 2,0 x 10⁵ UFC.mL⁻¹. A pesquisa revelou que as mesmas estirpes de *Enterococcus* encontradas no queijo estavam presentes nos equipamentos de ordenha. Assim os autores sugerem que a contaminação pode ser atribuída a uma possível formação de biofilme como consequência de falhas nos procedimentos de higienização, uma vez que a contaminação microbiana permanecia nas fendas, junções, extremidades inoperantes e encaixes.

Os mesmos autores já haviam anteriormente isolado bactérias deste gênero em uma fazenda de produção de queijo Cheddar na Irlanda. As amostras contaminadas foram de leite cru, queijo Cheddar, fezes humanas e de vacas, água e após a higienização do tanque de leite e equipamento de ordenha (GELSOMONO et al., 2001).

Temelli et al. (2006) também verificaram a presença de bactérias do gênero *Enterococcus* durante o processamento de queijo. As bactérias foram encontradas em superfícies de faca de corte, bandejas, agitador de leite, prensas, embalagens, assoalho, paredes e em mãos de manipuladores, demonstrando novamente que a qualidade do produto final é função da taxa de contaminação dos equipamentos e utensílios de contato e de uma higienização eficiente, e ainda da capacidade de adesão de *Enterococcus* em tais superfícies.

A maioria das pesquisas que relacionam as bactérias do gênero *Enterococcus* e a formação de biofilme estão voltadas para a área clínica, já que algumas espécies são importantes causadoras de infecções hospitalares.

Fonseca (2010) comparou a capacidade de adesão e formação de biofilme de várias estirpes de *Enterococcus* de origens alimentares e clínicas. Neste estudo, os isolados de origem alimentar apresentaram maior capacidade de adesão e formação de biofilme quando comparados aos de origem clínica.

Pesquisa semelhante também foi realizada por Medeiros (2011), no entanto, neste caso a incidência de formação de biofilme foi de 97% para os isolados de origem clínica e 95,7% para os de origem alimentar.

Em pesquisa realizada por Al-Ahmad et al. (2010), seis voluntários, entre 25 e 26 anos, consumiram queijo Brie de Meaux, contendo $4,2 \times 10^8$, 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^5 UFC.g⁻¹ de *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* e *E. durans*, respectivamente. Após duas horas de consumo do queijo, foi detectado o início da adesão na cavidade dental por *E. faecalis*, para os seis voluntários, por *E. faecium* em cinco voluntários e em apenas um voluntário por *E. avium* e *E. durans*. Contagens de até 10^4 UFC.cm⁻² de *E. faecalis* foram encontradas em cinco voluntários após cinco dias de consumo, enquanto *E. faecium* e *E. durans* foram detectados em apenas dois voluntários, em contagens de 10^4 e 10^3 UFC.cm⁻² respectivamente. Assim, os

autores estabeleceram que os isolados de *Enterococcus* permaneceram na cavidade oral, devido a formação de biofilmes, após a ingestão do alimento contaminado, podendo vir a causar infecções endodônticas.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* também são frequentemente relatadas em processos de formação de biofilmes em superfícies que entram em contato com os alimentos, gerando grandes perdas econômicas principalmente nas indústrias de leite e derivados (STONE; ZOTTOLA, 1985).

Nos últimos anos, vários estudos evidenciaram a presença de *Pseudomonas* em diversas etapas do processamento de produtos lácteos, como o realizado por Dinsmore et al. (2003) em que foi avaliada a presença das bactérias deste gênero em diferentes etapas da ordenha. Foram observadas a contaminação pelas bactérias deste gênero nos equipamentos de ordenha, mangueira, em diversas amostras de água coletadas em diferentes pontos, como a utilizada para higienização das tetas do animal e das unidades de ordenha.

Dogan e Boor (2003) realizaram coletas em diversos pontos em plantas de processamento de leite e detectaram a presença de *Pseudomonas* em amostras de leite cru, leite pasteurizado, pisos, ralos, tubos, tanques de armazenamento e válvulas dos equipamentos. De um total de 338 isolados, 51% foram identificados como *P. fluorescens* e 14% como *P. putida*.

A presença de *Pseudomonas* spp. em diferentes etapas da ordenha do leite também foi avaliada por Fagundes et al. (2006). Mesmo após uma higienização considerada adequada, foram observadas contagens médias de $2,48 \times 10^2$ e $1,97 \times 10^4$ UFC.cm⁻², nas superfícies de tetos e equipamentos, respectivamente, demonstrando a capacidade destas em permanecerem aderidas as superfícies. Neste estudo o gênero *Pseudomonas* também foi encontrado em amostras de água e nas mãos dos funcionários.

As bactérias deste gênero apresentam capacidade de produção de grande quantidade de exopolissacarídeos, que auxiliam e protegem os micro-organismos no processo de adesão e formação de biofilmes em superfícies de processamento que entram em contato com os alimentos (IRIE et al., 2010).

A capacidade de produzir alginato por *P. aeruginosa* exemplifica esta proteção, pois a presença de ácido urônico acetilado neste composto aumenta a capacidade de hidratação, evitando assim que as células desidratem (BAGGE et al., 2004).

Segundo Lincopan e Trabulsi (2008), a síntese de alginato permite a formação de uma matriz altamente hidrofóbica, capaz de auxiliar na adesão das bactérias a superfície com consequente formação de microcolônias rodeadas da matriz exopolissacarídea, constituindo-se uma comunidade bacteriana bem organizada.

Através de um sistema modelo estático de crescimento de *P. fluorescens* em leite reconstituído a 12%, Haun (2004), observou contagens acima de 10^5 UFC por placa de aço inoxidável a 30 °C por 96 horas, mesmo após três ciclos de lavagem das placas em água esterilizada.

Rosado et al. (2011) avaliaram a adesão de *P. fluorescens* em aço inoxidável AISI 304, por microscopia eletrônica de varredura e contagem padrão em placas, a contagem média a 25 °C por 5 dias foi de $1,3 \times 10^6$ e $1,6 \times 10^6$ UFC.cm⁻² respectivamente, caracterizando a formação de biofilme na superfície. No entanto, quando a temperatura de incubação foi de 4,5 °C, a contagem média observada foi de $5,1 \times 10^4$ UFC.cm⁻², evidenciando a influência da temperatura neste processo.

Em outra pesquisa, realizada por Caixeta (2008), foi observado à adesão, mas não a formação de biofilme, por *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* em cupons de aço inoxidável, imersos em leite desnatado reconstituído inoculado inicialmente com aproximadamente 10^5 UFC.mL⁻¹ de cada estirpe. As contagens médias destes micro-organismos a 7 °C por 10 dias, foram de 2,6 e 3,9 UFC.cm⁻² respectivamente.

2.4.3 Inativação de micro-organismos aderidos em superfícies utilizadas na indústria de alimentos

Os processos de limpeza e sanitização de superfícies de contato com alimentos tornam-se mais difíceis e menos eficientes em presença de micro-

organismos. Segundo Pompermayer e Gaylarde (2000), este pode ser considerado um problema potencial, principalmente em relação aos procedimentos de higienização de equipamentos que apresentam locais de difícil acesso aos compostos químicos, pois facilita o processo de adesão.

Após a formação do biofilme, os micro-organismos que se encontram em seu interior são protegidos da remoção quando expostos ao escoamento de líquidos e a alta turbulência, além da proteção a ação de agentes químicos, como os utilizados nos procedimentos de higienização (CLONTZ, 2008).

Hood e Zottola (1997) afirmaram que o desenvolvimento de células em biofilme pode promover a expressão de propriedades distintas às observadas para células plasmáticas, como o aumento da resistência aos sanitizantes.

Outro importante fator de proteção as células aderidas em relação a ação dos sanitizantes e aos estresses de ordem física como a ação mecânica, irradiações e variações de temperatura, é a capacidade de produção de exopolissacarídeos por algumas espécies bacterianas (POULSEN, 1999).

Segundo Meyer (2003), existem três estratégias para solucionar os problemas gerados pela formação dos biofilmes. O primeiro deles consiste na sanitização antes da sua formação, o segundo na sanitização após sua formação e o terceiro na utilização de materiais que não favoreçam a formação dos mesmos.

No entanto, Clontz (2008) concluiu que como a remoção dos biofilmes é extremamente difícil, a adoção de métodos preventivos sempre será a melhor opção. Estes métodos preventivos devem ter início desde o projeto da instalação da indústria e continuarem durante todas as etapas de produção.

Assim a seleção do sanitizante adequado é de grande importância, o que segundo Troller (1993) só é possível a partir do conhecimento dos sanitizantes disponíveis, bem como das suas funções, formas de uso, concentrações recomendadas e formas de atuação. A utilização incorreta dos sanitizantes, em concentrações inadequadas, pode promover a seleção de algumas espécies bacterianas resistentes (GRAM et al., 2007).

Os sanitizantes químicos mais utilizados no controle de micro-organismos presentes em superfícies utilizadas durante o processamento de alimentos são o ácido peracético, cloraminas orgânicas, clorexidina, compostos de amônia quaternária, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, iodóforos e o peróxido de hidrogênio (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

2.4.3.1 Ácido peracético, hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina

O ácido peracético é um sanitizante de amplo espectro de atividade antimicrobiana e por isso é utilizado em diversas indústrias, principalmente as de processamento de alimentos (ALASRI et al., 1992).

Sua formulação é composta por uma mistura estabilizada de ácido peracético, peróxido de hidrogênio e ácido acético. Segundo Kitis (2004), embora o peróxido de hidrogênio possa contribuir para a ação do sanitizante, o principal agente antimicrobiano presente na formulação é o ácido peracético, que apresenta atividade mesmo em baixas concentrações. Marques et al. (2007) afirmaram que sua alta eficiência pode ser atribuída à sua capacidade de oxidação do material celular.

Para Holah et al. (1990) o ácido peracético pode ser relatado, dentre os sanitizantes, como o mais efetivo contra biofilmes.

Marques et al. (2007) avaliaram a ação do dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético na inativação de biofilme formado por *Staphylococcus aureus*, e verificaram uma maior eficiência do ácido peracético.

Em outro estudo, realizado por Beltrame et al. (2012), o ácido peracético também foi considerado mais eficiente em relação a aos sanitizantes clorexidina, quaternário de amônio e ácidos orgânicos, na redução da contagem dos patógenos *E. coli*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, frequentemente encontrados na indústria de carnes.

Este sanitizante, na concentração de 120 mg. L⁻¹ também foi considerado efetivo por Andrade, Bridgeman e Zottola (1998), na redução da contagem de

biofilme de *Enterococcus faecium* isolado de leite cru, em aço inoxidável, sendo esta de aproximadamente 4,8 ciclos log, após 2 minutos de contato.

O hipoclorito de sódio é o sanitizante mais utilizado para garantir a qualidade microbiológica e aumentar a segurança e a vida útil de alimentos processados (SREBERNICH, 2007).

Sua utilização em larga escala está relacionada ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus, além do fato de ser um produto relativamente barato (EMMANUEL et al., 2004).

Quando em solução aquosa, o hipoclorito de sódio origina o ácido hipocloroso em sua forma não dissociada, sendo este o principal responsável pela ação antimicrobiana (TROLLER, 1993). Segundo Estrela et al. (2002), este sanitizante apresenta capacidade de destruição de fosfolipídios e formação de cloraminas, interferindo assim no metabolismo celular, além de promover reações de oxidação, que causam a inibição enzimática irreversível em bactérias e a degradação de lipídios e ácidos graxos.

Gândara e Oliveira (2000) observaram que os melhores resultados na remoção de biofilme em aço inoxidável, formado por *Streptococcus thermophilus* isolado de leite pasteurizado, foram obtidos a partir da utilização de hipoclorito de sódio após as etapas de limpeza alcalina e ácida.

Mosteller e Bishop (1993), observaram redução de 3,16; 3,19 e 2,08 logUFC.cm⁻² na contagem de *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente, aderidas em superfície de teflon, pela utilização do hipoclorito de sódio a 200 mg.L⁻¹.

Cabeça, Pizzolitto e Pizzolito (2006), avaliaram a ação de vários sanitizantes utilizados na indústria de alimentos, em relação a biofilme de *Listeria monocytogenes* em superfície de aço inoxidável, e observaram que o hipoclorito de sódio, na concentração de 150 mg.L⁻¹, foi o mais efetivo, promovendo reduções de 5,5 e 6,5 log.UFC⁻², após 28 e 48h, respectivamente.

A Clorexidina é um composto químico sintético pertencente ao grupo das bisbiguanidas, muito utilizado como antisséptico em clínica humana e veterinária, devido ao seu baixo potencial de toxicidade e irritabilidade (GERMANO;

GERMANO, 2003). Este sanitizante é mais utilizado na forma de digluconato, devido a sua alta solubilidade em água (THOMAS, et al., 2000).

O sanitizante digluconato de clorexina é utilizado na indústria de alimentos para redução da microbiota de manipuladores e para sanitização de equipamentos e utensílios, sendo também recomendado para o controle microbiológico de salmoura no processamento de queijos (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

O mecanismo de ação deste sanitizante consiste na rápida absorção pelas células bacterianas, resultando no rompimento da membrana celular e consequente perda de material intracelular como o potássio. Pode causar inibição respiratória e perda de ácido nucléico e coagulação citoplasmática, em razão da sua interação com proteínas citoplasmáticas (THOMAZ et al., 2000).

Segundo Tortora, Funke e Case (2012), este sanitizante possui um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e alguns vírus.

Litz et al. (2007), avaliaram a ação dos antissépticos triclosan, clorexidina e iodóforo na redução da contaminação por mesófilos aeróbios e *Staphylococcus* sp. em mãos de manipuladores na indústria de carnes. Os resultados demonstraram que somente a clorexidina, na concentração de 2%, foi eficaz em 30 segundos frente aos micro-organismos testados.

No entanto, a maioria das pesquisas envolvendo a ação deste sanitizante em relação a redução de biofilmes bacterianos são referentes a área odontológica. Segundo Fiorentino (2009), a clorexidina apresenta capacidade de controlar a formação de biofilme dental, e reduzir o risco de cárie e doença periodontal, devido a redução da população de *Streptococcus mutans* presente na cavidade bucal. Sanabe et al. (2010) observaram que a utilização de clorexidina a 1%, foi capaz de reduzir significativamente as contagens de biofilme formado por *Streptococcus mutans* na superfície de molares.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em avaliar a presença de bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* produtoras de enzimas proteolíticas e lipolíticas, em ambiente de processamento de leite e derivados, a possível formação de biofilmes mono e multi-espécies em superfície de aço inoxidável AISI 304 e ação de agentes sanitizantes sobre os mesmos.

Como objetivos específicos foram:

- ✓ Avaliar a presença e determinar a contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* em ambiente de processamento de leite e derivados;
- ✓ Avaliar a produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas por bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* isoladas de ambiente de processamento de leite UHT;
- ✓ Modelar a formação de biofilme por *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp. e pelo co-cultivo destes micro-organismos, avaliando a influência do tempo de contato e temperatura de exposição no processo.
- ✓ Avaliar a resistência dos micro-organismos após a formação de biofilmes em cultivos mono e multi-espécies submetidos a ação de sanitizantes frequentemente utilizados na indústria de alimentos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Higiene e Legislação do Departamento de Tecnologia de Alimentos, localizado na Faculdade de Engenharia de Alimentos e no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular, localizado no Instituto de Biologia, ambos pertencentes a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.1 Isolamento de bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas* em ambiente de indústria de processamento de produtos lácteos

4.1.1 Características da indústria

A indústria de laticínios avaliada nesta pesquisa encontra-se localizada na região central do Estado de São Paulo, sendo que toda a produção é realizada a partir de leite tipo A, o que a caracteriza como “granja leiteira”, já que a ordenha é feita na própria fazenda, não necessitando do transporte do leite.

Com capacidade para pasteurizar aproximadamente 5000 litros de leite por dia, a indústria também produz diariamente cerca de 1000 litros de iogurte, 100 quilos de queijo tipo minas e 100 quilos de queijo tipo prato.

4.1.2 Coleta das amostras

Durante o período de agosto a outubro de 2010, foram realizadas duas visitas a indústria de laticínios. As coletas tiveram início no período da manhã, às 7:00 horas, quando se iniciavam as atividades da indústria e término às 13 horas, após o processamento do queijo Minas Frescal, conforme descrito no Apêndice A.

Durante as duas visitas foram coletadas oito amostras de leite cru (aproximadamente 8L no total), seis de leite pasteurizado (aproximadamente 6L no total), seis de soro de queijo (aproximadamente 6L no total), seis de massa do queijo (aproximadamente 2,1kg no total), 20 de queijo Minas Frescal (aproximadamente 8,0Kg no total) e 114 do ambiente de processamento,

perfazendo um total de 160 amostras. O local de coleta das amostras pode ser visualizado a partir do croqui da planta de processamento de queijo Minas Frescal apresentado no Apêndice B.

Além das amostras obtidas na indústria avaliada, foram coletadas outras seis amostras de leite cru (aproximadamente 6L no total) de outras duas indústrias de laticínios, sendo três amostras de cada indústria.

As amostras foram transportadas refrigeradas até o Laboratório de Higiene e Legislação, onde foram acondicionadas a 4 °C até o momento da análise. Todas as análises, com exceção aos queijos destinados à avaliação no último dia do prazo de validade, tiveram início em no máximo 30 horas após a coleta.

4.1.2.1 Ar ambiente

As amostras de ar ambiente foram obtidas em diferentes pontos da indústria de laticínios. Na sala de produção do queijo tipo Minas, as coletas foram realizadas no início, meio e fim da produção. Além deste, também foram coletadas amostras do ambiente de ordenha, da sala de recepção do leite cru, da sala de pasteurização, da câmara fria para armazenamento dos queijos, e da sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C).

O método utilizado foi o de sedimentação, em que placas de petri (90mm de diâmetro e 15mm de altura) contendo meio de cultura são abertas e expostas ao ambiente de processamento por 15 minutos, conforme descrição da *American Public Health Association* - APHA (EVANCHO et al., 2001). Todas as coletas foram realizadas utilizando-se meio diferencial ágar KF *Streptococcus* (Difco, Sparks, EUA), acrescido de TCC a 1% (Cloreto de 2, 3, 5 Trifeniltetrazolio), meio seletivo ágar Cetremid (Difco, Sparks, EUA) e ágar para contagem padrão (PCA, Difco, Sparks, EUA), para quantificação de bactérias do gênero *Enterococcus*, *Pseudomonas* e contagem total, respectivamente. A incubação das placas foi realizada a 35 ± 1 °C por 48 ± 1 h.

No total foram coletadas 48 amostras de ar ambiente, nas duas visitas, sendo 16 amostras para cada meio de cultura utilizado.

4.1.2.2 Leite cru

As coletas foram realizadas na sala de recepção de leite cru, em dois tanques de aço inoxidável (Tanque de recepção 1 e Tanque de recepção 2). De cada tanque foram coletadas duas amostras por visita. Assim, no total foram obtidas oito amostras de leite cru Tipo A para análise, sendo quatro por coleta. As amostras foram denominadas de Leite Cru Tanque 1 e Leite Cru Tanque 2.

Além das amostras de leite da indústria avaliada (Leite Cru Tanque 1 e Leite Cru Tanque 2), foram coletadas amostras de leite cru refrigerado de outras duas indústrias de laticínios. Diferentemente da indústria avaliada, os leites coletados a partir destas duas indústrias não são classificados como leite cru refrigerado Tipo A integral. Estas amostras foram denominadas de Leite Cru 3 e Leite Cru 4.

Com auxílio de uma concha de aço inoxidável esterilizada, amostras de aproximadamente 1 L de leite cru foram coletadas e transferidas para bolsas plásticas esterilizadas com tarja de identificação (Nasco, Wisconsin, EUA), seguido de imediato acondicionamento em caixa com isolamento térmico contendo gelo para transporte até o laboratório.

4.1.2.3 Leite pasteurizado

As coletas do leite pasteurizado foram realizadas na sala de processamento de queijos. Três amostras de leite pasteurizado, bombeado em tubulação fechada diretamente do pasteurizador para tanque de queijo, foram obtidas em cada coleta, perfazendo um total de seis amostras para análise.

Com auxílio de uma concha de aço inoxidável esterilizada, amostras de aproximadamente 1 L de leite pasteurizado foram coletadas e transferidas para bolsas plásticas esterilizadas com tarja de identificação, seguido de imediato acondicionamento em caixa térmica com gelo para transporte até o laboratório. Durante as coletas foram realizadas medidas da temperatura do leite no tanque de queijo.

4.1.2.4 Massa do Queijo

As coletas foram realizadas na sala de processamento de queijos. Três amostras foram obtidas em cada coleta, perfazendo um total de seis amostras para análise.

Com auxílio de uma concha de aço inoxidável esterilizada, foram coletadas, por amostra, aproximadamente 350 g de massa de queijo antes da salga. A massa foi acondicionada em bolsas plásticas esterilizadas com tarja de identificação, seguido de imediato acondicionamento em caixa térmica com gelo para transporte até o laboratório.

4.1.2.5 Queijos

Foram coletadas em cada visita, 10 peças do mesmo lote, de aproximadamente 400g cada, de queijo Minas Frescal, embalado e armazenado refrigerado, totalizando 20 amostras para análise.

Estes foram transportados acondicionados em caixa térmica com gelo até o Laboratório. Cinco queijos foram analisados no mesmo dia de cada coleta, e os outros cinco no último dia do prazo de validade determinado na embalagem (15 dias). Os queijos analisados após 15 dias foram armazenados refrigerados a 4 °C.

4.1.2.6 Soro de queijo

Três amostras de soro de queijo foram coletadas em cada visita a indústria, totalizando seis amostras.

Com auxílio de uma concha de aço inoxidável esterilizada, aproximadamente 1 L de soro foi coletado, por amostra, e transferido para bolsas plásticas esterilizadas com tarja de identificação, seguido de imediato acondicionamento em caixa térmica com gelo para transporte até o laboratório.

4.1.2.7 Amostras de superfícies do ambiente de processamento

Noventa e oito amostras das superfícies de equipamentos, utensílios e instalações da indústria foram analisadas (Apêndice B). As coletas foram realizadas após os procedimentos rotineiros de higienização.

Em decorrência das características das superfícies avaliadas, foram utilizados dois métodos de coleta. No primeiro, “contato direto por esponja”, uma esponja esterilizada de celulose (Nasco, Wisconsin, USA) pré-umidecida em 20 mL de água peptonada a 0,1% contendo 0,5% de neutralizante tiosulfato de sódio, foi friccionada, com auxílio de luvas plásticas esterilizadas, na superfície alvo, exercendo-se uma pressão de arraste, de acordo com a recomendação da APHA (EVANCHO et al., 2001). O segundo método, “técnica de *swab*”, consistiu na pressão e movimentos da esquerda para a direita e depois de baixo para cima, girando o *swab* continuamente para que toda a área do algodão entrasse em contato com a superfície a ser avaliada. Os *swabs* foram, então, imersos em tubos plásticos esterilizados contendo 10 mL de água peptonada a 0,1% e 0,5% de neutralizante tiosulfato de sódio de acordo com o APHA (EVANCHO et al., 2001).

As áreas foram delimitadas utilizando-se moldes descartáveis esterilizados de 50 ou 100cm² em função da configuração dos equipamentos e utensílios.

As amostras foram acondicionadas em caixa térmica com gelo para transporte até o Laboratório de Higiene e Legislação.

- **Mesa de aço inoxidável**

Foram coletadas amostras da superfície da mesa em aço inoxidável (FIGURA 8) localizada na sala de processamento de queijos. Foi utilizado o método de contato direto por esponja com área de 100 cm². Nestas duas visitas, foram coletadas um total de quatro amostras desta superfície.

- **Estante**

Para a coleta de amostras da estante de polipropileno (FIGURA 9) localizada na câmara fria, foi utilizado o método de contato direto por esponja com

área de 100 cm². Nestas das duas visitas, foram coletadas um total de duas amostras desta superfície.

- **Seladora à vácuo**

Para coleta de amostras da superfície da Seladora à vácuo (FIGURA 10), localizada dentro da sala de processamento de queijos, foi utilizado o método de contato direto por esponja com área de 50 cm². Nestas duas visitas foram coletadas um total de duas amostras desta superfície.

- **Equipamento de ordenha**

Utilizando-se a técnica do *swab*, foram coletadas amostras da superfície do bocal da teteira do equipamento de ordenha (FIGURA 11). Esta técnica permitiu atingir toda a área do bocal. Nestas duas visitas foram coletadas um total de duas amostras desta superfície.

- **Maçaneta**

Foram coletadas amostras da superfície das maçanetas (FIGURA 12) localizadas na sala de processamento de queijos, câmara fria e sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C). Foi utilizado o método de contato direto por esponja, sendo amostrada toda a área da maçaneta. Nestas duas visitas foram coletadas um total de seis amostras destas superfícies, sendo duas de cada ambiente.

- **Mangueira**

Utilizando-se o método de contato direto por esponja, foram coletadas amostras da superfície interna da mangueira (FIGURA 13) conectada ao equipamento de bombeamento de leite. Neste caso a área amostrada foi de 93,5 cm², determinada pelo diâmetro da mangueira e distância alcançada. Ao final das duas visitas foram coletadas duas amostras desta superfície.

- **Mãos de manipuladores**

Foram coletadas amostras das mãos de dois manipuladores envolvidos no processamento dos queijos, sendo um do sexo masculino e um do sexo feminino. As coletas foram realizadas utilizando-se a técnica do *swab*. Nas duas visitas, as amostras foram coletadas dos mesmos manipuladores, perfazendo um total de quatro amostras.

- **Pisos e paredes**

Amostras de pisos (FIGURA 14) e paredes (FIGURA 15) foram coletadas em diferentes locais da indústria de laticínios: no ambiente de ordenha, sala de recepção do leite cru, sala de pasteurização, sala de processamento de queijos, câmara fria para armazenamento dos queijos e sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C). Foi utilizado o método de contato direto por esponja com área de 100 cm² por amostra. Nas duas visitas, foram coletadas um total de 24 amostras de cada tipo de superfície, totalizando 48 amostras.

- **Ralo**

Foram coletadas amostras das superfícies internas e externas (grades) dos ralos (FIGURA 16) pertencentes à sala de processamento de queijos e sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C). Para isso foi utilizado o método de contato direto por esponja com área de 100 cm². Nas duas visitas foram coletadas um total de quatro amostras de cada superfície, totalizando oito amostras.

- **Rodo**

Para coleta de amostras da superfície do rodo (FIGURA 17), localizado na sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C), e utilizado para limpeza da sala de processamento de queijos, foi utilizado o método de contato direto por esponja com área de 50 cm². Nas duas visitas foram coletadas um total de duas amostras desta superfície.

- **Tanque de processamento de queijo**

Amostras da superfície do tanque de processamento dos queijos (FIGURA 18) foram coletadas em dois diferentes pontos, na superfície interna do tanque e no dreno de saída do soro. O método utilizado para os dois pontos foi o de contato direto por esponja. A área amostrada na superfície interna do tanque foi de 100 cm² e na superfície do dreno de saída do soro de 93,5 cm², determinada pelo diâmetro do orifício e distância alcançada. Nas duas visitas a indústria foram coletadas um total de quatro amostras deste tanque de processamento.

- **Tanque de recepção do leite cru**

Foram coletadas amostras das superfícies internas dos dois tanques de recepção do leite cru (FIGURA 19), localizados na sala de recepção do leite cru. O método utilizado foi o de contato direto por esponja com área de 100 cm². Nas duas visitas foram coletadas um total de quatro amostras de cada tanque, totalizando oito amostras.

- **Utensílios utilizados no processamento do queijo tipo Minas**

- o **Fôrmas para queijo tipo minas**

Toda a área interna de uma fôrma de polietileno (FIGURA 20), com capacidade para 0,5kg, utilizada no processamento de queijo Minas foi amostrada. Para isto, foi utilizado o método de contato direto por esponja, sendo coletadas um total de duas amostras nas duas visitas a indústria.

- o **Lira para corte da massa de queijo**

Utilizando-se o método de contato direto por esponja, foram coletadas amostras da superfície de duas liras (horizontal e vertical) (FIGURA 21), fabricadas em aço inoxidável, utilizadas para cortar a massa dos queijos. A área amostrada foi de 100 cm². Nas duas visitas a indústria foram coletadas um total de duas amostras de cada lira, perfazendo quatro amostras.

o Mexedor de leite

Utilizando-se o método de contato direto por esponja, foram coletadas amostras da superfície do mexedor de leite (FIGURA 22), fabricado em aço inoxidável. Foi amostrada toda a área do disco do mexedor e nas duas visitas foram coletadas um total de duas amostras desta superfície.

o Termômetro

Para coleta de amostras da superfície do termômetro (FIGURA 23) utilizado durante o processamento do queijo foi utilizado o método de contato direto por esponja, que permitiu amostrar toda a área do termômetro. Nas duas visitas a indústria, o mesmo termômetro foi utilizado, sendo, portanto coletadas um total de duas amostras desta superfície.

4.2 Análise das amostras coletadas

4.2.1 Contagem de bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas*

Para contagem das bactérias do gênero *Enterococcus* foi utilizado meio diferencial ágar KF *Streptococcus*, acrescido de TCC a 1% (Cloreto de 2, 3, 5 Trifeniltetrazolio). Foi realizado o plaqueamento por profundidade, seguido de incubação a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas para inibir possíveis micro-organismos acompanhantes (HARTMAN; DEIBEL; SIEVERDING, 2001).

A contagem de colônias foi realizada considerando-se as características morfológicas esperadas e confirmadas pelos testes: presença de colônias vermelhas pela redução de TTC a formazan, rodeadas por halo amarelo devido à formação de ácido detectado pelo indicador bromocresol púrpura. As colônias foram comparadas as obtidas pelo plaqueamento nas mesmas condições das culturas de *Enterococcus faecium* ATCC 6569 e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080.

Para contagem das bactérias do gênero *Pseudomonas* foi utilizado meio seletivo ágar Cetremid. Após o plaqueamento por profundidade, as placas foram incubadas a 28 ± 1 °C por 48 horas (BROWN; LOWBURY, 1965).

A contagem de colônias foi realizada considerando-se as características de formação de pigmentação fluorescente. As colônias foram comparadas as obtidas pelo plaqueamento nas mesmas condições da cultura de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525.

4.2.2 Preparo e plaqueamento das amostras

- **Leite cru, leite pasteurizado e soro de queijo**

Após a homogeneização das amostras coletadas, foram realizadas sucessivas diluições em tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1%, seguido de plaqueamento por profundidade para contagem de mesófilos aeróbios em ágar padrão para contagens (PCA) e em meios de cultura específicos, conforme descrito no item 4.2.1, para contagem das bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas*. Para a contagem total as placas foram incubadas a 35 °C/48 horas.

- **Massa do queijo e queijos**

O preparo das amostras de massa do queijo e dos queijos foi realizado de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (MIDURA; BRYANT, 2001).

Vinte e cinco gramas de cada amostra foram pesados, diluídos em 225 mL de solução esterilizada de água peptonada a 0,1%, acondicionados em bolsas plásticas esterilizadas com tarja de identificação, e homogeneizados em homogeneizador tipo “Stomacher” (Lab-Blender 400, Seward Medical, Londres, Inglaterra). Sucessivas diluições decimais foram preparadas em solução de água peptonada 0,1% e plaqueadas para contagem de mesófilos aeróbios em PCA e em meios de cultura específicos, conforme descrito no item 4.2.1, para contagem das bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas*. As placas destinadas a contagem total foram incubadas a 35 °C/48 horas.

- **Amostras de superfícies do ambiente de processamento**

As esponjas acondicionadas nas bolsas plásticas esterilizadas e umedecidas com 20 mL da solução esterilizada composta por água peptonada a 0,1% e neutralizante tiosulfato de sódio a 0,5%, foram homogeneizadas em homogeneizador tipo “Stomacher” por dois minutos. Os “swabs” acondicionados em tubos plásticos esterilizados contendo 10 mL da solução esterilizada composta por água peptonada a 0,1% e neutralizante tiosulfato de sódio a 0,5%, foram homogeneizados no vórtex (Fanem Modelo 251, velocidade 10) por um minuto.

Nos dois métodos, sucessivas diluições foram realizadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% seguido de plaqueamento em PCA para contagem de mesófilos aeróbios e em meios de cultura específicos, conforme descrito no item 4.2.1, para contagem das bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas*. Para a contagem total as placas foram incubadas a 35 °C/48 horas.

4.2.3 Isolamento, confirmação e identificação de bactérias do gênero *Enterococcus*

Após o plaqueamento em meio de cultura específico, conforme descrito no item 4.2.1, colônias típicas de cada placa foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco, Sparks, EUA), incubadas a 35 °C por 24 horas, e posteriormente submetidas aos testes de confirmação: coloração de Gram, catalase, capacidade de crescimento em ágar Bile Esculina, em BHI contendo NaCl 6,5%, em BHI com pH 9,6 e em BHI incubado a 10 °C (HARTMAN; DEIBEL; SIEVERDING, 2001).

Após a confirmação as culturas foram ativadas por duas vezes consecutivas em caldo BHI a 35 ± 1 °C por 24 horas, e mantidas a -80 °C neste mesmo meio em microtubos (Eppendorf) de 1,5mL contendo 10% de glicerol.

A identificação em espécie das colônias selecionadas e confirmadas foi realizada através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para as espécies de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*.

4.2.3.1 Identificação das espécies de *Enterococcus* pela técnica da PCR

- **Extração do DNA**

Para extração do DNA, microtubos (Eppendorf) contendo 600 µL da cultura ativada em caldo BHI (35°C por 24 horas), foram submetidos à centrifugação a 13.000 xg por 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5415D). O sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspensos em 95 µL de tampão PCR 1X (10 mM de tris-HCl, 50 mM de KCl) (Invitrogen Life Technologies, EUA). Em seguida, aos microtubos, foram adicionados 4 µL de lisozima (50 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Alemanha) com manutenção a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esta etapa, foi adicionado 1 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA) seguido de incubação em banho de água a 60 °C por 60 minutos, e tratamento final a 95 °C por 8 minutos (FURRER et al., 1991). O DNA de cada isolado foi armazenado a -20 °C até a avaliação pela técnica da PCR.

- **Reação em cadeia da polimerase – PCR**

Para identificação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, os *primers* foram sintetizados de acordo com Dutka-Malen, Evers e Courvalin (1995), conforme descrito na Tabela 2. O volume total utilizado para cada reação foi de 25 µL, contendo: 1,0 µL do DNA extraído, 0,2 µM de cada *primer*, 1X de tampão PCR (10 mM de tris-HCl, 50 mM de KCl), 2,0 mM de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, EUA), e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA). A amplificação do DNA, realizada em termociclador (Eppendorf 5345), seguindo as seguintes etapas: etapa inicial a 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 54 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto, e etapa final a 72 °C por 10 minutos (DUTKA-MALEN; EVERS; COURVALIN, 1995). As cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 e *Enterococcus faecium* ATCC 6569 foram utilizadas como controle positivo para a reação.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado por 20 minutos em Sybr Safe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA). Cada gel foi adicionado de marcador de peso molecular (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lituânia) para referência.

Tabela 2. Descrição dos *primers* utilizados para identificação das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*

Espécie	Gene amplificado	Primer	Sequencia dos <i>primers</i> (5' – 3')	Produto (pb)
<i>E. faecalis</i>	<i>ddl_{E.faecalis}</i>	Fk1	ATCAAGTACAGTTAGTCT	941
		Fk2	ACGATTCAAAGCTAACTG	
<i>E. faecium</i>	<i>ddl_{E.faecium}</i>	Fae1	GCAAGGCTTCTTAGAGA	550
		Fae2	CATCGTGTAAGCTAACTTC	

Fonte: Dutka-Malen, Evers e Courvalin (1995)

4.2.4 Isolamento, confirmação e identificação de bactérias do gênero *Pseudomonas*

Após o plaqueamento em meio de cultura específico, conforme descrito no item 4.2.1, colônias típicas de cada placa foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para Caldo BHI, incubadas a 28 ± 1 °C por 24 horas, e posteriormente submetidas aos testes: coloração de Gram, catalase e oxidase. O teste de oxidase foi realizado utilizando-se tiras para teste de oxidase (Laborclin, Pinhais, Brasil).

Após a confirmação as culturas foram ativadas por duas vezes consecutivas em caldo BHI a 28 ± 1 °C por 24 horas, e mantidas a -80 °C neste mesmo meio em microtubos (Eppendorf) de 1,5mL contendo 10% de glicerol.

A identificação em espécie das colônias selecionadas e confirmadas foi realizada através da técnica da PCR para as espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2.4.1 Identificação das espécies de *Pseudomonas* pela técnica da PCR

- **Extração do DNA**

Para extração do DNA, microtubos (Eppendorf) contendo 600 µL da cultura ativada em caldo BHI (35°C por 24 horas), foram submetidos à centrifugação a 13.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os pellets ressuspensos em 95 µL de tampão PCR 1X (10 mM de tris-HCl, 50 mM de KCl). Em seguida, aos microtubos, foram adicionados 4 µL de lisozima (50 mg/mL) com manutenção a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esta etapa, foi adicionado 1 µL de proteinase K (20 mg/mL) seguido de incubação em banho de água a 60 °C por 60 minutos, e tratamento final a 95 °C por 8 minutos (FURRER et al., 1991). O DNA de cada isolado foi armazenado a -20 °C até a avaliação pela técnica da PCR.

- **Reação em cadeia da polimerase – PCR**

Para identificação das espécies *P.fluorescens* e *P. aeruginosa*, os *primers* foram sintetizados de acordo com, Scarpellini, Franzetti e Galli (2004), e Spilker et al. (2004), respectivamente, conforme descrito na Tabela 3. O volume total utilizado para cada reação foi de 25 µL, sendo: 2,5 µL do DNA extraído, 0,2 µM de cada *primer*, 1X de tampão PCR (10X), 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e 1 U de Taq DNA polimerase.

A amplificação do DNA, seguiu as seguintes etapas para *P.fluorescens*: etapa inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos, e etapa final a 72 °C por 2 minutos (SCARPELLINI; FRANZETTI; GALLI, 2004). Para *P. aeruginosa* as etapas foram: etapa inicial a 95 °C por 2 minutos, 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 segundos, anelamento a 58 °C por 20 segundos, extensão a 72 °C por 40 segundos, e etapa final a 72 °C por 1 minuto (SPILKER et al., 2004). As cepas de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502 foram utilizadas como controle positivo para a reação.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado por 20 minutos em Sybr Safe. Cada gel foi adicionado de marcador de peso molecular (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lituânia) para referência.

Tabela 3. Descrição dos *primers* utilizados para identificação das espécies *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*

Espécie	Amplificação	Primer	Sequencia dos primers (5' – 3')	Produto (pb)
<i>P. fluorescens</i>	RNAr 16S	16SF	TGCATTCAAACTGACTG	850
		16SR	AATCACACCGTGGTAACCG	
<i>P. aeruginosa</i>	RNAr 16S	PA-SS-F	GGGGGATCTTCGGACCTCA	956
		PA-SS-R	TCCTTAGAGTGCCCCACCCG	

Fonte: ¹ SCARPELLINI; FRANZETTI; GALLI (2004); ² SPILKER et al. (2004).

4.3 Influência do tempo e temperatura de armazenamento no desenvolvimento de mesófilos aeróbios e bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* no leite cru

A avaliação do efeito do tempo e temperatura de armazenamento no desenvolvimento de mesófilos aeróbios e bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* no leite cru foi realizada a partir da análise de quatro amostras: Leite Cru Tanque 1, Leite Cru Tanque 2, Leite Cru 3 e Leite Cru 4.

Cada uma das quatro diferentes amostras de leite coletadas, foi dividida assepticamente em porções e estas foram acondicionadas em tubos esterilizados com capacidade para aproximadamente 20 mL. Os tubos foram armazenados em três diferentes temperaturas: 4, 7 e 10 °C.

As amostras foram analisadas quanto a contagem de mesófilos aeróbios, a partir do plaqueamento por profundidade em PCA, seguido de incubação a 35°C/48h, e quanto a contagem de *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp., conforme metodologia descrita no item 4.2.1. As análises foram realizadas imediatamente após a obtenção (tempo zero) das amostras e após 2, 4 e 8 dias de armazenamento. Todas as análises foram realizadas em três repetições.

4.4 Avaliação da capacidade proteolítica das bactérias isoladas

As bactérias identificadas (itens 4.2.3 e 4.2.4) foram avaliadas quanto à produção de enzimas proteolíticas de acordo com metodologia recomendada por Hartman, Deibel e Sieverding (2001).

As culturas pertencentes ao gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas*, reativadas em caldo BHI (35 °C por 24 horas e 28 °C por 24 horas, respectivamente), foram estriadas em placas contendo ágar para contagem padrão (PCA) acrescido de 1% de leite desnatado reconstituído, e incubadas a 28 °C por 72 horas e 28 °C por 72 horas, respectivamente.

A confirmação do resultado positivo foi obtida pela formação de um halo translúcido ao redor das colônias após a adição de 0,2 mL de ácido acético a 10% por 1 minuto. A cepa de *Bacillus cereus* NCTC 1143 foi utilizada como controle positivo.

4.5 Avaliação da capacidade lipolítica das bactérias isoladas

As bactérias identificadas (itens 4.2.3 e 4.2.4) foram avaliadas quanto à produção de enzimas lipolíticas de acordo com metodologia recomendada por Frank e Yousef (2004).

As culturas pertencentes ao gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas*, reativadas em caldo BHI (35 °C por 24 horas e 28 °C por 24 horas, respectivamente), foram estriadas em superfície de Ágar *Spirit Blue* (Difco, Sparks, EUA) acrescido de reagente lipase (Difco, Sparks, EUA), seguido de incubação a 32 ± 1 °C por 48 ± 3 horas.

A formação de um halo de cor clara e/ou uma intensa cor azul ao redor da colônia caracterizou a produção de enzimas lipolíticas. A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6539 foi utilizada como controle positivo.

4.6 Avaliação da formação de biofilmes

4.6.1 Preparo de cupons de aço inoxidável

Para avaliar a formação de biofilme bacteriano foram adquiridas chapas de aço inoxidável AISI 304 (*American Iron and Steel Institute*), acabamento número 4, nas dimensões de 1,0 m x 1,2 m x 0,1 cm (Açomedi Aços Ltda, Barueri, Brasil). A chapa foi transportada recoberta por plástico bolha, de forma a evitar danos ao material. Esta superfície foi selecionada por ser amplamente utilizada na construção de equipamentos, bancadas e utensílios das indústrias de alimentos em geral.

A chapa foi cortada em cupons de 1 cm x 1 cm x 0,1 cm e perfurada em um dos vértices (1 mm de diâmetro), em cortador e perfurador especial para permitir a uniformidade do material. Estes procedimentos foram realizados pelo Centro de Tecnologia da Unicamp.

A determinação da rugosidade do material também foi realizada pelo Centro de Tecnologia da Unicamp, Laboratório de Metrologia, utilizando-se rugosímetro (modelo S8P, Perthen, Mahr, Alemanha). O resultado para a análise de rugosidade, obtido a partir de uma média de nove medições a temperatura de 20 ± 1 °C, foi de $0,366\mu\text{m}$ (ROSADO, 2009).

Para manter os cupons suspensos e imersos no leite durante os ensaios de avaliação da formação dos biofilmes bacterianos, foram utilizados fios de poliamida (Nylon®), de 0,2 mm de diâmetro. Os fios foram cortados em diferentes tamanhos para manter os cupons imersos e dispostos, alternadamente, em diferentes profundidades (MACHADO, 2006).

Antes de cada ensaio os cupons foram submetidos aos procedimentos de higienização, adaptados de Parizzi (2004), conforme descrito a seguir:

- Limpeza com auxílio de esponja de poliuretano, água destilada e detergente neutro líquido;
- Enxague com água destilada;
- Passagem do fio de poliamida pelo orifício do cupom;

- Imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 1 hora à temperatura ambiente, visando à remoção da gordura;
- Enxague com água destilada;
- Secagem ao ar;
- Fixação do fio poliamida com fita adesiva, na parte externa de frasco (100 mL) para reagente em vidro borosilicato com tampa rosqueada (Schott, Indaiatuba, Brasil), para suspensão dos cupons no frasco, conforme apresentado na Figura 24;
- Esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos.



Figura 24. Frasco contendo os cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, suspensos por fios de poliamida.

4.6.2 Determinação da formação do biofilme bacteriano

Para avaliação da formação de biofilme bacteriano por bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas*, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para dois fatores (tempo de contato e temperatura de exposição) de acordo com a metodologia proposta por Rodrigues e lemma (2005).

Foram realizadas três repetições de cada ensaio, nas temperaturas de 7; 13; 27; 41 e 47 °C e nos tempos de contato de 0; 1,2; 4; 6,8; e 8 dias. As temperaturas tiveram variação de ± 1 °C, e os tempos de ± 1 hora, com exceção ao tempo zero que corresponde ao ensaio realizado imediatamente após a imersão dos cupons no frasco contendo o leite e a suspensão bacteriana. Foram quantificadas as unidades formadoras de colônias por cm^2 (UFC. cm^{-2}).

A Tabela 4 apresenta a relação entre temperatura e tempo de contato para os ensaios. As respostas (UFC. cm^{-2}) foram ajustadas por regressão utilizando o modelo polinomial quadrático ($\log \text{UFC}.\text{cm}^{-2} = b_0 + b_1T + b_2 T^2 + b_3t + b_4t^2 + b_5Tt$), em que b_0 até b_5 são os coeficientes do modelo, T é temperatura e t é o tempo de contato.

Tabela 4. Delineamento composto central rotacional para relação entre as variáveis temperatura de exposição e tempo de contato

Ensaio	Variável 1	Variável 2	Temperatura (°C)	Tempo (dias)
1	-1	-1	13	1,2
2	-1	+1	13	6,8
3	+1	-1	41	1,2
4	+1	+1	41	6,8
5	-1,41	0	7	4
6	+1,41	0	47	4
7	0	-1,41	27	0
8	0	+1,41	27	8
9	0	0	27	4
10	0	0	27	4
11	0	0	27	4

Variável 1 : Temperatura de exposição

Variável 2: Tempo de contato

-1: Nível inferior

0: Ponto central

+1: Nível superior

-1,41 e +1,41: Pontos axiais

A menor temperatura utilizada foi 7 °C, devido ao fato das bactérias avaliadas serem classificadas como psicrófilas, e portanto, capazes de crescer a temperaturas de refrigeração. A temperatura central deve ser aquela que pela literatura, certamente haverá o crescimento do micro-organismo e a maior temperatura foi estabelecida de acordo a faixa de crescimento dos mesmos. Em relação aos tempos de contato, o tempo zero foi determinado como um controle, variando até oito dias por se tratar da avaliação da formação de um biofilme.

A partir do delineamento apresentado na Tabela 4 foram realizados cinco experimentos para avaliação da formação de biofilmes bacterianos na superfície de aço inoxidável. O primeiro para avaliação da formação de biofilme apenas por *Enterococcus faecium* (experimento 1), o segundo por *Enterococcus faecalis* (experimento 2), o terceiro por *Pseudomonas fluorescens* (experimento 3), o quarto por *Pseudomonas aeruginosa* (experimento 4) e o quinto experimento para avaliação da formação de biofilme multi-espécie (experimento 5), pela junção de todas as espécies avaliadas nos experimentos anteriores.

As suspensões bacterianas utilizadas nas análises descritas acima, foram selecionadas a partir do local ao qual foram isoladas (item 4.1) e dos resultados positivos para os itens 4.4 e 4.5, referentes à caracterização da produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas. Assim as suspensões utilizadas nos experimentos 1, 2, 3 e 4 foram compostas por cinco isolados cada, e a utilizada no experimento 5 por 20 isolados, já que foi obtida pela junção de todos os isolados utilizados nos experimentos anteriores. A origem de cada cepa é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Origem das cepas das bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* utilizadas na avaliação da formação de biofilme bacteriano

Experimento	Codificação	Espécie bacteriana	Origem
1	E42	<i>E. faecium</i>	Maçaneta da câmara fria
	E84	<i>E. faecium</i>	Leite cru tanque pequeno
	E106	<i>E. faecium</i>	Piso da sala de queijos
	E113	<i>E. faecium</i>	Maçaneta da sala de queijos
	E120	<i>E. faecium</i>	Piso da sala de ordena
2	E2	<i>E. faecalis</i>	Leite cru tanque grande
	E15	<i>E. faecalis</i>	Queijo
	E40	<i>E. faecalis</i>	Termômetro
	E110	<i>E. faecalis</i>	Maçaneta da sala de queijos
	E94	<i>E. faecalis</i>	Equipamento de ordenha
3	P7	<i>P. fluorescens</i>	Leite cru tanque pequeno
	P11	<i>P. fluorescens</i>	Queijo
	P27	<i>P. fluorescens</i>	Maçaneta da câmara fria
	P117	<i>P. fluorescens</i>	Piso da sala de queijos
	P82	<i>P. fluorescens</i>	Equipamento de ordenha
4	P6	<i>P. aeruginosa</i>	Leite cru tanque pequeno
	P81	<i>P. aeruginosa</i>	Equipamento de ordenha
	P91	<i>P. aeruginosa</i>	Piso da sala de pasteurização
	P98	<i>P. aeruginosa</i>	Ralo da sala de queijos
	P115	<i>P. aeruginosa</i>	Piso da sala de queijos

Para avaliação da formação dos biofilmes em cada experimento, após a esterilização e preparo dos cupons teste, conforme descrito no item 4.6.1, os frascos foram adicionados de 100 mL de leite UHT (Jussara, Franca, Brasil) inoculado com a suspensão dos micro-organismos avaliados (TABELA 5).

O leite UHT foi previamente avaliado quanto à contagem de aeróbios, em PCA com incubação a 30 ± 1 °C por 72 ± 3 horas (LAIRD, et al., 2004). Para avaliação da presença de esporos o leite foi submetido a 80 ± 1 °C por 12 minutos, seguido de plaqueamento em PCA e incubação a 32 ± 1 °C por 48 horas, de acordo com a metodologia proposta por Frank e Yousef (2004).

O inóculo inicial adicionado ao leite UHT, foi determinado a partir da contagem obtida na análise do leite cru para cada micro-organismo (item 4.2).

Para padronização do inóculo inicial, cada cepa utilizada foi ativada individualmente em caldo BHI, e foram realizadas contagens após 24 e 48 horas. As cepas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram incubadas a 28°C e as pertencentes ao gênero *Enterococcus* a 35°C. As contagens foram realizadas pelo plaqueamento por profundidade em PCA, seguido de incubação a 35°C/48h. A partir destas contagens foram determinadas as diluições a serem realizadas para inoculação do leite UHT em cada experimento.

Em todos os ensaios, imediatamente após a inoculação da cultura a ser avaliada, foi realizada a contagem do leite UHT, como forma de controle. O plaqueamento foi realizado em PCA com incubação a 35 ± 1 °C por 48 ± 1 hora.

A cada 48 horas de contato os cupons incubados foram imersos em um novo leite inoculado com a mesma contagem utilizada inicialmente, para manter a população no meio. A contagem deste leite descartado foi realizada com o objetivo de comparação da população presente no leite após 48 horas de incubação e a aderida aos cupons de aço inoxidável. Para o leite descartado de acordo com os experimentos 1 e 2, 3 e 4 a contagem foi realizada utilizando-se como meio de cultura o PCA, pois estes eram compostos por isolados do mesmo gênero. No experimento 5 foram realizadas a contagem total em PCA, a contagem de *Enterococcus* sp. em ágar KF *Streptococcus* e de *Pseudomonas* sp. em ágar Cetremid. Para todos os experimentos a incubação das placas foi realizada a 35 ± 1 °C por 48 ± 1 h.

4.6.2.1 Determinação do número de células aderidas

A avaliação da adesão e formação de biofilme foi realizada pela técnica de contagem padrão em placas (CPP) para todos os experimentos. Depois de incubados nos tempos e temperaturas determinados, dois cupons foram retirados do leite, para que cada repetição fosse realizada em duplicata, e imersos individualmente em tubos contendo 10 mL de solução peptonada esterilizada a 0,1% por um minuto, sem agitação, visando à remoção de células planctônicas. Em seguida, cada cupom foi imerso em 5 mL da mesma solução e submetidos a vórtex (Fanem Modelo 251, velocidade 10) por dois minutos para remoção das

células sésseis e realização das diluições para plaqueamento por profundidade (ANDRADE; AJÃO; ZOTTOLA, 1998). O mesmo procedimento foi realizado sem a adição do inóculo no meio, como forma de controle.

A avaliação das células aderidas nos experimentos 1 e 2, 3 e 4 foi realizada utilizando-se como meio de cultura o PCA, pois estes eram compostos por isolados do mesmo gênero. No experimento 5 foram realizadas a contagem total em PCA, a contagem de *Enterococcus* sp. em ágar KF *Streptococcus* e de *Pseudomonas* sp. em ágar Cetremid. Para todos os experimentos a incubação das placas foi realizada a 35 ± 1 °C por 48 ± 1 h.

4.6.2.2 Análise estatística dos resultados

A análise dos resultados foi avaliada utilizando-se o modelo polinomial quadrático ($\log \text{UFC.cm}^{-2} = b_0 + b_1T + b_2 T^2 + b_3t + b_4t^2 + b_5Tt$), em que b_0 até b_5 são os coeficientes do modelo e T é temperatura e t é o tempo (RODRIGUES, IEMMA, 2005).

4.6.2.3 Verificação experimental do modelo encontrado

Para verificação dos modelos encontrados nos cinco experimentos (item 4.6.2), foram conduzidos ensaios experimentais em três repetições, em condições não avaliadas anteriormente, como forma de testar a eficiência do modelo.

Para isso foram realizados os mesmos procedimentos de preparo e incubação dos cupons teste (item 4.6.2), em diferentes tempos e temperaturas utilizados anteriormente no DCCR, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Experimentos para validação dos modelos propostos na avaliação da formação de biofilmes por *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e pela junção destas espécies

Experimento	Isolados	Tempo (dias)	Temperatura (°C)
1	<i>E. faecium</i>	2	22
			47
		3	25
2	<i>E. faecalis</i>	2	22
			47
		3	25
3	<i>P. fluorescens</i>	2	22
			47
		3	25
4	<i>P. aeruginosa</i>	2	22
			47
		3	25
5	<i>E. faecium</i> + <i>E. faecalis</i> + <i>P. fluorescens</i> + <i>P. aeruginosa</i>	2	22
			47
		3	25

A determinação do número de células aderidas foi realizada de acordo com o item 4.6.2.1.

4.7 Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliação visual da formação de biofilme bacteriano nos cinco delineamentos, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, visando verificar a formação do biofilme bacteriano e a topografia da superfície. Foram escolhidas as combinações de tempo e temperatura de 27 °C e 37 °C por 48 horas, para todos os experimentos.

Os cupons-teste de cada experimento foram incubados de acordo com a metodologia descrita no item 4.6.2. Após a formação do biofilme, foram imersos em tampão fosfato 0,1M para rinsagem do meio de cultura e remoção das células

planctônicas. A fixação foi realizada utilizando-se glutaraldeído 2% em solução de tampão fostato 0,1M, com imersão dos cupons por 3 horas. Para desidratação utilizou-se álcool etílico PA em ordem crescente das concentrações de 30, 50, 70, 80, 95%, por 10 minutos de contato em cada, e 100% em três repetições por 10 minutos cada, para retirada completa da água. Os cupons foram transferidos para cestas permeáveis e submetidos à secagem em Secador de Ponto Crítico ("Critical Point Dryer", CPD 030, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) com utilização de gás carbônico para retirada completa do álcool utilizado na etapa de desidratação. Após esta etapa, os cupons foram metalizados em Metalizador (SCD 050 Sputter Coater, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein), com fina camada de ouro por 180 segundos, com a finalidade de torná-los bons condutores elétricos, de forma a melhorar sua visualização.

A avaliação visual dos cupons foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM – 5800 LV), utilizando-se vários aumentos que variaram de 800 a 8000 vezes.

Para verificação da topografia da superfície, o procedimento de preparo das amostras teve início na etapa de metalização.

A microscopia eletrônica de varredura também foi utilizada na avaliação da metodologia utilizada nesta pesquisa para remoção das células sésseis dos cupons de aço inoxidável. Após a formação do biofilme bacteriano, como descrito acima, os cupons foram imersos individualmente em tubos contendo 10 mL de solução peptonada esterilizada 0,1% por um minuto, sem agitação, visando à remoção de células planctônicas. Em seguida, cada cupom foi imerso em 5 mL da mesma solução e submetidos a vórtex por dois minutos para remoção das células sésseis. Após esta etapa, os cupons foram submetidos a procedimentos idênticos aos realizados para avaliação microscópica da formação do biofilme bacteriano.

4.8 Avaliação da eficiência de diferentes sanitizantes em relação ao biofilme formado

Para avaliar a eficiência de sanitizantes em relação aos biofilmes formados nos cinco experimentos, foram utilizadas as soluções de hipoclorito de sódio a 100 mg.L⁻¹ de Cloro Residual Total (CRT), pH=9,4 (Super Cândida, Indústria Anhembí S.A., Osasco, Brasil), ácido peracético a 300 mg.L⁻¹, pH=2,8 (Divosan Forte, Johnson Diversey, Sintra, Portugal) e digluconato de clorexidina a 400 mg.L⁻¹, pH=6,4 (Neobiodine, Neobrax Ltda, Barretos, Brasil).

A solução clorada foi preparada e analisada de acordo com a metodologia da American Public Health Association – APHA (2005), e a de ácido peracético e digluconato de clorexidina de acordo com as indicações dos fabricantes.

Foram realizadas três repetições para cada tratamento, sendo que em cada repetição o erlenmeyer recebeu 2 cupons para análise e 2 para controle. O cupom controle refere-se aquele que não recebeu o sanitizante, e sua contagem foi utilizada para calcular o número de reduções decimais promovido pelos sanitizantes.

A formação do biofilme foi conduzida de acordo com a metodologia descrita no item 4.6.2, e a combinação entre a temperatura e tempo de exposição determinada de acordo com os experimentos realizados.

Após a incubação, os cupons foram enxaguados em água peptonada 0,1% para remoção das células planctônicas e imersos em 10 mL de cada solução sanitizante por 10 minutos a temperatura ambiente, em torno de 25 °C. Após esta etapa os cupons foram transferidos para 10 mL de solução neutralizante por 10 minutos, para inativação da ação do sanitizante.

As soluções neutralizantes utilizadas foram o Tiosulfato de sódio a 1% para hipoclorito de sódio e ácido peracético, e Twen 80 a 0,5% para o digluconato de clorexidina.

Os cupons retirados da solução neutralizante, foram imersos em 5 mL de solução peptonada 0,1% e submetidos a vórtex por dois minutos para remoção

das células sésseis e preparação das diluições para o plaqueamento por profundidade.

Para os cupons controle, foram realizados os mesmos procedimentos descritos, exceto as etapas de utilização dos sanitizantes e neutralizantes.

A avaliação das células aderidas nos experimentos 1 e 2, 3 e 4 foi realizada utilizando-se como meio de cultura o PCA, pois estes eram compostos por isolados do mesmo gênero. No experimento 5 foram realizadas a contagem total em PCA, a contagem de *Enterococcus* sp. em ágar KF *Streptococcus* e de *Pseudomonas* sp. em ágar Cetremid. Para todos os experimentos a incubação das placas foi realizada a 35 ± 1 °C por 48 ± 1 h.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação microbiológica do ambiente de processamento de queijo Minas Frescal

5.1.1 Bactérias do gênero *Enterococcus*

5.1.1.1 Matéria-Prima

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* na matéria-prima, após as duas coletas realizadas na indústria de laticínios.

Tabela 7. Contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* na matéria-prima destinada à produção de queijo Minas Frescal

Matéria-prima	<i>Enterococcus</i>	
	1ª coleta	2ª coleta
Leite cru tanque 1 ¹	2,32	4,61
Leite cru tanque 2 ¹	2,49	1,57
Leite pasteurizado ¹	< 1*	< 1*

¹ logUFC.mL⁻¹ *estimado

A contagem média de *Enterococcus* spp. no leite cru coletado nos tanques 1 e 2 foi de 2,74 logUFC.mL⁻¹. Esta pode ser considerada uma contagem relativamente baixa quando comparada a alguns trabalhos realizados no Brasil e reportados na literatura. Souto (2006), Fernandes (2010) e Tebaldi et al. (2008) observam contagens de bactérias deste gênero no leite cru que variaram de 1,41 a 7,36, 4,55 a 6,27 e 3,60 a 7,14 logUFC.mL⁻¹, respectivamente. Assim como nesta pesquisa, nos trabalhos realizados por Souto (2006) e Fernandes (2010), o leite foi coletado em cidades do Estado de São Paulo, enquanto no trabalho de Tebaldi et al. (2008) a coleta foi realizada no Estado de Minas Gerais.

Já em pesquisa realizada na Irlanda, por Gelsomino et al. (2001), esta contagem foi de 2,00 logUFC.mL⁻¹, possivelmente devido a características específicas do leite de diferentes regiões.

A ocorrência de *Enterococcus* spp. em produtos lácteos, é um indicativo de práticas higiênicas inadequadas (MANNU et al., 2003), sendo a contaminação atribuída a falhas que têm início durante a ordenha.

O fato das coletas terem sido realizadas em uma indústria de laticínios caracterizada como “granja leiteira”, possivelmente contribuiu para uma menor contaminação, uma vez que o leite é refrigerado e bombeado diretamente para os tanques de recepção imediatamente após a ordenha mecânica.

As contagens de *Enterococcus* observadas no leite pasteurizado foram $<1 \text{ logUFC.mL}^{-1}$, o que indica que a pasteurização foi capaz de reduzir a contagem deste micro-organismo consideravelmente, já que estavam presentes no leite cru. Temelli et al. (2006) observaram uma redução das bactérias deste gênero de $6,2 \text{ logUFC.mL}^{-1}$ no leite cru, para $< 2 \text{ logUFC.mL}^{-1}$ no leite pasteurizado. Resultado semelhante foi descrito por Perri (2010), que relatou uma redução de até 6 ciclos logarítmicos na contagem de *Enterococcus* spp. em decorrência da pasteurização do leite.

No entanto, na maioria das vezes a pasteurização apenas reduz, mas não elimina estas bactérias do leite e produtos lácteos (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997; GIRAFFA, 2002; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006), principalmente quando a contagem inicial é elevada.

Como a pasteurização também elimina a maioria dos micro-organismos competidores, o ambiente torna-se favorável ao desenvolvimento das bactérias resistentes como o *Enterococcus* spp. (GIRAFFA, 2002).

Com uma menor contagem de *Enterococcus* spp., comparado aos demais estudos relatados, a pasteurização teve resultados satisfatórios, já que após este procedimento as contagens observadas foram $<1,0 \text{ logUFC.mL}^{-1}$.

5.1.1.2 Ambiente de processamento

A análise das 80 amostras de ar ambiente e superfícies das instalações, equipamentos e utensílios utilizados ao longo do processamento de queijo, desde a ordenha até a obtenção do produto final, demonstrou uma grande variação entre

o grau de contaminação por *Enterococcus* spp. nos diferentes pontos de amostragem e entre as duas coletas.

As contagens, apresentadas na Tabela 8, demonstram que embora em 86,25% das amostras analisadas não tenha sido possível a contagem e isolamento de *Enterococcus* spp, sua presença foi verificada em superfícies de contato com o produto final, na sala de processamento de queijos.

Tabela 8. Contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal

Pontos de Coleta		Bactérias do gênero <i>Enterococcus</i>	
		1ª coleta	2ª coleta
Sala de Ordenha	Ar ambiente ¹	< 1*	< 1*
	Equipamento de ordenha ²	4,89	5,41
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	< 1*	< 1*
Sala de Recepção	Ar ambiente ¹	1	< 1*
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	< 1*	< 1*
	Tanque de leite cru 1 ³	< 1*	< 1*
	Tanque de leite cru 2 ³	< 1*	< 1*
Sala de Pasteurização	Ar ambiente ¹	< 1*	< 1*
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	< 1*	< 1*
Câmara Fria	Ar ambiente ¹	< 1*	< 1*
	Estante ³	< 1*	< 1*
	Maçaneta ²	2,07	2,20
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	< 1*	< 1*
Sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C)	Ar ambiente ¹	< 1*	< 1*
	Fôrmas para queijo tipo minas ²	< 1*	< 1*
	Lira ³	< 1*	< 1*
	Maçaneta ²	3,53	3,81
	Mexedor de leite ²	< 1*	< 1*
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	< 1*	< 1*
	Rodo ³	< 1*	< 1*
Sala de Queijos	Ar ambiente – início da fabricação do queijo ¹	< 1*	< 1*
	Ar ambiente – meio da fabricação do queijo ¹	< 1*	< 1*
	Ar ambiente – fim da fabricação do queijo ¹	< 1*	< 1*
	Dreno de saída do soro ³	< 1*	< 1*
	Seladora à vácuo ³	< 1*	< 1*
	Mangueira ³	< 1*	< 1*
	Mão de Manipulador 1 ⁴	< 1*	< 1*
	Mão de Manipulador 2 ⁴	< 1*	< 1*
	Mesa de aço inoxidável ³	< 1*	< 1*
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	< 1*	2,50
	Ralo (parte externa) ³	< 1*	< 1*
	Ralo (parte interna) ³	2,99	4,97
	Tanque de processamento de queijo ³	< 1*	< 1*
	Termômetro ²	1,74	< 1*

¹ logUFC.placa⁻¹

² logUFC.unidade⁻¹

³ logUFC.cm⁻²

⁴ logUFC.mão⁻¹

*estimado

A maior contagem observada foi na superfície do equipamento de ordenha, em média de $5,15 \log \text{UFC.cm}^{-2}$. Apesar de sua localização estar fora do ambiente de produção do queijo Minas Frescal, seu controle higiênico-sanitário é de extrema importância, uma vez que as bactérias deste gênero podem resistir ao tratamento térmico, ou mesmo produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas no leite cru, alterando assim a qualidade do produto final.

As maçanetas presentes na entrada da câmara fria e na entrada da sala de armazenamento dos utensílios (refrigerada a 9°C), constituem uma importante fonte de contaminação do produto, uma vez que ficam voltadas para o interior da sala de processamento de queijos. Como os utensílios e insumos para fabricação dos queijos ficam armazenados nestes locais, o manipulador entra constantemente em contato com as superfícies das maçanetas durante o processamento do queijo.

Embora não tenha sido observada a presença de *Enterococcus* spp. nas mãos dos manipuladores, estes utilizam-se de luvas, que são trocadas constantemente. Assim, a contaminação das luvas pode ser repassada ao produto final.

Na primeira coleta, também foi verificado a presença das bactérias deste gênero no termômetro, utilizado na determinação da temperatura de adição do coalho. Embora a contagem de $1,74 \log \text{UFC.unidade}^{-1}$ possa ser considerada baixa, a utilização deste instrumento se dá após a pasteurização do leite e em condições de temperatura que permitem o rápido desenvolvimento do micro-organismo.

Em pesquisa para avaliação da presença de *Enterococcus* spp. em ambiente de processamento de ricota, Fernandes (2010) encontrou resultados positivos para as superfícies do tanque de processamento de ricota, parede, bancadas, fôrma, tela de retenção, vassoura e ralo de esgotamento de soro.

A presença de *Enterococcus* spp foi detectada no ar ambiente da sala de ordenha e de recepção (1 UFC.placa^{-1}). No entanto, o mesmo não ocorreu durante o processamento do queijo Minas Frescal, na sala de processamento.

5.1.1.3 Produto final

Das 20 amostras de queijo avaliadas quanto a presença de *Enterococcus* spp., em apenas quatro (20%) foram obtidas contagens deste micro-organismo (TABELA 9). Entre as amostras com resultados positivos, três pertenciam ao grupo analisado no dia da coleta e uma após 15 dias de armazenamento refrigerado a 4°C.

Tabela 9. Contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* na massa, soro e no queijo Minas Frescal

Produtos		<i>Enterococcus</i>	
		1ª coleta	2ª coleta
Massa do queijo ²		< 1*	< 1*
Queijo - dia da coleta ²	1	4,46	< 1*
	2	4,62	< 1*
	3	< 1*	< 1*
	4	< 1*	< 1*
	5	3,30	< 1*
Queijo - 15 dias de armazenamento a 4 °C ²	6	< 1*	< 1*
	7	< 1*	< 1*
	8	4,56	< 1*
	9	< 1*	< 1*
	10	< 1*	< 1*
Soro de queijo ¹		< 1*	< 1*

¹ logUFC.mL⁻¹

² logUFC.g⁻¹

*estimado

As contagens nestes produtos variaram de < 1 logUFC.g⁻¹ estimado a 4,62 logUFC.g⁻¹. Esta variação se deve possivelmente a uma contaminação pós-processamento, já que em cada coleta, todas as amostras pertenciam ao mesmo lote.

Assim as unidades amostrais que apresentaram *Enterococcus* spp., provavelmente, foram contaminadas de forma individualizada após o processamento, o que se justifica pelo fato de que a maioria dos queijos é muito manipulado.

De acordo com Giraffa (2002), geralmente a presença de bactérias deste gênero em queijos pasteurizados, se deve não só a resistência térmica, mas também a recontaminação após o tratamento térmico.

A ausência de contaminação por esta bactéria, na massa e no soro do queijo, reforça a teoria da ocorrência de uma contaminação pós-processamento.

A presença de *Enterococcus* spp. em queijos têm sido relatada constantemente, o que evidencia a necessidade de maior controle de forma a evitar a contaminação.

A partir dos resultados aqui encontrados, nota-se uma menor contaminação quando comparados a alguns trabalhos reportados na literatura.

Em 2004, Temelli et al. encontraram contagens de bactérias do gênero *Enterococcus* em queijo branco Turco de 4,4 logUFC.g⁻¹. Fernandes (2010) observou contagens que variaram de 3,53 a 7,07 logUFC.g⁻¹ em ricota. Em 2009, Lima e colaboradores verificaram uma média de 7,30 logUFC.g⁻¹ em queijo Minas Frescal produzido na Serra do Salitre.

5.1.2 Bactérias do gênero *Pseudomonas*

5.1.2.1 Matéria-Prima

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos para contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* na matéria-prima, após as duas coletas realizadas na indústria de laticínios.

Tabela 10. Contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* na matéria-prima destinada à produção de queijo Minas Frescal

Matéria-prima	<i>Pseudomonas</i>	
	1ª coleta	2ª coleta
Leite cru tanque 1 ¹	< 1*	1,51
Leite cru tanque 2 ¹	< 1*	< 1*
Leite pasteurizado ¹	< 1*	< 1*

¹ logUFC.mL⁻¹

*estimado

A presença de *Pseudomonas* spp. no leite cru, foi observada apenas no tanque 1, na segunda coleta, sendo esta de 1,51 logUFC.mL⁻¹. Estes resultados demonstram que os procedimentos de higienização realizados pela indústria

avaliada, foram efetivos no controle da contaminação do leite cru por bactérias deste gênero.

No entanto, estudos demonstraram que a falta de controle higiênico-sanitário na cadeia produtiva do leite, pode afetar sua qualidade. Assim, o desenvolvimento de bactérias do gênero *Pseudomonas* tem sido constantemente associado à qualidade insatisfatória do leite e produtos lácteos.

Fagundes et al. (2006) observaram contagem de $3,85 \log\text{UFC.mL}^{-1}$ no leite cru recém ordenhado. Resultado semelhante foi encontrado por Pinto, Martins e Vanetti (2006), que verificaram uma contagem média de $3,94 \log\text{UFC.mL}^{-1}$ no tanque de leite cru individual. No entanto neste último estudo os resultados para o tanque coletivo e silo industrial foram maiores, sendo de $4,47$ e $5,84 \log\text{UFC.mL}^{-1}$, respectivamente. Silva et al. (2010b) obtiveram uma contagem média de $6,42 \log\text{UFC.mL}^{-1}$, no leite cru coletado em empresas localizadas no Estado de Goiás. Mallet et al. (2011) observaram contagens de $2,67$ e $2,77 \log\text{UFC.mL}^{-1}$, nos períodos de inverno e primavera, respectivamente.

Assim como no caso da contaminação por *Enterococcus* spp., as bactérias do gênero *Pseudomonas* multiplicam-se rapidamente em condições adversas de temperatura, e o fato do leite ser resfriado e bombeado diretamente aos tanques de recepção após a ordenha, contribui significativamente para a diminuição desta contagem bacteriana.

Não foi observado o crescimento de *Pseudomonas* spp. no leite pasteurizado coletado no tanque de fabricação do queijo.

5.1.2.2 Ambiente de processamento

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos para contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal.

Das 80 amostras coletadas de ar ambiente e superfícies das instalações, equipamentos e utensílios utilizados ao longo do processamento de queijo, desde a ordenha até a obtenção do produto final, em apenas 8,75% foi possível a contagem e isolamento de *Pseudomonas* spp., no entanto sua presença foi verificada em superfícies localizadas dentro da sala de processamento dos queijos.

Tabela 11. Contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal

Pontos de Coleta		Bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i>	
		1ª coleta	2ª coleta
Sala de Ordenha	Ar ambiente ¹	< 1*	< 1*
	Equipamento de ordenha ²	< 1*	3,17
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	< 1*	< 1*
Sala de Recepção	Ar ambiente ¹	< 1*	< 1*
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	< 1*	< 1*
	Tanque de leite cru 1 ³	< 1*	< 1*
	Tanque de leite cru 2 ³	< 1*	< 1*
Sala de Pasteurização	Ar ambiente ¹	< 1*	< 1*
	Parede ³	< 1*	1,91
	Piso ³	< 1*	< 1*
Câmara Fria	Ar ambiente ¹	< 1*	< 1*
	Estante ³	< 1*	< 1*
	Maçaneta ²	2,69	< 1*
	Parede ³	< 10*	< 1*
	Piso ³	< 10*	< 1*
Sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C)	Ar ambiente ¹	< 1*	< 1*
	Fôrmas para queijo tipo minas ²	< 1*	< 1*
	Lira ³	< 1*	< 1*
	Maçaneta ²	< 1*	< 1*
	Mexedor de leite ²	< 1*	< 1*
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	< 1*	2,84
	Rodo ³	< 1*	< 1*
Sala de Queijos	Ar ambiente – início da fabricação do queijo ¹	< 1*	< 1*
	Ar ambiente – meio da fabricação do queijo ¹	< 1*	< 1*
	Ar ambiente – fim da fabricação do queijo ¹	< 1*	< 1*
	Dreno de saída do soro ³	< 1*	< 1*
	Seladora à vácuo ³	< 1*	< 1*
	Mangueira ³	< 1*	< 1*
	Mão de Manipulador 1 ⁴	< 1*	< 1*
	Mão de Manipulador 2 ⁴	< 1*	< 1*
	Mesa de aço inoxidável ³	< 1*	< 1*
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	< 1*	1,64
	Ralo (parte externa) ³	< 1*	< 1*
	Ralo (parte interna) ³	1,71	2,77
	Tanque de processamento de queijo ³	< 1*	< 1*
	Termômetro ²	< 1*	< 1*

¹ logUFC.placa⁻¹

² logUFC.unidade⁻¹

³ logUFC.cm⁻²

⁴ logUFC.mão⁻¹

*estimado

O equipamento de ordenha, na segunda coleta, foi responsável pela maior contagem encontrada, sendo esta de 3,17 logUFC.mL⁻¹. Na parede da sala de pasteurização e no piso da sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo, também foi possível a detecção de *Pseudomonas* spp., com contagens de 1,91 e 2,84 logUFC.mL⁻¹, respectivamente.

Dentro da sala de processamento de queijos, foi observada a presença das bactérias deste gênero nas superfícies do piso, parte interna do ralo e maçaneta da câmara fria. Destas superfícies, a maçaneta pode ser considerada como a que apresenta maior risco potencial de contaminação do produto final, uma vez que existe a necessidade dos manipuladores entrarem em contato direto com a mesma durante o processamento.

Mas, ao contrário da contaminação por *Enterococcus* spp., não foi detectada a presença de *Pseudomonas* spp. em nenhuma superfície de contato direto com o queijo Minas Frescal.

Os procedimentos de higienização adotados pela indústria avaliada, resultaram em um controle efetivo quanto a presença de *Pseudomonas* spp. nas superfícies utilizadas durante o processamento do queijo Minas Frescal. Este controle é de extrema importância, considerando-se bactérias deste gênero possuem capacidade de se aderir rapidamente às superfícies de contato com alimentos, e conseqüentemente formar biofilmes.

5.1.2.3 Produto final

Das 20 amostras de queijo avaliadas quanto a presença de *Pseudomonas* spp., em apenas uma (5%) foi verificado a presença deste micro-organismo (TABELA 12). A contagem nesta amostra analisada no mesmo dia da primeira coleta, foi de 2,86 logUFC.g⁻¹.

Tabela 12. Contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* na massa, soro e no queijo Minas Frescal

Produtos		<i>Pseudomonas</i>	
		1ª coleta	2ª coleta
Massa do queijo ²		< 1*	< 1*
Queijo - dia da coleta ²	1	< 1*	< 1*
	2	2,85	< 1*
	3	< 1*	< 1*
	4	< 1*	< 1*
	5	< 1*	< 1*
Queijo – 15 dias de armazenamento a 4 °C ²	6	< 1*	< 1*
	7	< 1*	< 1*
	8	< 1*	< 1*
	9	< 1*	< 1*
	10	< 1*	< 1*
Soro de queijo ¹		< 1*	< 1*

¹ logUFC.mL⁻¹ ² logUFC.g⁻¹ *estimado

Não foi detectada a presença deste micro-organismo na massa e no soro do queijo, obtidos durante a fabricação, indicando que a única amostra em que foi observado a presença de *Pseudomonas* spp., provavelmente, sofreu uma contaminação pós-processamento.

Embora nesta pesquisa a contaminação por *Pseudomonas* spp. no produto final possa ser considerada pequena, as bactérias deste gênero são frequentemente associadas a deterioração de produtos lácteos, principalmente os queijos.

Um exemplo é a pesquisa realizada por Dias (2009), que encontrou uma contagem média de 4,58 logUFC.g⁻¹ de *Pseudomonas* spp. em queijo Minas Frescal.

5.1.3 Contagem de mesófilos aeróbios

5.1.3.1 Matéria-Prima

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para contagem de mesófilos aeróbios presentes na matéria-prima, após as duas coletas realizadas na indústria de laticínios.

Tabela 13. Contagem de mesófilos aeróbios na matéria-prima destinada à produção de queijo Minas Frescal

Matéria-prima/ Produtos	Contagem de Mesófilos Aeróbios	
	1ª coleta	2ª coleta
Leite cru tanque 1 ¹	5,04	4,69
Leite cru tanque 2 ¹	5,11	4,68
Leite pasteurizado ¹	< 1*	2,34
¹ logUFC.mL ⁻¹	*estimado	

A contagem média destes micro-organismos no leite cru, na primeira e segunda coleta (tanques 1 e 2) foi de 5,04 e 4,69 logUFC.mL⁻¹. Como as análises foram realizadas a partir de leite cru Tipo A, estes valores estão acima do permitido pela Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, que estabelece contagem máxima de 1×10^4 UFC.mL⁻¹ (BRASIL, 2011).

Resultado semelhante foi encontrado por Silva et al. (2010a), que em avaliação da qualidade do leite cru de uma granja leiteira localizada no Rio Grande do Sul, encontraram contagens médias de 4,14 logUFC.mL⁻¹ no leite cru refrigerado.

Em outra pesquisa, Fagan et al. (2008), verificaram contagens médias em granjas leiteiras que variaram de 3,80, 3,45, 3,82 e 3,53 logUFC.mL⁻¹ nos períodos de verão, outono, inverno e primavera, respectivamente. Neste caso, todas as contagens estavam dentro do limite estabelecido pela legislação.

A Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, estabelece que apenas duas de cinco amostras analisadas de leite pasteurizado Tipo A, podem apresentar contagens entre $5,0 \times 10^2$ e $1,0 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ (BRASIL, 2011). Embora na primeira coleta não tenha sido detectado a presença de micro-organismos mesófilos e aeróbios no leite pasteurizado, foi observado contagem destes de 2,34 logUFC.mL⁻¹ na segunda coleta.

5.1.3.2 Ambiente de processamento

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos para contagem de total de mesófilos aeróbios no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal.

Tabela 14. Contagem de mesófilos aeróbios no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal

Pontos de Coleta		Contagem de Mesófilos Aeróbios	
		1ª coleta	2ª coleta
Sala de Ordenha	Ar ambiente ¹	>2,39**	>2,39**
	Equipamento de ordenha ²	6,48	7,36
	Parede ³	3,76	3,85
	Piso ³	4,14	2,07
Sala de Recepção	Ar ambiente ¹	0,30	1,17
	Parede ³	2,27	1,07
	Piso ³	2,66	2,00
	Tanque de leite cru 1 ³	3,68	1,07
	Tanque de leite cru 2 ³	2,07	2,81
Sala de Pasteurização	Ar ambiente ¹	0,30	12
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	2,17	2,77
Câmara Fria	Ar ambiente ¹	< 1*	2
	Estante ³	2,07	2,30
	Maçaneta ²	3,07	3,32
	Parede ³	< 1*	1,67
	Piso ³	2,17	1,72
Sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C)	Ar ambiente ¹	2	5
	Fôrmas para queijo tipo minas ²	< 1*	1,54
	Lira ³	< 1*	< 1*
	Maçaneta ²	6,71	4,44
	Mexedor de leite ²	< 1*	1,62
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	5,81	5,23
	Rodo ³	2,69	< 1*
Sala de Queijos	Ar ambiente – início da fabricação do queijo ¹	0,90	0,77
	Ar ambiente – meio da fabricação do queijo ¹	0,47	0,69
	Ar ambiente – fim da fabricação do queijo ¹	1,00	0,30
	Bancada ³	1,20	< 1*
	Dreno de saída do soro ³	< 1*	< 1*
	Seladora à vácuo ³	< 1*	< 1*
	Mangueira ³	1,95	1,69
	Mão de Manipulador 1 ⁴	1,47	< 1*
	Mão de Manipulador 2 ⁴	1,30	< 1*
	Parede ³	< 1*	< 1*
	Piso ³	2,50	3,17
	Ralo (parte externa) ³	1,64	2,30
	Ralo (parte interna) ³	4,64	6,90
	Tanque de processamento de queijo ³	< 1*	< 1*
	Termômetro ²	2,79	1,77

¹ logUFC.placa⁻¹

² logUFC.unidade⁻¹

³ logUFC.cm⁻²

⁴ logUFC.mão⁻¹

*estimado

**Contagem superior a 250 UFC/placa (>2,39 log.UFC.placa⁻¹) obtida pela técnica de sedimentação simples

Embora o número de amostras ambientais contaminadas por *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. tenha sido considerado relativamente baixo (5.1.1.2 e 5.1.2.2), das 80 amostras analisadas a partir da contagem total em placas, não foi observada a presença de micro-organismos em apenas 22 amostras (27,5%).

A maior contagem observada foi na superfície do equipamento de ordenha, em média de 6,92 logUFC.cm⁻². Na sala de ordenha, ainda foi observada a presença de mesófilos aeróbios no ar ambiente, parede e piso.

Na área de recepção, também foi detectada a presença destes micro-organismos no ar ambiente, parede, piso e nos tanques de leite cru.

Neste ambiente, a contaminação dos tanques de leite cru pode ser considerada como a mais relevante, uma vez que as coletas foram realizadas após os procedimentos de higienização e estas são superfícies de contato direto com a matéria-prima. As contagens nestas superfícies variaram de 1,07 a 3,68 logUFC.cm⁻², o que pode caracterizar um processo de adesão bacteriana.

Na sala de pasteurização foi observada a contaminação no ar ambiente e piso, enquanto na câmara fria foi observada no ar ambiente, estante, maçaneta, parede e piso.

Assim como na câmara fria, a maçaneta localizada porta de acesso a sala de armazenamento dos utensílios para produção dos queijos, também apresentou contagem de mesófilos aeróbios. Como estas foram superfícies com resultado positivo para *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp., sua higienização pode ser considerada como insatisfatória.

Além da maçaneta, houve desenvolvimento bacteriano nas amostras referentes a ar ambiente, fôrmas para queijo, mexedor de leite, piso e rodo da sala de armazenamento dos utensílios utilizados na produção dos queijos. No entanto, para as superfícies de contato direto com o queijo, fôrmas e mexedor de leite, foram observadas contagens apenas na segunda coleta, sendo estas de 1,54 e 1,62 logUFC.cm⁻² respectivamente.

Ao avaliar o ar ambiente da sala de processamento de queijos (início, meio e fim da produção), verificou-se a presença de mesófilos aeróbios. As contagens variaram de 0,30 a 1,00 logUFC.placa⁻¹.

Dentre as superfícies localizadas nesta sala, de contato direto com o produto não foram observadas contagens no tanque de processamento e dreno de saída do soro. No entanto, as mãos dos manipuladores (primeira coleta) e o termômetro apresentaram contagens microbianas.

5.1.3.3 Produto final

Em todas as 20 amostras de queijo analisadas, foi detectada a presença de micro-organismos mesófilos aeróbios. A média das contagens nos queijos analisados no dia e após 15 dias a coleta foram de 4,43 e 5,95 logUFC.g⁻¹, respectivamente (TABELA 15).

Tabela 15. Contagem de mesófilos aeróbios na massa, soro e no queijo Minas Frescal

Matéria-prima/ Produtos		Contagem de Mesófilos Aeróbios	
		1ª coleta	2ª coleta
Massa do queijo ²		2,36	2,55
Queijo - dia da coleta ²	1	5,75	3,90
	2	5,60	2,28
	3	4,85	4,51
	4	4,90	5,38
	5	3,76	3,32
Queijo – 15 dias de armazenamento a 4 °C ²	6	7,69	5,11
	7	6,07	5,04
	8	6,39	5,30
	9	6,83	5,43
	10	6,61	4,98
Soro de queijo ¹		2,07	1,69

¹ logUFC.mL⁻¹

² logUFC.g⁻¹

*estimado

Lisita (2005) observou contagens médias de 6,76 e 10,10 logUFC.g⁻¹ de mesófilos aeróbios na massa e queijo Minas Frescal em duas coletas realizadas em uma indústria localizada no Estado de São Paulo. Adreatta (2006) observou

contagens de 4,15 e 6,12 logUFC.g⁻¹ pós 2 e 16 dias de armazenamento refrigerado do queijo Minas Frescal, respectivamente.

A massa e o soro do queijo apresentaram contagens médias de 2,46 e 1,88 logUFC.g⁻¹, o que possivelmente propiciou o desenvolvimento bacteriano após a fabricação do queijo, principalmente durante o período de enformagem e acondicionamento em embalagem, devido a temperatura ambiente.

5.2 Influência do tempo e temperatura de armazenamento no desenvolvimento de mesófilos aeróbios e bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* no leite cru

5.2.1 Bactérias do gênero *Enterococcus*

A Tabela 16 apresenta a contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* nas amostras de leite cru armazenadas sob diferentes condições de tempo e temperatura.

Tabela 16. Contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* (logUFC.mL⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (dias)			
		0	2	4	8
Leite Cru Tanque 1	4	2,45 ^{b,A}	2,30 ^{b,B}	2,80 ^{b,B}	4,07 ^{a,B}
	7	2,45 ^{b,A}	2,64 ^{b,B}	2,91 ^{b,B}	4,20 ^{a,B}
	10	2,45 ^{c,A}	3,63 ^{b,A}	5,23 ^{a,A}	5,69 ^{a,A}
Leite Cru Tanque 2	4	2,03 ^{b,A}	2,54 ^{b,A}	2,73 ^{b,B}	4,36 ^{a,B}
	7	2,03 ^{c,A}	2,69 ^{b,A}	2,90 ^{a,b,B}	4,41 ^{a,B}
	10	2,03 ^{c,A}	3,47 ^{b,A}	5,27 ^{a,A}	5,49 ^{a,A}
Leite Cru 3	4	2,56 ^{c,A}	3,50 ^{b,A}	3,56 ^{b,A}	5,81 ^{a,A}
	7	2,56 ^{c,A}	3,56 ^{b,A}	3,60 ^{b,A}	6,25 ^{a,A}
	10	2,56 ^{c,A}	3,62 ^{b,A}	3,69 ^{b,A}	7,00 ^{a,A}
Leite Cru 4	4	2,84 ^{c,A}	3,41 ^{a,b,B}	3,44 ^{a,b}	4,21 ^{a,C}
	7	2,84 ^{c,A}	4,22 ^{b,A}	4,47 ^{b,A}	5,09 ^{a,B}
	10	2,84 ^{c,A}	4,48 ^{b,A}	4,59 ^{b,A}	5,67 ^{a,A}

Médias seguidas de letras minúsculas sobrescritas iguais para uma mesma temperatura, não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste Tukey.

Médias seguidas de letras maiúsculas sobrescritas iguais para o mesmo tempo de armazenamento, em cada amostra, não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste Tukey.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as contagens iniciais das amostras de Leite Cru Tanque 1, Leite Cru Tanque 2, Leite Cru 3 e Leite Cru 4. Embora, apenas as amostras de Leite Cru Tanques 1 e 2 sejam classificadas como leite cru Tipo A, as análises para contagem inicial foram realizadas no mesmo dia da ordenha para todas as amostras, imediatamente após transporte refrigerado da indústria até o laboratório, o que justifica o fato das contagens não diferirem estatisticamente.

Os resultados, que também podem ser observados na Figura 25, evidenciaram a influência do tempo e temperatura no desenvolvimento bacteriano no leite cru.

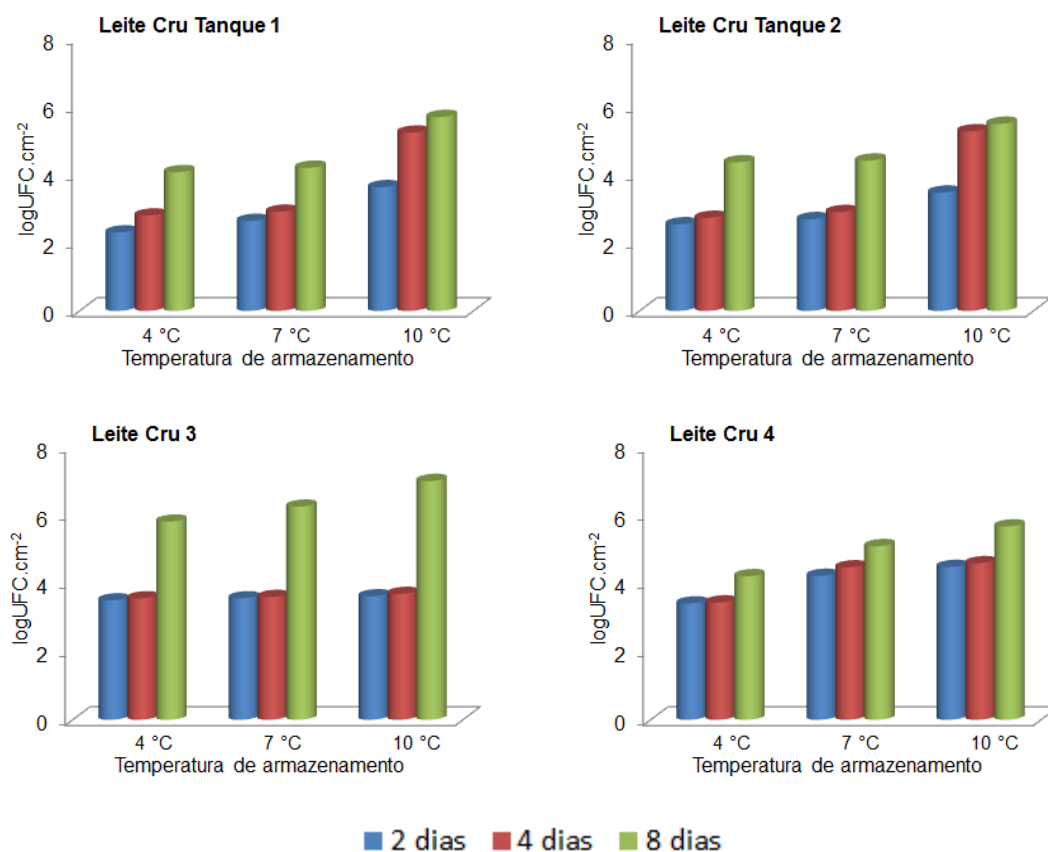


Figura 25. Contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* (logUFC.mL⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura

As análises realizadas para o leite cru coletado no tanque 1, demonstraram que a 4 e 7°C só foi observado aumento significativo nas contagens após 8 dias de armazenamento. No entanto, para a temperatura de 10°C este aumento foi observado após 2 dias. Ao avaliar o efeito da temperatura no desenvolvimento bacteriano, percebe-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as temperaturas de 4 e 7 °C, independentemente do tempo de armazenamento, porém à 10 °C nos tempos 2, 4 e 8 dias, as contagens de *Enterococcus* spp. foram significativamente mais elevadas.

Comportamento semelhante foi observado para a amostra coletada no tanque de leite cru tanque 2. Independentemente da temperatura, houve aumento significativo nas contagens avaliadas ao longo do tempo de armazenamento. Embora após 2 dias de armazenamento as contagens tenha sido estatisticamente iguais nas diferentes temperaturas, observa-se que para as análises realizadas após 4 e 8 dias, estas contagens foram superiores na temperatura de 10 °C, quando em comparação a 4 e 7 °C.

Após 2 dias de armazenamento do leite cru 3, houve aumento significativo das contagens de *Enterococcus* spp., independentemente da temperatura. No entanto, para esta amostra, não foram observadas diferenças no crescimento bacteriano, em função do aumento da temperatura.

A partir da análise do leite cru 4, observa-se que em todas as temperaturas avaliadas, o tempo de armazenamento influenciou no aumento das contagens, e para as análises realizadas a 2, 4 e 8 dias de armazenamento, o aumento da temperatura resultou na elevação do desenvolvimento bacteriano.

Dentre as amostras, o leite cru 3 foi o que obteve maior crescimento médio entre o segundo e oitavo dia de armazenamento, sendo este de 2,79 logUFC.mL⁻¹. Na sequência as amostras de leite cru tanque 2, leite cru tanque 1 e leite cru 4 obtiveram aumento das contagens médias, para o mesmo intervalo, de 1,85, 1,79 e 0,95 logUFC.mL⁻¹, respectivamente. Estes resultados demonstram que embora as contagens sejam referentes a bactérias do mesmo gênero, não existe um único parâmetro que determine a taxa de crescimento, o que possivelmente é

dependente das diferentes cepas de bactérias presentes em diferentes amostras de leite (HARYANI et al., 2003).

5.2.2 Bactérias do gênero *Pseudomonas*

A Tabela 17 apresenta a contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* nas amostras de leite cru armazenadas sob diferentes condições de tempo e temperatura.

Tabela 17. Contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* (logUFC.mL⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (dias)			
		0	2	4	8
Leite Cru Tanque 1	4	0,75 ^{d,A}	2,47 ^{c,B}	3,07 ^{b,B}	5,17 ^{a,B}
	7	0,75 ^{c,A}	2,80 ^{b,B}	3,30 ^{b,B}	5,50 ^{a,A,B}
	10	0,75 ^{c,A}	4,14 ^{b,A}	5,00 ^{b,A}	5,93 ^{a,A}
Leite Cru Tanque 2	4	<1,00 ^{*c,A}	1,38 ^{b,B}	2,07 ^{a,b,B}	2,80 ^{a,C}
	7	<1,00 ^{*c,A}	1,90 ^{b,B}	2,11 ^{b,B}	4,07 ^{a,B}
	10	<1,00 ^{*c,A}	3,90 ^{b,A}	4,87 ^{a,b,A}	4,93 ^{a,A}
Leite Cru 3	4	<1,00 ^{*c,A}	<1,00 ^{*c,A}	1,86 ^{b,C}	4,20 ^{a,C}
	7	<1,00 ^{*c,A}	<1,00 ^{*c,A}	2,51 ^{b,A}	4,93 ^{a,B}
	10	<1,00 ^{*d,A}	1,30 ^{c,A}	2,44 ^{b,B}	5,15 ^{a,A}
Leite Cru 4	4	1,86 ^{c,A}	3,25 ^{b,B}	4,81 ^{a,B}	5,89 ^{a,A}
	7	1,86 ^{c,A}	4,34 ^{b,A}	4,86 ^{b,B}	6,17 ^{a,A}
	10	1,86 ^{d,A}	4,54 ^{c,A}	5,41 ^{b,A}	6,74 ^{a,A}

*estimado

Médias seguidas de letras minúsculas sobrescritas iguais para uma mesma temperatura, não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste Tukey.

Médias seguidas de letras maiúsculas sobrescritas iguais para o mesmo tempo de armazenamento, em cada amostra, não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste Tukey.

Nas quatro amostras avaliadas, o aumento do tempo de armazenamento, independentemente da temperatura de incubação, resultou em um aumento significativo da contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas*, como esquematizado na Figura 26.

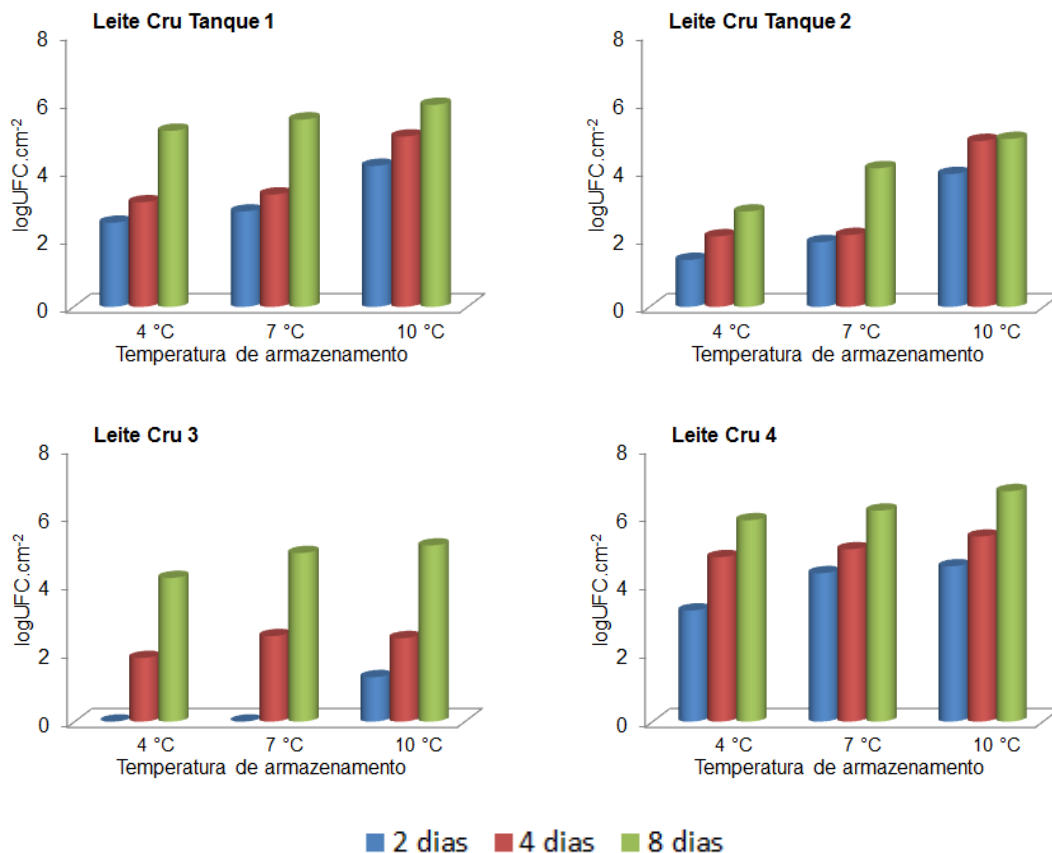


Figura 26. Contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* (logUFC.mL⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura

As análises dos resultados obtidos para as amostras de Leite Cru coletadas nos tanque 1 e 2, demonstram que após 2, 4 e 8 dias de armazenamento, o aumento da temperatura de 4 para 10 °C, resultou em um aumento significativo das contagens médias.

As amostras de Leite Cru Tanque 1 e Leite Cru 3 tiveram como principal característica a baixa contagem inicial, sendo que para o Leite Cru C, mesmo após 2 dias de armazenamento a 4 e 7 °C as contagens foram estimadas, em virtude das limitações da técnica de contagem em placas, em que o número de colônias deve estar entre 25 e 250 (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

No entanto, das quatro amostras, esta foi a que apresentou a maior crescimento médio entre o segundo e oitavo dia de armazenamento, sendo este de 4,32 logUFC.mL⁻¹. Estes resultados confirmam a importância do controle do

tempo e temperatura de armazenamento, uma vez ocorreu o rápido desenvolvimento das poucas células bacterianas presentes no leite.

As maiores contagens de *Pseudomonas* spp. foram observadas a partir da análise do leite cru 4, em todos os tempos e temperaturas avaliados. Após 2 e 4 dias de armazenamento, foi verificado aumento significativo entre as temperaturas de 4 e 10 °C, embora após 8 dias as contagens tenham sido estatisticamente iguais.

As temperaturas de 4., 7 e 10 °C, também foram escolhidas por Santos et al. (2010), para avaliar o desenvolvimento de *Pseudomonas* spp. em leite desnatado reconstituído (LDR). Os autores não observaram diferença significativa nas contagens após 1, 2, 3, 4 e 5 dias de armazenamento em função da temperatura, mas, mas foi verificado aumento do desenvolvimento bacteriano em função do tempo.

Silva et al. (2010c), verificaram um elevado nível de bactérias do gênero *Pseudomonas* no leite cru recém-ordenhado (5,70 logUFC.mL⁻¹), e uma diferença significativa após 48 horas de armazenamento a 7 °C (6,14 logUFC.mL⁻¹).

Em outro estudo realizado por Haryani et al. (2003), foi observado que o tempo para que a contagem de bactérias psicrótroficas em leite cru atingissem 7 logUFC.mL⁻¹, foi de 10 dias a 2 °C, 9 dias a 4°C, 7 dias a 7 °C e 4 dias a 10 °C.

5.2.3 Mesófilos Aeróbios

A Tabela 18 apresenta a contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* nas amostras de leite cru armazenadas sob diferentes condições de tempo e temperatura.

Tabela 18. Contagem de Mesófilos Aeróbios (logUFC.mL⁻¹) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (dias)			
		0	2	4	8
Leite Cru Tanque 1	4	4,86 ^{c,B}	4,77 ^{c,B}	6,00 ^{b,B}	7,39 ^{a,A}
	7	4,86 ^{c,B}	4,96 ^{c,B}	6,07 ^{b,B}	7,47 ^{a,A}
	10	4,86 ^{c,B}	6,47 ^{b,A}	7,64 ^{b,A}	8,74 ^{a,A}
Leite Cru Tanque 2	4	4,69 ^{c,B}	4,69 ^{c,B}	6,39 ^{b,A}	8,00 ^{a,A}
	7	4,69 ^{b,B}	4,71 ^{b,B}	6,44 ^{b,A}	8,07 ^{a,A}
	10	4,69 ^{c,B}	6,41 ^{b,A}	7,07 ^{b,A}	8,67 ^{a,A}
Leite Cru 3	4	2,65 ^{c,C}	3,65 ^{b,A}	3,69 ^{b,A}	7,41 ^{a,B}
	7	2,65 ^{c,C}	3,74 ^{b,A}	4,04 ^{b,A}	7,46 ^{a,A, B}
	10	2,65 ^{c,C}	3,94 ^{b,A}	4,32 ^{b,A}	8,66 ^{a,A}
Leite Cru 4	4	5,11 ^{c,A}	6,47 ^{b,B}	7,69 ^{a,A}	7,79 ^{a,A}
	7	5,11 ^{c,A}	7,50 ^{b,A}	7,83 ^{a,b,A}	8,46 ^{a,A}
	10	5,11 ^{c,A}	7,62 ^{b,A}	7,97 ^{a,b,A}	8,55 ^{a,A}

Médias seguidas de letras minúsculas sobrescritas iguais para uma mesma temperatura, não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste Tukey.

Médias seguidas de letras maiúsculas sobrescritas iguais para o mesmo tempo de armazenamento, em cada amostra, não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste Tukey.

A Tabela 18 permite observar que as amostras de Leite Cru 4 foram as que apresentaram contagens médias iniciais significativamente superiores as demais, 5,11 logUFC. mL⁻¹. As menores contagens iniciais foram observadas para as amostras de Leite Cru Tanque 1 e Leite Cru Tanque 2, provenientes da indústria avaliada.

Em todas as amostras avaliadas, o aumento do tempo de armazenamento, independentemente da temperatura de incubação, resultou em um aumento significativo da contagem de mesófilos aeróbios, como também pode ser observado na Figura 27.

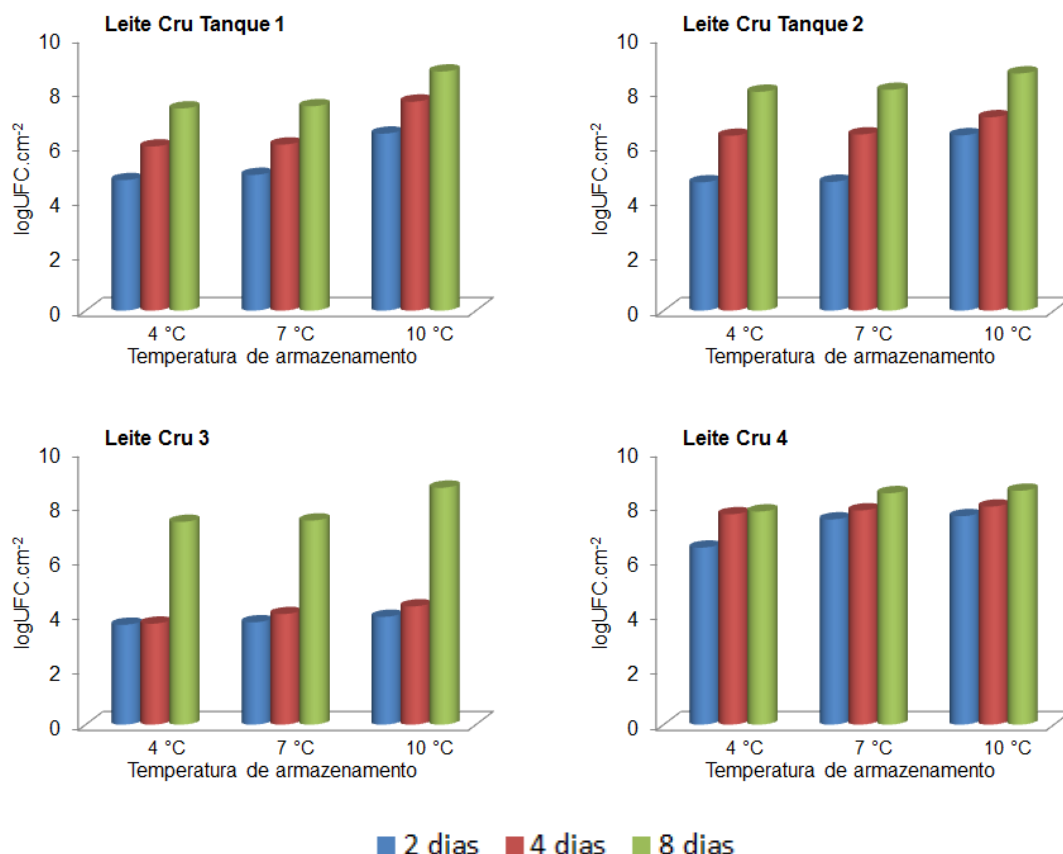


Figura 27. Contagem de Mesófilos Aeróbios ($\log\text{UFC.mL}^{-1}$) em leite cru armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura

Após 2 dias de armazenamento, o aumento do crescimento de mesófilos aeróbios nas amostras de Leite Cru Tanque 1, Leite Cru Tanque 2 e Leite Cru 4, foi estatisticamente significativo, quando comparadas as temperaturas de 4 e 10°C. Neste caso, o Leite Cru 3 foi uma exceção, pois não foi observada a diferença significativa entre o crescimento nas três temperaturas.

O Leite Cru 3 também não apresentou diferença significativa no desenvolvimento bacteriano em função da temperatura, após 4 dias de armazenamento. O mesmo ocorreu para as amostras de Leite Cru 4 e Leite Cru Tanque 2.

Para a análise realizada após 8 dias de armazenamento, apenas a amostra de Leite Cru 3, apresentou aumento significativo em função do aumento da temperatura de 4 para 10 °C.

O Leite Cru 3, foi também o que apresentou maior crescimento médio após 8 dias de armazenamento, sendo este de $5,19 \log\text{UFC.mL}^{-1}$, o que se deve ao fato deste também ter apresentado as menores contagens iniciais.

Resultados semelhantes foram observados por Fonseca (2006) acompanhou a evolução da população de mesófilos aeróbios em leite cru de cabra, e verificou aumento das contagens de 4,3, 5,3 e 6,4 $\log\text{UFC.mL}^{-1}$, após 0, 3 e 6 dias de armazenamento a 4 °C, respectivamente. Estes resultados foram significativamente superiores quando o armazenamento foi realizado a 10 °C, sendo estes de 5,2, 7,8 e 8,8 $\log\text{UFC.mL}^{-1}$, após 0, 3 e 6 dias, respectivamente.

O armazenamento refrigerado do leite cru é de extrema importância para garantia da qualidade final de produtos lácteos como os queijos. No entanto, observa-se pelos resultados obtidos, que apenas a temperatura não é suficiente para controlar todo o processo de desenvolvimento microbiano, uma vez que poderá ocorrer o desenvolvimento de micro-organismos psicrótrófos.

Assim, além da adoção de práticas higiênico-sanitárias adequadas e manutenção da temperatura, o tempo de estocagem também deve ser avaliado.

5.3 Caracterização das espécies de bactérias do gênero *Enterococcus*

Os resultados referentes à confirmação, por testes bioquímicos, de bactérias do gênero *Enterococcus* e identificação através da técnica da PCR das espécies isoladas, são apresentados na Tabela 19. Os resultados das análises realizadas para cada isolado podem ser visualizados na Tabela 43 (APÊNDICE C).

Das 315 cepas isoladas a partir da indústria de processamento do queijo Minas Frescal, e também das amostras de Leite Cru 3 e Leite Cru 4, 32 (10,15%) não foram confirmadas como bactérias do gênero *Enterococcus* pelos testes bioquímicos. Portanto, estas cepas não foram submetidas à técnica da PCR para identificação ao nível de espécies.

Tabela 19. Número de isolados identificados de bactérias do gênero *Enterococcus* presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos

Identificação	Amostras					Total
	Leite cru indústria	Leite Cru 3	Leite Cru 4	Queijo Minas Frescal	Amostras ambientais	
<i>E. faecium</i>	27	48	12	0	8	95
<i>E. faecalis</i>	85	21	34	12	23	175
Outras espécies do gênero	1	0	3	0	9	13
Não pertencente ao gênero	6	2	1	2	21	32
Total	119	71	50	14	61	315

Dentre os selecionados, apenas 13 (4,1%) não puderam ser identificados a partir dos *primers* utilizados. Estes foram apresentados na Tabela 19 como pertencentes a outras espécies do gênero.

Foi possível a identificação de 270 (85,71%) dos 315 isolados. Destes, 95 (35,05%) foram positivos a partir da técnica da PCR para *E. faecium* e 175 (64,81%) para *E. faecalis*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Chingwaru, Mpuchane e Gashe (2003) ao isolarem 1.467 estirpes de bactérias deste gênero em amostras de leite, carne bovina, e carne de frango. Das estirpes, 46,1% foram identificadas como *E. faecalis* e 29% como *E. faecium*.

No entanto, estes dados diferem de grande parte dos apresentados na literatura, pois a espécie *E. faecium* é na maioria das vezes a dominante em ambiente de processamento e amostras de alimentos.

Devriese et al. (1995), isolaram 161 estirpes de *Enterococcus* spp., de amostras de queijo, peixe, crustáceos e carne. A identificação das espécies revelou que 58,38% eram de *E. faecium*, e 26,08% de *E. faecalis*.

Hayes et al. (2003) identificaram 1.357 espécies do gênero *Enterococcus* isoladas de 981 amostras de carne crua (frango, suína, bovina e de peru) coletadas em pontos de comercialização. A espécie *E. faecium* foi a

predominante, correspondendo a 61% do total de isolados. Na sequência, *E. faecalis* e *E. hirae*, corresponderam a 29 e 5,7%, respectivamente.

Em estudo realizado no Brasil, Gomes et al. (2008), verificaram a presença de *Enterococcus* spp. em 83,3% dos queijos e 60% das amostras de produtos cárneos analisadas. De um total de 229 isolados, 139 (46,5%) foram identificados com *E. faecium* e 80 (26,8%) de *E. faecalis*. Os autores detectaram ainda maior prevalência de genes de virulência nos isolados de *E. faecalis*, quando comparados aos de *E. faecium*.

A partir da análise de 150 isolados de queijo coalho, Fujimoto (2011), verificaram que 90% correspondiam a *E. faecium*, 2,7% a *E. faecalis* e 7,3% a outras espécies do gênero. Neste estudo, todos os isolados de *E. faecalis* foram relacionados a pelo menos um determinante de virulência avaliado.

A maior incidência de fatores de virulência em isolados de *E. faecalis*, quando em comparação a *E. faecium*, têm sido observada em vários outros trabalhos envolvendo produtos alimentícios. Franz et al. (2001) observaram que apenas 10,4% de isolados de *E. faecium* tiveram resultados positivos para fatores determinantes de virulência, enquanto para *E. faecalis* este valor foi de 78,7%. Proteínas de superfície e substâncias de agregação foram encontrados por Mannu et al. (2003) em *E. faecalis*, mas não em *E. faecium* isolados de queijos. Cariolato, Andrighetto e Lombardi (2008) também verificaram que em 81 isolados obtidos a partir de amostras de produtos lácteos e amostras clínicas de seres humanos, houve maior predominância de determinantes de fatores de virulência em *E. faecalis* em comparação a *E. faecium*.

Em avaliação de 126 amostras de queijos franceses, Jamet et al. (2012) observaram que bactérias do gênero *Enterococcus* estavam presentes em 44 e 92% dos queijos elaborados a partir de leite pasteurizado e cru, respectivamente. Os pesquisadores isolaram um total de 337 estirpes de bactérias deste gênero que apresentaram resistência a antibióticos. Destas, 81% foram identificadas como *E. faecalis*, 13% como *E. faecium* e apenas 6% como *E. durans*.

Dos 315 isolados, 194 tiveram como origem a indústria de laticínios avaliada, 71 são provenientes das amostras de Leite Cru 3 e 50 de Leite Cru 4.

Nas amostras de Leite Cru coletadas na indústria e no Leite Cru 4 prevaleceram a espécie *E. faecalis*, correspondendo a 71,42 e 68%, respectivamente. Apenas nas amostras de Leite Cru 3, a espécie dominante foi o *E. faecium* que correspondeu a 67,60%.

A partir da avaliação das amostras de queijo e ambiente de processamento coletadas na indústria, observa-se que *E. faecalis* correspondeu a 85,71% dos isolados provenientes dos queijos e a 37,70% dos isolados de amostras ambientais.

Os dados apresentados demonstram que embora a indústria avaliada estabeleça um rígido controle dos processos de higienização empregados, a não eliminação das bactérias deste gênero, promoveram uma possível seleção ao nível de espécies, predominando *E. faecalis*.

As contagens de *Enterococcus* spp. na matéria-prima, produtos e ambiente de processamento da indústria avaliada foram consideradas baixas quando comparadas aos dados reportados na literatura, no entanto a prevalência de *E. faecalis* nestas amostras pode ser considerada como um motivo de preocupação, uma vez que genes de virulência são frequentemente identificados nesta espécie.

5.4 Caracterização das espécies de bactérias do gênero *Pseudomonas*

Os resultados referentes à confirmação, por testes bioquímicos, das bactérias do gênero *Pseudomonas* e da identificação ao nível de espécies através da técnica da PCR, são apresentados na Tabela 20. Os resultados das análises realizadas para cada isolado podem ser visualizados na Tabela 44 (APÊNDICE D).

Tabela 20. Número de isolados identificados de bactérias do gênero *Pseudomonas* presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos

Identificação	Amostras					Total
	Leite cru indústria	Leite Cru 3	Leite Cru 4	Queijo Minas Frescal	Amostras ambientais	
<i>P. fluorescens</i>	48	25	13	7	25	118
<i>P. aeruginosa</i>	12	11	4	0	10	37
Outras espécies do gênero	58	32	33	3	22	148
Não pertencente ao gênero	5	2	0	0	0	7
Total	123	70	50	10	57	310

A partir das amostras coletadas na indústria de laticínios e das amostras de Leite Cru 3 e Leite Cru 4, foram isolados um total de 310 estirpes. Destas, apenas 7 (2,25%) não atenderam as características esperadas nos testes de Gram, oxidase e catalase, e por isso não foram submetidas à técnica da PCR para identificação ao nível de espécies.

Cento e quarenta e oito isolados não foram identificados pelos *primers* utilizados nesta pesquisa, o que corresponde a 47,74% das 310 estirpes. Estes isolados foram apresentados na Tabela 19 como pertencentes a outras espécies do gênero.

Este elevado percentual de estirpes não identificadas pode ser explicado pela presença de outras espécies do gênero não avaliadas neste trabalho, ou ainda pela grande diversidade genética das bactérias do gênero *Pseudomonas*, mesmo considerando-se uma única espécie.

Dogan e Boor (2003) realizaram a ribotipagem para avaliar 81 isolados de leite cru e pasteurizado, pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Os autores observaram a presença de 42 ribotipos diferentes.

Utilizando a técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), Martins et al. (2006), também afirmaram que isolados de *P. fluorescens* provenientes de leite cru refrigerado podem apresentar grande distância genética.

Foi possível a identificação ao nível de espécies de 155 (50%) do total de 310 isolados. Destes, apenas 37 (23,87%) pertenciam à espécie *P. aeruginosa* e 118 (76,18%) foram identificados como *P. fluorescens*.

A predominância de *P. fluorescens* em relação às demais espécies do gênero, em amostras de leite e derivados também foi observada por outros pesquisadores.

Juffs (1973) observou que de 167 estirpes de bactérias do gênero *Pseudomonas*, isoladas de leite cru e pasteurizado, 121 (72,45%) foram identificadas como *P. fluorescens* e apenas 16 (9,58%) como *P. aeruginosa*. Em outra pesquisa, Dogan e Boor (2003) isolaram e identificaram 338 estirpes de *Pseudomonas* spp. provenientes de diversos pontos do processamento de produtos lácteos, e verificaram que 51% eram de *P. fluorescens*.

Em estudos realizados no Brasil, Arcuri et al. (2008) identificaram 161 isolados de bactérias do gênero *Pseudomonas* provenientes de leite cru refrigerado. Destes 94 (58,38%) pertenciam a espécie *P. fluorescens*. Pinto (2004) verificou que 39,5% das bactérias Gram negativas isoladas de leite cru refrigerado granelizado, eram *P. fluorescens*. Resultados semelhantes também foram observados por Silva (2005), de 250 isolados Gram negativos de leite cru refrigerado, 37,6% foram identificados como *P. fluorescens*.

Das 310 estirpes isoladas, 190 foram oriundas das amostras coletas na indústria de laticínios avaliada, 70 são provenientes das amostras de Leite Cru 3 e 50 das amostras de Leite Cru 4.

Independentemente do local de origem dos isolados, *P. fluorescens* foi à espécie dominante. Sua presença detectada em 69,44 e 76,47% dos isolados identificados e originários das amostras de Leite Cru 3 e Leite Cru 4, respectivamente. Este percentual foi ainda maior para os isolados provenientes das amostras coletadas na indústria, representando 78,43%.

Dentre as amostras da indústria de laticínios que foram identificadas como *P. aeruginosa*, 54,54% foram isoladas de leite cru e 45,45% de superfícies utilizadas ao longo da cadeia produtiva. No entanto, foi observada a presença

desta espécie nas amostras de queijo Minas Frescal ou em superfícies de contato direto com o este produto.

5.5 Avaliação da capacidade lipolítica e proteolítica de bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas*

Das 315 estirpes de bactérias do gênero *Enterococcus* isoladas durante as etapas de processamento de queijo Minas Frescal e a partir das amostras de Leite Cru 3 e de Leite Cru 4, 156 (49,52%) apresentaram resultados positivos para a atividade proteolítica, de acordo com o apresentado na Tabela 21. Os resultados das análises realizadas para cada isolado podem ser visualizados na Tabela 45 (APÊNDICE E).

Tabela 21. Comparação entre o número de isolados que apresentaram resultados positivos para atividade proteolítica e número total de isolados identificados de bactérias do gênero *Enterococcus*, presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos *

Identificação	Amostras					Total
	Leite cru indústria	Leite Cru 3	Leite Cru 4	Queijo Minas Frescal	Amostras ambientais	
<i>E. faecium</i>	12(27)	41(48)	1(12)	0(0)	5(8)	59(95)
<i>E. faecalis</i>	47(85)	3(21)	20(34)	3(12)	8(23)	81(175)
Outras espécies do gênero	1(1)	0(0)	1(3)	0(0)	5(9)	7(13)
Não pertencente ao gênero	4(6)	0(2)	0(1)	1(2)	4(21)	9(32)
Total	64(119)	44(71)	22(50)	4(14)	22(61)	156(315)

*Números entre parênteses referem-se ao total de isolados identificados

Os isolados provenientes das amostras de Leite Cru 3, foram os que apresentaram maior percentual de estirpes proteolíticas (61,97%), seguido pelos obtidos a partir das coletas de leite cru realizadas na indústria de laticínios (46,39%) e das amostras de Leite Cru 4 (44%).

Considerando-se apenas as estirpes isoladas do queijo Minas Frescal, 28,57% apresentaram resultado positivo, mas não foi observada a atividade proteolítica nos *Enterococcus* spp. isolados do termômetro, única superfície de contato direto com o produto final a apresentar bactérias do gênero.

O número de estirpes produtoras de enzimas lipolíticas foi menor, quando comparado às proteolíticas. Dos 315 isolados, 122 (38,73%) apresentaram resultados positivos para atividade lipolítica (TABELA 22).

Tabela 22. Comparação entre o número de isolados que apresentaram resultados positivos para atividade lipolítica e número total de isolados identificados de bactérias do gênero *Enterococcus*, presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos *

Identificação	Amostras					Total
	Leite cru indústria	Leite Cru 3	Leite Cru 4	Queijo Minas Frescal	Amostras ambientais	
<i>E. faecium</i>	13(27)	14(48)	2(12)	0(0)	3(8)	32(95)
<i>E. faecalis</i>	50(85)	5(21)	8(34)	5(12)	7(23)	75(175)
Outras espécies do gênero	1(1)	0(0)	1(3)	0(0)	2(9)	4(13)
Não pertencente ao gênero	5(6)	0(2)	0(1)	1(2)	5(21)	11(32)
Total	69(119)	19(71)	11(50)	6(14)	17(61)	122(315)

*Números entre parênteses referem-se ao total de isolados identificados

A análise em função da origem das amostras demonstrou que 57,98, 26,76 e 22% das estirpes isoladas do leite cru coletado na indústria de laticínios, e das amostras de Leite Cru 3 e Leite Cru 4, respectivamente, apresentaram atividade lipolítica. Resultados positivos foram observados para 42,85% das estirpes isoladas do queijo Minas Frescal.

Outras pesquisas também observaram que embora as bactérias do gênero *Enterococcus* sejam produtoras de enzimas lipolíticas, a produção de enzimas proteolíticas geralmente é mais expressiva. Em estudo realizado por Tebaldi et al. (2008), observou-se que de 25 isolados de *Enterococcus* spp.

isolados de tanques de refrigeração de leite cru, 92% eram produtores de enzimas proteolíticas e 52% de enzimas lipolíticas.

Suzzi et al. (2002) avaliaram a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas por *Enterococcus* spp. isolados de queijo artesanal italiano. Neste estudo, nenhum dos isolados apresentaram atividade lipolítica, mas a atividade proteolítica foi classificada pelos autores como relevante.

As tabelas 21 e 22 permitem observar uma expressiva diferença entre os percentuais de bactérias do gênero *Enterococcus* produtoras de enzimas proteolíticas e lipolíticas nas diferentes amostras de leite cru. Segundo Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009), a produção destas enzimas é dependente da composição da microflora das bactérias presentes no leite cru, sendo que apenas algumas espécies são responsáveis pela produção destas enzimas. Haryani et al., (2003) afirmaram que mesmo para bactérias de um único gênero, diferentes cepas estarão presentes em diferentes amostras de leite.

Assim esta variação na produção de enzimas deve-se possivelmente a origem das amostras, que apresentaram diversidade genética para cepas pertencentes a uma mesma espécie, ou mesmo a diferença entre os percentuais observados para as espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, em cada amostra.

O percentual de estirpes de *E. faecalis* produtoras de enzimas proteolíticas e lipolíticas foi muito próximo, 46,28 e 42,85%, respectivamente. A maior diferença foi observada para *E. faecium*, 62,10% produziram enzimas proteolíticas e apenas 33,68% produziram enzimas lipolíticas.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentaram maior percentual para produção de enzimas proteolíticas quando comparadas às do gênero *Enterococcus*. Do total de 310 estirpes isoladas, 221 (71,29%) produziram halo translúcido ao redor da colônia, o que caracteriza a proteólise conforme apresentado na Tabela 23. Os resultados das análises realizadas para cada isolado podem ser visualizados na Tabela 46 (APÊNDICE F).

Tabela 23. Comparação entre o número de isolados que apresentaram resultados positivos para atividade proteolítica e número total de isolados identificados de bactérias do gênero *Pseudomonas*, presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos *

Identificação	Amostras					Total
	Leite cru indústria	Leite Cru 3	Leite Cru 4	Queijo Minas Frescal	Amostras ambientais	
<i>P.fluorescens</i>	42(48)	22(25)	12(13)	0(7)	23(25)	99(118)
<i>P. aeruginosa</i>	10(12)	7(11)	3(4)	0(0)	9(10)	29(37)
Outras espécies do gênero	30(58)	13(32)	29(33)	0(3)	17(22)	89(148)
Não pertencente ao gênero	2(5)	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)	4(7)
Total	84(123)	44(70)	44(50)	0(10)	49(57)	221(310)

*Números entre parênteses referem-se ao total de isolados identificados

De acordo com Law (1979), as bactérias do gênero *Pseudomonas* são as que melhor representam o grupo de psicrotróficos proteolíticos, principalmente a espécie *P. fluorescens*. Adams, Barach e Speck (1975) afirmaram que a maioria das espécies deste gênero, são proteolíticas.

As amostras de Leite Cru 4, foram as que deram origem a isolados com maior percentual de estirpes proteolíticas, 88%. Para os isolados obtidos a partir das amostras de leite cru coletadas na indústria e de Leite Cru 3, estes percentuais foram de 68,29 e 62,85%, respectivamente.

Os isolados de *Pseudomonas* spp. originados das amostras de queijo Minas Frescal, não apresentaram resultados positivos para produção de enzimas proteolíticas, o que pode ser considerado como um fator positivo, uma vez que a presença destas enzimas estão entre as principais causas de deterioração destes produtos.

No entanto, ao contrário das bactérias do gênero *Enterococcus*, os isolados de *Pseudomonas* spp. apresentaram elevado percentual de estirpes produtoras de enzimas lipolíticas. Das 310 estirpes isoladas, resultados positivos para atividade lipolítica foram observados em 305 (98,38%) (TABELA 24).

Tabela 24. Comparação entre o número de isolados que apresentaram resultados positivos para atividade lipolítica e número total de isolados identificados de bactérias do gênero *Pseudomonas*, presentes nas amostras do ambiente de processamento, matéria-prima e produtos lácteos *

Identificação	Amostras					Total
	Leite cru indústria	Leite Cru 3	Leite Cru 4	Queijo Minas Frescal	Amostras ambientais	
<i>P.fluorescens</i>	48(48)	25(25)	11(13)	7(7)	25(25)	116(118)
<i>P. aeruginosa</i>	12(12)	11(11)	4(4)	0(0)	10(10)	37(37)
Outras espécies do gênero	58(58)	32(32)	30(33)	3(3)	22(22)	145(148)
Não pertencente ao gênero	5(5)	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)	7(7)
Total	123(123)	70(70)	45(50)	10(10)	57(57)	305(310)

*Números entre parênteses referem-se ao total de isolados identificados

Todos os isolados a partir das amostras de leite cru coletadas na indústria avaliada e de Leite Cru 3, foram positivos para avaliação da atividade lipolítica, enquanto para as análises realizadas a partir das amostras de Leite Cru 4, este percentual foi de 90%. Dos isolados originados das amostras de queijos e ambiente de processamento, em 100% das estirpes foi observado resultado positivo.

A partir da comparação entre as espécies identificadas em todas as amostras analisadas, observa-se que 83,89 e 78,37% dos isolados de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, apresentaram atividade proteolítica, e 98,30 e 100% apresentaram atividade lipolítica, respectivamente.

A produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas por *Pseudomonas* spp. também foi observada por Silva (2005). De 108 isolados a partir de amostras de leite cru, 66,57% apresentaram atividade proteolítica e lipolítica nas temperaturas de 4, 7, 10 e 21 °C.

Em outra pesquisa realizada por Dogan e Boor (2003), 51 e 67% dos isolados de leite cru e produtos lácteos identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, apresentaram resultados positivos para atividade proteolítica e

lipolítica, respectivamente. Dentre as espécies avaliadas, os autores observaram que as estirpes de *P. fluorescens* foram as que apresentaram maior atividade enzimática.

5.6 Avaliação da formação de biofilme

A partir dos resultados obtidos para contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* no leite cru (itens 5.1.1.1 e 5.1.2.1), a avaliação da formação de biofilme foi realizada inoculando-se no leite UHT contagens médias de 2 logUFC.mL⁻¹ de cada gênero, de acordo com cada experimento.

Embora os resultados para contagens de *Pseudomonas* spp. no leite cru coletado na indústria avaliada tenham sido menores do que a contagem do inóculo inicial utilizado para avaliação da formação dos biofilmes, sabe-se que esta é uma característica específica desta indústria, e elevadas contaminações por bactérias deste gênero são frequentemente relatadas.

5.6.1 Formação de biofilme por *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em superfície de aço inoxidável

O efeito da temperatura em relação ao crescimento de *E. faecium* e *E. faecalis* no leite utilizado para a formação do biofilme após dois dias de incubação nas diferentes temperaturas, é apresentado na Tabela 25. A contagem inicial do leite, em todos os ensaios independentemente da temperatura, foi em média 2 logUFC.mL⁻¹, conforme descrito no item 4.6.2.

Tabela 25. Contagem de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* no leite UHT após dois dias de incubação

Temperatura (°C)	log UFC.mL ⁻¹ * ± DP**	
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
7	3,25 ± 0,15	3,52 ± 0,27
13	8,12 ± 0,06	8,06 ± 0,08
27	9,20 ± 0,43	8,75 ± 0,21
41	8,37 ± 0,24	8,72 ± 0,17
47	8,37 ± 0,13	8,28 ± 0,25

*Média de três repetições

** Desvio padrão

As maiores contagens, independentemente da espécie, foram observadas a 27°C, sendo estas de 9,20 e 8,75 logUFC.mL⁻¹, para *E. faecium* e *E. faecalis*, respectivamente.

As menores contagens foram observadas a 7 °C, 3,25 e 3,52 logUFC.mL⁻¹, para *E. faecium* e *E. faecalis*, respectivamente. Considerando-se que o leite foi previamente inoculado com aproximadamente 2 logUFC.mL⁻¹, as bactérias deste gênero foram capazes de se desenvolver a esta temperatura. Segundo Hartman, Deibel e Sieverning (2001), a temperatura ótima de crescimento para as bactérias do gênero *Enterococcus* é 35°C, embora possam se desenvolver sob temperaturas de refrigeração.

As contagens apresentadas na Tabela 25 são de grande importância para avaliação da formação de biofilme, uma vez que esta formação é dependente dos níveis de contaminação no meio, ou seja, quanto maior a população de *E. faecium* ou *E. faecalis* no leite, possivelmente maior será a adesão destas bactérias ao aço inoxidável.

Os resultados da adesão e formação de biofilme por isolados de *Enterococcus faecium* (Experimento 1) e *Enterococcus faecalis* (Experimento 2), na superfície de aço inoxidável, em função do tempo de contato e temperatura de incubação são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Formação de biofilme por *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em superfície de aço inoxidável, em função do tempo de contato e temperatura de incubação

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	log UFC.cm ⁻² ± DP**	
		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
7	4	1,08 ± 0,07	1,24 ± 0,25
13	1,2	1,58 ± 0,06	2,72 ± 0,13
	6,8	4,61 ± 0,17	5,91 ± 0,26
27	0	0,26 ± 0,24	0,49 ± 0,43
	4	6,90 ± 0,14	7,08 ± 0,19
	4	6,69 ± 0,03	7,19 ± 0,19
	4	6,89 ± 0,14	7,81 ± 0,13
	8	6,13 ± 0,63	6,96 ± 0,26
41	1,2	5,89 ± 0,09	5,89 ± 0,12
	6,8	6,70 ± 0,12	7,22 ± 0,33
47	4	6,15 ± 0,28	4,53 ± 0,99

*Média de três repetições

**Desvio padrão

A análise dos resultados permite observar que o aumento do tempo de contato de 1,2 para 6,8 dias nas temperaturas de 13 e 41 °C resultou em aumento das contagens médias de 3,03 e 0,81 ciclos log para *E. faecium* e de 3,19 e 1,33 pra *E. faecalis*, respectivamente.

Considerando-se como biofilme contagens acima de 5 logUFC.cm⁻² (RONNER; WONG, 1993), a uma mesma temperatura (13 °C), contagens que inicialmente caracterizavam o processo de adesão, passaram a ser classificadas como biofilme bacteriano, após a variação de 1,2 para 6,8 dias de incubação, o que demonstra a influência do fator tempo de contato neste processo. No entanto, observa-se que a 27 °C houve um decréscimo na contagem de *E. faecium* e *E. faecalis*, a partir das análises realizadas após 4 e 8 dias (TABELA 26). Com o tempo, podem-se desprender do biofilme grandes fragmentos, o que diminui sua contagem até que esta se restabeleça, promovendo a contaminação dos alimentos em altos níveis (FORSYTHE, 2005).

Os resultados apresentados na Tabela 26, também permitem observar a influência da temperatura no processo de adesão e formação de biofilme por

bactérias deste gênero. Ao comparar estes resultados com os apresentados na Tabela 25, observa-se que a maioria das temperaturas que permitiram maiores contagens médias de *E. faecium* e *E. faecalis* no leite, após dois dias de incubação, também apresentaram maiores taxas de adesão e formação de biofilme no aço inoxidável.

A variação de 7 para 27 °C a 4 dias, resultou em aumento médio de 5,74 e 6,12 ciclos log para *E. faecium* e *E. faecalis*, respectivamente. A partir da comparação realizada entre contagens observadas nas temperaturas de 27 e 47°C após 4 dias de armazenamento, verifica-se um decréscimo de 0,67 ciclos log para *E. faecium*, e 2,83 ciclos log para *E. faecalis*.

Os isolados identificados como *E. faecalis*, apresentaram contagens médias superiores quando comparados a *E. faecium*. Esta diferença pode estar relacionada à presença de alguns genes de virulência, característicos das espécies deste gênero, que podem auxiliar no processo de adesão.

Dentre estes genes, destacam-se as adesinas, como as substâncias de agregação (AS), a proteína de superfície de *Enterococcus* (Esp) e a adesina de colágeno (Ace) (TEIXEIRA; MERQUIOR; TRABULSI, 2008).

Segundo Teixeira, Merquior e Trabulsi (2008), a AS corresponde a uma proteína de superfície capaz de promover a formação de agregados celulares, a proteína Esp, proteína associada à superfície de enterococos, apresenta algumas características bioquímicas e funcionais que facilitam a formação de biofilmes em superfícies abióticas, e a proteína Ace promove a interação com o colágeno, promovendo a adesão a matriz extracelular do hospedeiro.

Estes genes estão presentes mais frequentemente na espécie *E. faecalis*, quando em comparação a *E. faecium*. Duprè et al. (2003), observaram que 60, 33,3 e 60% dos isolados clínicos de *E. faecalis* foram positivos para a presença dos genes de virulência Ace, AS e Esp, respectivamente. Para os isolados de *E. faecium* foram observados resultados positivos (71,9%) apenas para a proteína Esp. Fujimoto (2011) verificou a presença dos genes de virulência Ace e Esp em 25 e 100% dos isolados a partir de queijo coalho identificados com *E. faecalis* e em apenas 9,3 e 16,3% de *E. faecium*, respectivamente. Nesta pesquisa o autor

observou maior percentual de *E. faecalis* relacionados a determinantes genotípicos de virulência que os isolados de *E. faecium*. Gomes et al. (2008) encontraram a presença do gene Ace em 2,15% dos isolados de *E. faecium*, e em todos os isolados de *E. faecalis* isolados de vários tipos de alimentos.

No entanto, a formação de biofilme por *E. faecalis* foi menor a 47 °C, o que indica que os isolados de *E. faecium* apresentaram maior capacidade de adesão a temperaturas superiores. De acordo com Hartman, Deibel e Sieverding (2001), *E. faecium* é marcadamente tolerante a altas temperaturas.

5.6.1.1 Modelagem da adesão e formação de biofilme por *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se α de 5% ($p < 0,05$), no entanto, devido a grande variabilidade inerente a pesquisas envolvendo micro-organismos, foram considerados significativos os parâmetros (TABELA 27) com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$), conforme recomendação descrita por Rodrigues e lemma (2005).

Tabela 27. Coeficientes de regressão para a formação de biofilme por *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, avaliada em $\log_{10} \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$

Fatores	<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Coeficientes de regressão	p-valor	Coeficientes de regressão	p-valor
Média	6,82147	0,000120	7,35146	0,000346
Temperatura	1,69864	0,007229	1,19592	0,070893
Temperatura ²	-1,28326	0,039551	-1,70483	0,039127
Tempo	1,51911	0,011327	1,71043	0,019847
Tempo ²	-1,49452	0,023429	-1,30893	0,089989
Temperatura x Tempo	0,55500	0,358462	-0,57000	0,475001

Assim, não foi significativo apenas o termo associado à interação (Temperatura x Tempo), para as duas espécies avaliadas, tendo sido incorporado

aos resíduos para o cálculo da Análise de Variância (ANOVA), apresentada nas Tabelas 28 e 29 para *E. faecium* e *E. faecalis*, respectivamente.

Tabela 28. Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por *Enterococcus faecium* em aço inoxidável

	Soma de quadrados	GL	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	58,33	4	14,58	12,04	0,0049
Resíduos	7,26	6	1,21		
Total	65,59	10	6,59		
% variação explicada (R^2) = 88,93		Ftab _{4;6;0,05} =4,53			

A análise de variância, para o experimento 1, indicou que o modelo foi significativo ($p < 0,05$) (TABELA 28), o Fcalculado encontrado foi 2,65 vezes maior que o Ftabelado e o coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,88 validando o modelo encontrado e demonstrando que este se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 29. Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por *Enterococcus faecalis* em aço inoxidável

	Soma de quadrados	GL	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	56,95	4	14,23	7,00	0,019
Resíduos	12,20	6	2,03		
Total	69,15	10	6,91		
% variação explicada (R^2) = 82,35		Ftab _{4;6;0,05} =4,53			

O modelo também foi significativo ($p < 0,05$) para o experimento 2 (TABELA 29). O Fcalculado encontrado foi 1,54 vezes maior que o Ftabelado e o coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,82.

Com estes resultados foram elaborados os modelos matemáticos com as variáveis codificadas que descrevem o processo de formação de biofilme por *E. faecium* (EQUAÇÃO 1) e *E. faecalis* (EQUAÇÃO 2) em função do tempo de contato e da temperatura de incubação.

Equação 1*:

$$\log\text{UFC.cm}^{-2} = 6,82147 + 1,69864T - 1,28326T^2 + 1,51911t - 1,49452t^2$$

Equação 2*:

$$\log\text{UFC.cm}^{-2} = 7,35146 + 1,19592T - 1,70483T^2 + 1,71043t - 1,30893t^2$$

t: tempo; T: temperatura

*Equações válidas para os intervalos de tempo entre 0 e 6,8 dias e temperatura de 7 e 47°C

A partir das equações 1 e 2 é possível encontrar os valores previstos para o comportamento da adesão de formação de biofilme por *E. faecium* e *E. faecalis* em aço inoxidável, em diferentes condições de tempos e temperaturas encontradas nas indústrias de alimentos.

A análise das superfícies resposta e curvas de contorno geradas pelo modelo (FIGURA 28) permitem verificar a existência de uma região ótima para formação do biofilme bacteriano.

Os isolados de *E. faecium* apresentaram uma faixa ótima para formação do biofilme, em combinações que variaram aproximadamente de 3,5 a 7,2 dias e 25,5 a 47 °C. Para *E. faecalis*, esta faixa variou de 3,5 dias a 8 dias de armazenamento e de 21 a 43 °C.

Considerando-se que para ser denominado biofilme, o número mínimo de células aderidas deve ser de aproximadamente 10^5 UFC.cm^{-2} (RONNER; WONG, 1993), sendo este o parâmetro mais utilizado pelos pesquisadores, estas faixas ótimas podem ser estendidas.

Assim, pode-se considerar que *E. faecium* foi capaz de formar biofilme em combinações de tempo e temperatura que variaram de 1 a 8 dias de armazenamento, e de 12 a 47 °C, e *E. faecalis* de 1 a 8 dias de armazenamento e de 10 a 43°C.

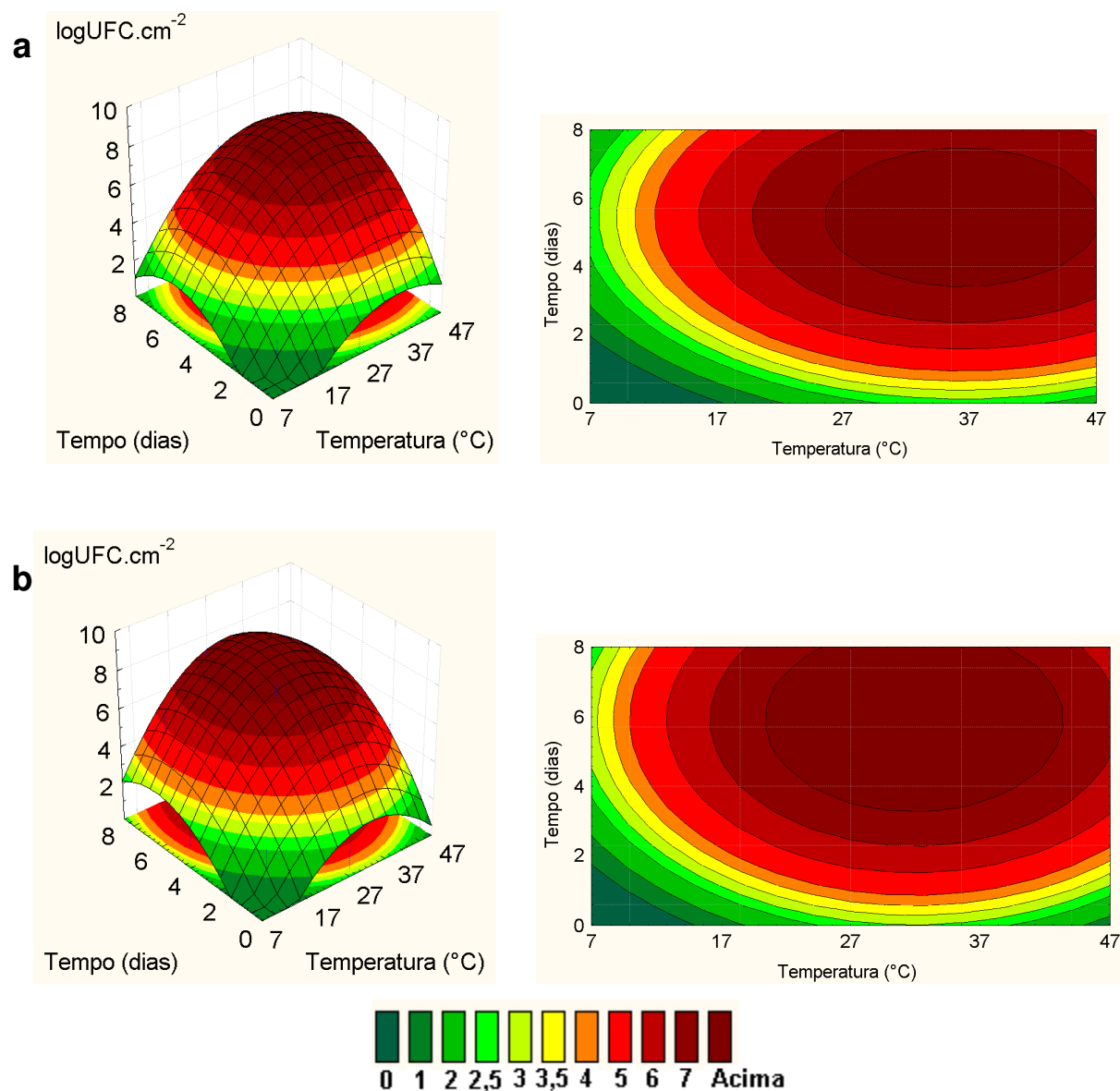


Figura 28. Superfícies resposta e curvas de contorno em função do tempo de contato e temperatura de exposição para formação de biofilme em aço inoxidável. a) *Enterococcus faecium* e b) *Enterococcus faecalis*

Os resultados evidenciam que *E. faecalis* apresentou capacidade de formação de biofilme a menores temperaturas quando comparado a *E. faecium*. As temperaturas mínimas de formação de biofilme para estas espécies foram de 10 e 12 °C, respectivamente. Este fato pode ser considerado de grande importância, considerando-se que uma pequena extrapolação na temperatura de

armazenamento do leite refrigerado pode resultar na formação de biofilme por bactérias desta espécie, frequentemente associadas a fatores de virulência.

5.6.2 Formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* em superfície de aço inoxidável

A Tabela 30 apresenta o efeito da temperatura no desenvolvimento de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, no leite UHT utilizado durante os ensaios para formação do biofilme. A contagem inicial do leite, em todos os ensaios independentemente da temperatura, foi em média $2 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, conforme descrito no item 4.6.2.

Tabela 30. Contagem de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* no leite UHT após dois dias de incubação

Temperatura (°C)	log UFC.mL ⁻¹ * ± DP**	
	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>
7	4,54 ± 0,01	3,65 ± 0,06
13	8,43 ± 0,61	8,07 ± 0,06
27	8,70 ± 0,15	8,17 ± 0,05
41	8,52 ± 0,10	8,90 ± 0,01
47	8,35 ± 0,01	8,47 ± 0,15

*Média de três repetições

** Desvio padrão

As menores contagens foram observadas a 7 °C, 4,54 e 3,64 logUFC.mL⁻¹, para *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, respectivamente, o que pode ser explicado pelo distanciamento da temperatura ótima para o desenvolvimento das bactérias deste gênero. No entanto, como a contagem inicial destas bactérias no leite era de aproximadamente $2 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* aumentou em média de 2,54 e 1,65 logUFC.mL⁻¹ a 7°C, demonstrando a capacidade do rápido desenvolvimento das bactérias deste gênero, mesmo em temperaturas de refrigeração.

As contagens referentes ao processo de adesão e formação de biofilme por isolados de *Pseudomonas fluorescens* (Experimento 3) e *Pseudomonas aeruginosa* (Experimento 4), são apresentadas na Tabela 31.

Tabela 31. Formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* em superfície de aço inoxidável, em função do tempo de contato e temperatura de incubação

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	log UFC.cm ⁻² ± DP**	
		<i>P.fluorescens</i>	<i>P.aeruginosa</i>
7	4	1,31 ± 0,12	1,05 ± 0,24
13	1,2	2,41 ± 0,13	2,44 ± 0,28
	6,8	4,85 ± 0,27	6,56 ± 0,48
27	0	0,65 ± 0,33	0,40 ± 0,17
	4	6,95 ± 0,04	7,57 ± 0,03
	4	7,00 ± 0,10	7,58 ± 0,03
	4	7,05 ± 0,10	7,61 ± 0,11
	8	6,94 ± 0,22	7,63 ± 0,41
41	1,2	5,68 ± 0,12	6,49 ± 0,08
	6,8	6,78 ± 1,16	6,85 ± 0,14
47	4	4,67 ± 1,15	6,58 ± 0,03

*Média de três repetições

** Desvio padrão

Em relação ao tempo de contato, observa-se que a variação de 1,2 para 6,8 dias de armazenamento, nas temperaturas de 13 e 41°C promoveu um aumento médio de 2,44 e 1,1 ciclos log para *P. fluorescens* e de 4,12 e 0,36 ciclos log para *P. aeruginosa*, respectivamente. No entanto, a partir da comparação dos resultados a 27°C, entre os tempos 4 e 8 dias de armazenamento, observa-se que as contagens permaneceram praticamente estáveis, possivelmente pelo desprendimento de fragmentos do biofilme no meio.

A importância da temperatura no controle do processo de adesão e formação de biofilme bacteriano também pode ser observada a partir dos resultados apresentados na Tabela 31. As menores taxas de adesão ao aço inoxidável foram observadas a 7°C, menor temperatura avaliada. Observa-se que a temperatura de 7°C também foi a que resultou em menores contagens de

P. fluorescens e *P. aeruginosa* no leite UHT (TABELA 30), sendo estas de 4,54 e 3,65 logUFC.cm⁻², o que evidencia a importância da contaminação inicial do leite no controle da adesão em superfícies de contato.

A variação da temperatura de 7 para 27°C resultou em aumento do número de células aderidas de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, em média de 5,69 e 6,53 ciclos log, respectivamente. O mesmo comportamento foi verificado em função da variação da temperatura de 13 para 41°C, pois observa-se aumentos das contagens médias de 3,27 e 4,05 ciclos log após 1,2 dias e de 1,93 e 0,29 ciclos log após 6,8 dias para *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

Quando a comparação foi realizada entre as temperaturas de 27 e 47°C a 4 dias, houve um decréscimo médio de 2,33 ciclos log para *P. fluorescens* e de 0,98 ciclos log para *P. aeruginosa*, possivelmente em virtude do distanciamento da sua temperatura ótima de crescimento, aproximadamente 37°C.

Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram contagens médias em logUFC.cm⁻² superiores as observadas para *P. fluorescens*. A formação de biofilme é uma característica das bactérias deste gênero, principalmente pela grande produção de exopolissacarídeos, mas existem outros fatores que auxiliam na capacidade de adesão por *P. aeruginosa*.

Segundo Lincopan e Trabulsi (2008), *P. aeruginosa* produz fímbria tipo IV, principal adesina associada à virulência, e responsável por aproximadamente 90% da capacidade de adesão. Além disso, a grande produção de alginato, substância capaz de formar um gel ao redor da célula bacteriana formando uma matriz hidrofóbica, intensifica a formação do biofilme e confere estabilidade ao mesmo.

5.6.2.1 Modelagem da adesão e formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 32. Foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 10% (p<0,1), embora as

análises estatísticas tenham sido realizadas utilizando-se α de 5% ($p < 0,05$) conforme descrito por Rodrigues e lemma (2005).

Tabela 32. Coeficientes de regressão para a formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*, avaliada em $\log\text{UFC.cm}^{-2}$

Fatores	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Coeficientes de regressão	p-valor	Coeficientes de regressão	p-valor
Média	6,99343	0,000246	7,58107	0,000234
Temperatura	1,20085	0,048627	1,74235	0,017118
Temperatura ²	-1,43144	0,048785	-1,53961	0,048334
Tempo	1,73232	0,013412	1,50774	0,028864
Tempo ²	-1,13216	0,095742	-1,59745	0,042980
Temperatura x Tempo	-0,60250	0,399069	-0,50000	0,507665

Apenas o termo associado à interação, temperatura x tempo, não foi considerado como significativo, e para o cálculo ANOVA, este foi incorporado aos resíduos. As análises são apresentadas nas Tabelas 33 e 34, correspondentes a *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

Tabela 33. Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável

	Soma de quadrados	GL	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	50,04	4	12,51	7,53	0,016
Resíduos	10,00	6	1,66		
Total	60,04	10	6,00		
% variação explicada (R^2) = 83,34 $F_{\text{tab}_{4;6;0,05}}=4,53$					

Analisando-se a Tabela 33, é possível verificar que o que o modelo foi significativo ($p < 0,05$), o Fcalculado foi 1,66 vezes maior que o Ftabelado e a porcentagem de variação explicada, de 83,34%. Estes resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

Tabela 34. Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por *Pseudomonas aeruginosa* em aço inoxidável

	Soma de quadrados	GL	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	63,70	4	15,92	8,84	0,010
Resíduos	10,83	6	1,80		
Total	74,53	10	7,45		
% variação explicada (R^2) = 85,46		$F_{tab_{4,6;0,05}}=4,53$			

O modelo apresentado a partir dos resultados obtidos para o experimento 4 (TABELA 34), foi significativo ($p<0,05$). O Fcalculado encontrado foi 1,95 vezes maior que o Ftabelado e o coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,85, demonstrando que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

Os modelos com as variáveis codificadas que representam a formação de biofilme por *P. fluorescens* e por *P. aeruginosa*, expressa em $\log\text{UFC.cm}^{-2}$, em função do tempo de contato e temperatura de incubação, está demonstrado nas Equações 3 e 4, respectivamente.

Equação 3*:

$$\log\text{UFC.cm}^{-2} = 6,99343 + 1,20085T - 1,43144T^2 + 1,73232t - 1,13216t^2$$

Equação 4*:

$$\log\text{UFC.cm}^{-2} = 7,58107 + 1,74235T - 1,53961T^2 + 1,50774t - 1,59745t^2$$

t: tempo; T: temperatura

*Equações válidas para os intervalos de tempo entre 0 e 6,8 dias e temperatura de 7 e 47°C

A partir destes modelos, é possível a verificação dos valores previstos para a formação de biofilme por *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* em aço inoxidável, em diferentes condições de tempo de temperatura, desde que estejam dentro da faixa estudada.

As superfícies resposta e curvas de contorno são apresentadas na Figura 29. Observa-se a existência de uma região ótima para formação do biofilme bacteriano que varia de 21,6 a 44 °C e 3,5 a 8 dias para *P. fluorescens* e de 21,3 a 47 °C e 2,7 a 8 dias para *P. aeruginosa*.

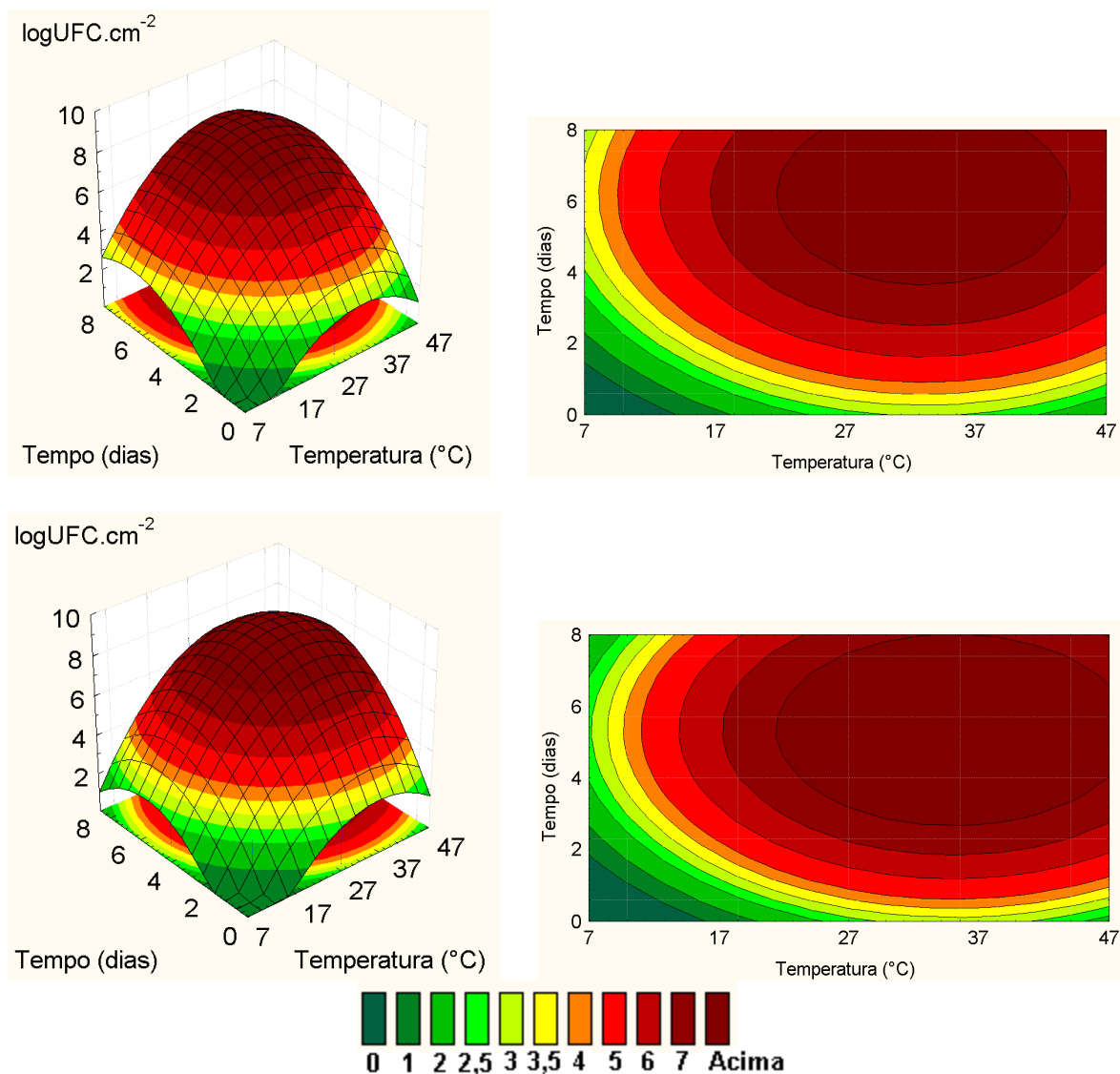


Figura 29. Superfícies resposta e curvas de contorno em função do tempo de contato e temperatura de exposição para formação de biofilme em aço inoxidável. a) *Pseudomonas fluorescens* e b) *Pseudomonas aeruginosa*

Embora o modelo apresente como faixa ótima resultados de contagens acima de 7 logUFC.cm⁻², pode-se observar que a formação de biofilme foi possível em uma faixa mais ampla.

Considera-se, portanto que *P. fluorescens* foi capaz de formar biofilme em combinações que variaram de 9,8 a 47°C e 0,9 a 8 di as. A faixa observada para

formação de biofilme por *P. aeruginosa* foi de 11 a 47°C e de 0,7 a 8 dias de armazenamento.

A partir da comparação entre as espécies, observa-se que *P. fluorescens* apresentou capacidade de iniciar a formação de biofilme a 9,8°C, temperatura inferior a observada para *P. aeruginosa* que foi de 11°C. No entanto, as duas espécies apresentaram capacidade de formação de biofilme na temperatura máxima avaliada pelo modelo, 47°C, como pode ser observada pela disposição das curvas de contorno apresentadas na Figura 29.

5.6.3 Formação de biofilme pela interação entre *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* em superfície de aço inoxidável

A presença de bactérias do gênero *Enterococcus* e *Pseudomonas* em indústrias de processamento de produtos lácteos tem sido frequentemente relatada. Os resultados apresentados no item 5.1 demonstram que estas bactérias estavam presentes nas mesmas amostras obtidas a partir das coletas de matéria-prima, produtos e em superfícies de contato presentes no ambiente de processamento alimento. Assim o estudo da interação destes micro-organismos torna-se importante para avaliação da formação de biofilme em indústria de laticínios.

O efeito da interação em relação ao desenvolvimento destes micro-organismos no leite cru utilizado nos ensaios para avaliação da formação de biofilme é apresentado na Tabela 35. A contagem inicial do leite, em todos os ensaios independentemente da temperatura, foi em média $2 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, conforme descrito no item 4.6.2.

Tabela 35. Contagem da interação entre *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* no leite UHT após dois dias de incubação

Temperatura (°C)	log UFC.mL ⁻¹ * ± DP**		Contagem total
	<i>E. faecium</i> + <i>E. faecalis</i>	<i>P. fluorescens</i> + <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	
7	3,69 ± 0,12	1,97 ± 0,04	4,10 ± 0,05
13	8,28 ± 0,24	4,94 ± 0,49	8,27 ± 0,23
27	8,88 ± 0,02	7,38 ± 0,11	8,93 ± 0,33
41	8,71 ± 0,15	5,86 ± 0,01	8,73 ± 0,04
47	8,50 ± 0,11	5,04 ± 0,05	8,54 ± 0,08

*Média de três repetições

** Desvio padrão

Os resultados apresentados na Tabela 35 demonstram que a 7°C, a contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* aumentou em aproximadamente 1,69 logUFC.cm⁻² após dois dias de armazenamento, em relação ao inóculo inicial. No entanto a contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* se manteve estável em relação ao inóculo adicionado.

Observa-se também que todas as contagens referentes à *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* no experimento 5, foram inferiores as obtidas a partir dos experimento 3 e 4, que analisaram as espécies de forma isolada (TABELA 31), o que pode ser explicado por uma possível inibição das bactérias deste gênero pela presença dos isolados *E. faecium* e *E. faecalis*.

As contagens, expressas em logUFC.cm⁻², referentes a formação de biofilme a partir da junção dos isolados identificados como *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* (Experimento 5), em função do tempo e temperatura, são apresentadas na Tabela 36.

Tabela 36. Formação de biofilme pela interação entre *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* em superfície de aço inoxidável, em função do tempo de contato e temperatura de incubação

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	log UFC.cm ⁻² * ± DP**		
		<i>E.faecium</i> + <i>E.faecalis</i>	<i>P.fluorescens</i> + <i>P.aeruginosa</i>	Contagem total
7	4	0,72±0,21	0,59±0,26	0,98±0,03
13	1,2	0,80±0,17	0,36±0,10	0,98±0,07
	6,8	6,47±0,06	2,60±0,04	6,81±0,06
27	0	0,36±0,10	0,36±0,10	0,67±0,06
	4	6,40±0,03	4,89±0,05	6,89±0,08
	4	6,70±0,38	4,85±0,12	6,61±0,11
	4	6,70±0,23	4,92±0,12	6,80±0,16
	8	6,68±0,42	4,61±0,11	6,80±0,10
41	1,2	5,46±0,23	4,94±0,05	4,62±0,89
	6,8	7,67±0,27	4,90±0,02	7,57±0,39
47	4	6,70±0,05	4,42±0,37	6,77±0,43

*Média de três repetições

** Desvio padrão

Assim como para as análises realizadas para os experimentos 1, 2, 3 e 4, observa-se o tempo de contato e a temperatura de incubação tiveram grande influência nas contagens, independentemente da avaliação realizada por meios seletivos ou pela contagem total.

A variação do tempo de contato de 1,2 para 6,8 dias a 13 °C resultou em aumento de 5,67, 2,24 e 5,83 ciclos log para as espécies bacterianas dos gêneros *Enterococcus*, *Pseudomonas* e pela contagem total, respectivamente. A 41 °C, nas mesmas condições de tempo, este aumento foi menor, de 2,21, 2,95 para *Enterococcus* sp. e contagem total, respectivamente, observando-se um pequeno decréscimo de 0,04 ciclos log para *Pseudomonas* sp..

Também foi observado um pequeno decréscimo na contagem a 27 °C, em consequência do aumento do tempo de 4 para 8 dias, sendo este em média de 0,08 e 0,27 ciclos log para *Enterococcus* sp e *Pseudomonas* sp, respectivamente, e um pequeno aumento de 0,04 ciclos log para contagem total.

A partir da análise em função da temperatura, observa-se uma grande diferença após 4 dias de incubação a 7 e 27 °C. A variação média foi de 5,88, 4,29 e 5,78 para *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp. e contagem total, respectivamente. Observa-se também que em todos os casos as contagens mantiveram-se praticamente estáveis a partir da variação de 27 para 47 °C pelo tempo de 4 dias de armazenamento.

A comparação entre os dois gêneros permite observar que *E. faecium* e *E. faecalis* se sobressaíram em relação a *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*. Nota-se que as contagens obtidas para *P. fluorescens* (experimento 3) e *P. aeruginosa* (experimento 4), apresentadas na Tabela 31, foram muito superiores as obtidas pelo experimento 5. A 27 °C por 4 dias, ponto central do delineamento, *P. fluorescens* apresentou contagens médias de 7 logUFC.cm⁻² e *P. aeruginosa* de 7,58 logUFC.cm⁻². No entanto, pelo experimento 5 a contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* foi de 4,88 logUFC.cm⁻².

A variação observada para o gênero *Enterococcus* em função dos experimentos foi pouco expressiva. A 27 °C por 4 dias, as contagens médias foram de 6,82, 7,36 logUFC.cm⁻² para *E. faecium* e *E. faecalis* (TABELA 26), respectivamente, e de 6,6 logUFC.cm⁻² para o experimento 5 (TABELA 36).

Pode-se afirmar, portanto, que os isolados pertencentes ao gênero *Enterococcus* inibiram o desenvolvimento dos isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. A 27 °C esta redução das contagens foram em média de 2,41 logUFC.cm⁻², ou seja, houve uma redução em mais de 99% das contagens realizadas para os delineamentos 3 e 4, nos quais as espécies foram avaliadas de forma isolada, em relação ao delineamento 5, pela junção dos gêneros.

Uma das características associadas a bactérias do gênero *Enterococcus* é a capacidade de produção de bacteriocinas capazes de inibir o desenvolvimento de alguns micro-organismos. Segundo Ferreira (2005), as bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* spp. são denominadas enterocinas, compostos de natureza protéica que apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e deteriorantes presentes nos alimentos. O autor observou que isolados de *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. mundtii*, inibiram o desenvolvimento de

espécies do gênero *Listeria*, *Lactobacillus plantarum* e *Salmonella Enteritidis*. Nota-se que neste experimento as bacteriocinas foram capazes de atuar contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Grande parte das pesquisas desenvolvidas com o objetivo de avaliar a produção de bacteriocinas por *Enterococcus* spp., estão relacionadas ao gênero *Listeria*, já que estas são bactérias patogênicas de grande importância para a área de alimentos. Siragusa (1992) observou a capacidade de inibição de bactérias do gênero *Listeria*, incluindo *Listeria monocytogenes*, por bacteriocinas produzidas por *E. hirae*. Carvalho (2007) estudou a atividade de enterocinas sintetizadas por *Enterococcus* spp. isolados durante o processamento de queijo coalho, observando uma atividade anti-listeria. Gonzáles et al. (2007) avaliaram a produção de bacteriocinas por bactérias isoladas durante o processamento de queijo espanhol Genestoso, e observaram que estirpes identificadas como *E. faecalis* inibiram o desenvolvimento de *Clostridium tyrobutyricum* e *Listeria monocytogenes*.

Além da *Listeria monocytogenes*, Cintas et al. (1997), observou a inibição de *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringes* e *Clostridium botulinum* por enterocina produzida por *E. faecium*. A atividade inibitória ao desenvolvimento de *P. aeruginosa* pela presença de enterocinas produzidas por *E. gallinarum* isolado do trato intestinal de avestruz, foi observada por Jennes, Dicks e Verwoerd (2000). Além da *P. aeruginosa*, os pesquisadores também verificaram atividade em relação ao desenvolvimento de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sake*, *Listeria innocua*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium* sp., *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e até mesmo de *E. faecalis*.

Considerando-se a grande variedade de espécies bacterianas passíveis terem seu desenvolvimento inibido por ação das enterocinas produzidas por bactérias do gênero *Enterococcus*, esta possivelmente pode ser a causa da redução das contagens observadas para o gênero *Pseudomonas*.

5.6.3.1 Modelagem da formação de biofilme pela interação entre *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*

Os coeficientes de regressão obtidos a partir das análises dos resultados do experimento 5 estão apresentados na Tabela 37. Foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$), embora as análises estatísticas tenham sido realizadas utilizando-se α de 5% ($p < 0,05$), conforme descrito por Rodrigues e lemma (2005).

Tabela 37. Coeficientes de regressão para a formação de biofilme pela interação entre *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, avaliada em $\log\text{UFC.cm}^{-2}$

Fatores	<i>E. faecium</i> + <i>E. faecalis</i>		<i>P. fluorescens</i> + <i>P. aeruginosa</i>		Contagem total	
	Coeficientes de regressão	p-valor	Coeficientes de regressão	p-valor	Coeficientes de regressão	p-valor
Média	6,59404	0,000116	4,88381	0,000123	6,76188	0,000071
Temperatura	1,79181	0,004877	1,53962	0,002703	1,57517	0,006042
Temperatura ²	-1,07270	0,060940	-1,01563	0,028632	-1,14835	0,038555
Tempo	2,10516	0,002428	1,02712	0,014399	2,18441	0,001454
Tempo ²	-1,16827	0,046893	-1,02569	0,027665	-1,21877	0,031573
Temperatura x Tempo	-0,86500	0,161618	-0,57000	0,208493	-0,72000	0,199738

Apenas o termo associado à interação (Temperatura x Tempo), não foi significativo, independentemente da análise, e, portanto, este foi incorporado aos resíduos para o cálculo da ANOVA, conforme apresentado nas Tabelas 38, 39 e 40, para contagem das espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Pseudomonas* e contagem total, respectivamente.

Tabela 38. Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em aço inoxidável

	Soma de quadrados	GL	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	71,89	4	17,97	12,65	0,004
Resíduos	8,54	6	1,42		
Total	80,43	10	8,04		
% variação explicada (R^2) = 89,37 $F_{tab_{4;6;0,05}}=4,53$					

Tabela 39. Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de por *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* em aço inoxidável

	Soma de quadrados	GL	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	36,36	4	9,09	12,36	0,004
Resíduos	4,41	6	0,73		
Total	40,77	10	4,07		
% variação explicada (R^2) = 89,16 $F_{tab_{4;6;0,05}}=4,53$					

Tabela 40. Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme por *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* em aço inoxidável

	Soma de quadrados	GL	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	70,02	4	17,50	15,48	0,002
Resíduos	6,82	6	1,13		
Total	76,84	10	7,68		
% variação explicada (R^2) = 91,11 $F_{tab_{4;6;0,05}}=4,53$					

Todos os modelos apresentados a partir dos resultados obtidos para o experimento 5 (TABELAS 38, 39 e 40), foram significativos ($p < 0,05$). Os Fcalculados encontrados foram 2,79, 2,72 e 3,41 vezes maior que o Ftabelado e as porcentagens de variações explicadas de 89,37, 89,16 e 91,11% para as contagens das espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Pseudomonas* e contagem total, respectivamente. Os resultados demonstram uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelos modelos.

As Equações 5, 6 e 7 apresentam os modelos com as variáveis codificadas, que representam a formação de biofilme, de acordo com o experimento 5, para contagens de *Enterococcus*, *Pseudomonas* e total, respectivamente.

A partir destes modelos, é possível a verificação dos valores previstos para a formação de biofilme, pelas espécies avaliadas pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Pseudomonas* e pela contagem total destes em ano inoxidável, em diferentes condições de tempo de temperatura.

Equação 5*:

$$\log\text{UFC.cm}^{-2} = 6,59404 + 1,79181T - 1,07270T^2 + 2,10516t - 1,16827t^2$$

Equação 6*:

$$\log\text{UFC.cm}^{-2} = 4,88381 + 1,53962T - 1,01563T^2 + 1,02712t - 1,02569t^2$$

Equação 7*:

$$\log\text{UFC.cm}^{-2} = 6,76188 + 1,57517T - 1,14835T^2 + 2,18441t - 1,21877t^2$$

t: tempo; T: temperatura

*Equações válidas para os intervalos de tempo entre 0 e 6,8 dias e temperatura de 7 e 47°C

A Figura 30 apresenta as superfícies resposta e as curvas de contorno para os modelos encontrados.

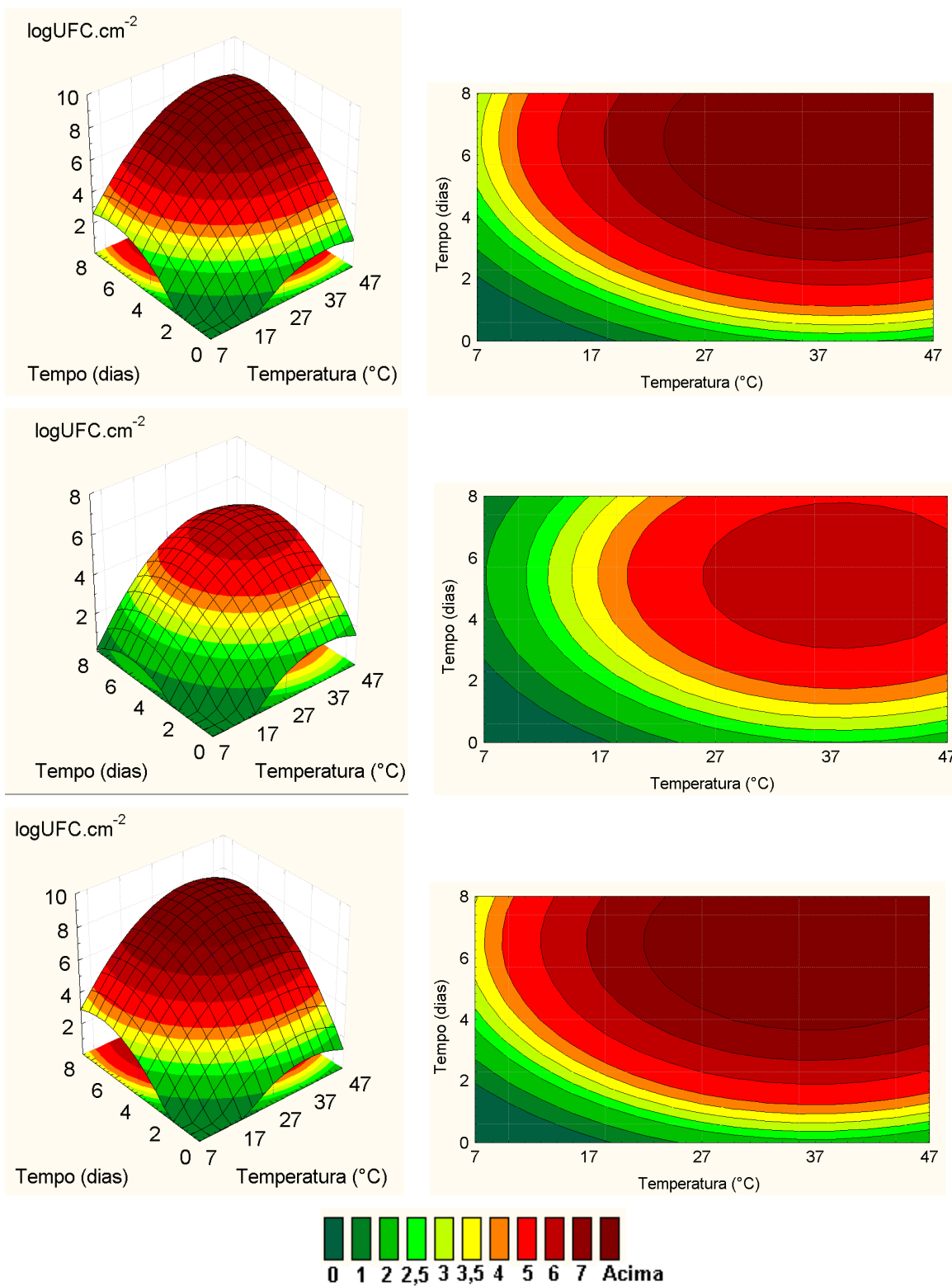


Figura 30. Superfícies resposta e curvas de contorno em função do tempo de contato e temperatura de exposição para formação de biofilme em aço inoxidável. a) *E. faecium* e *E. faecalis*, b) *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* e c) Contagem total

Com a interação a região ótima para formação de biofilme por *E. faecium* e *E. faecalis* variou de 23,7 a 47 °C e 3,6 a 8 dias, sendo a formação de biofilme foi observada a partir de 10,2 a 47 °C e 1,4 a 8 dias. Os resultados foram semelhantes aos encontrados para a avaliação das espécies de forma isolada, delineamentos 1 e 2, indicando que a interação não influenciou na formação de biofilme por bactérias deste gênero.

P. fluorescens e *P. aeruginosa* apresentaram uma faixa ótima que variou de 26,5 a 47 °C por 3,1 a 7,7 dias, com formação de biofilme a partir de 19,6 a 47 °C por 1,8 a 8 dias. A partir da comparação entre os resultados obtidos em função do experimento 5 e dos experimentos 3 e 4, observa-se para formação de biofilme pela interação, foi necessário uma temperatura inicial em média 9,2 °C superior a necessária para as espécies de forma isolada. O tempo de contato inicial também foi em média 1 dia superior para a formação de biofilme pela interação.

Observa-se também que tanto o tempo, quanto a temperatura para o início da formação de biofilme foram superiores para o gênero *Pseudomonas*, quando comparados ao gênero *Enterococcus*.

Assim, pode-se afirmar que os isolados de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* foram influenciados pela presença dos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*.

Os resultados evidenciam a importância do controle do tempo e da temperatura em todas as etapas do processamento de produtos lácteos, de forma a garantir que as condições higiênico-sanitárias estejam adequadas.

5.6.4 Verificação experimental dos modelos encontrados

Para verificação dos modelos encontrados foram conduzidos ensaios experimentais em condições que não haviam sido avaliadas no delineamento composto central, com o objetivo de testar o desempenho de cada modelo encontrado, verificando se este descreve bem os resultados reais. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 41.

Tabela 41. Comparação entre os resultados experimentais e previstos pelos modelos, de acordo com os experimentos 1, 2, 3, 4 e 5, para formação de biofilme em aço inoxidável a 25 °C por 3 dias de armazenamento

Experimento	Isolados	Experimental log UFC.cm ⁻² ± DP**	Predito log UFC.cm ⁻²	Desvio	Desvio relativo (%)
1	<i>E. faecium</i>	6,04 ± 0,34	5,81	0,23	3,80
2	<i>E. faecalis</i>	6,01 ± 0,36	6,36	-0,35	-5,82
3	<i>P. fluorescens</i>	6,01 ± 0,36	6,02	-0,01	-0,16
4	<i>P. aeruginosa</i>	6,39 ± 0,34	6,55	-0,16	-2,50
5	<i>E. faecium</i> + <i>E. faecalis</i>	5,36 ± 0,47	5,41	-0,05	-0,93
	<i>P. fluorescens</i> + <i>P. aeruginosa</i>	3,61 ± 0,98	4,14	-0,53	-14,68
	<i>E. faecium</i> + <i>E. faecalis</i> + <i>P. fluorescens</i> + <i>P. aeruginosa</i>	5,64 ± 0,05	5,57	0,07	1,24

*Média de três repetições

**Desvio padrão

Com exceção aos resultados observados para o experimento 1 e para a contagem total no experimento 5, todos os outros ensaios apresentaram valores preditos superiores aos encontrados experimentalmente. Assim, pode-se afirmar que a 25 °C por 3 dias, a maioria das predições tenderam ao lado seguro do modelo, pois caso os modelos ajustados sejam utilizados para auxiliar na determinação de procedimentos de higienização, estes serão superestimados, o que resultará em maior controle do processo.

Segundo Peña (2005) estes modelos de predição podem ser de grande importância na tomada de decisões em relação aos procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios utilizados nas indústrias de alimentos, pois proporcionam uma melhor elucidação do processo de adesão e formação de biofilme bacteriano.

5.7 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 31 apresenta fotomicrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), da superfície dos cupons de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, utilizados nos ensaios de formação de biofilme.

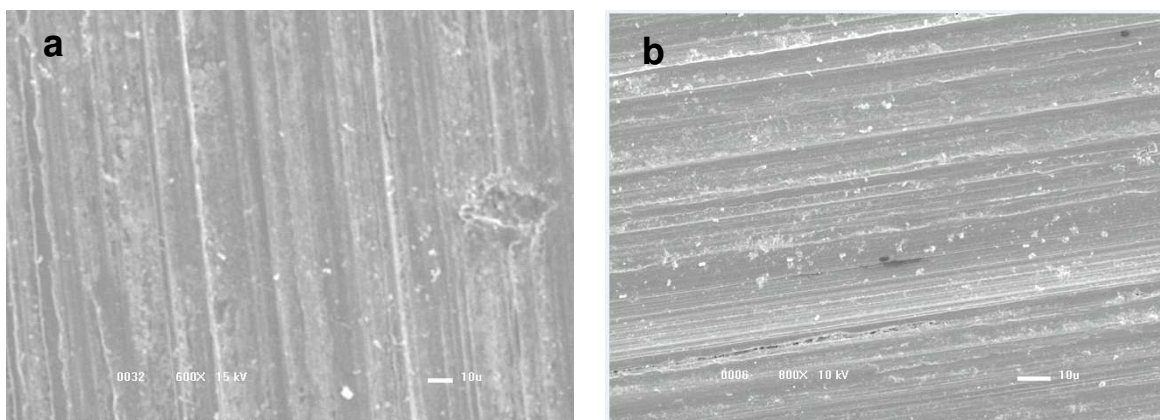


Figura 31. Fotomicrografia de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, não submetido ao processo de adesão, observada por microscopia eletrônica de varredura nos aumentos de: a) 600 x, b) 800 x

É possível a visualização de pequenas irregularidades distribuídas na superfície dos cupons de aço inoxidável (FIGURA 31). Estas imperfeições podem dificultar os procedimentos de higienização adotados nas indústrias de alimentos, principalmente por favorecerem a aglomeração de resíduos alimentares e consequentemente a adesão bacteriana.

As Figuras 32, 33, 34, 35 e 36 apresentam fotomicrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, das superfícies de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, após terem sido submetidos ao processo de adesão e formação de biofilme, de acordo com cada experimento.

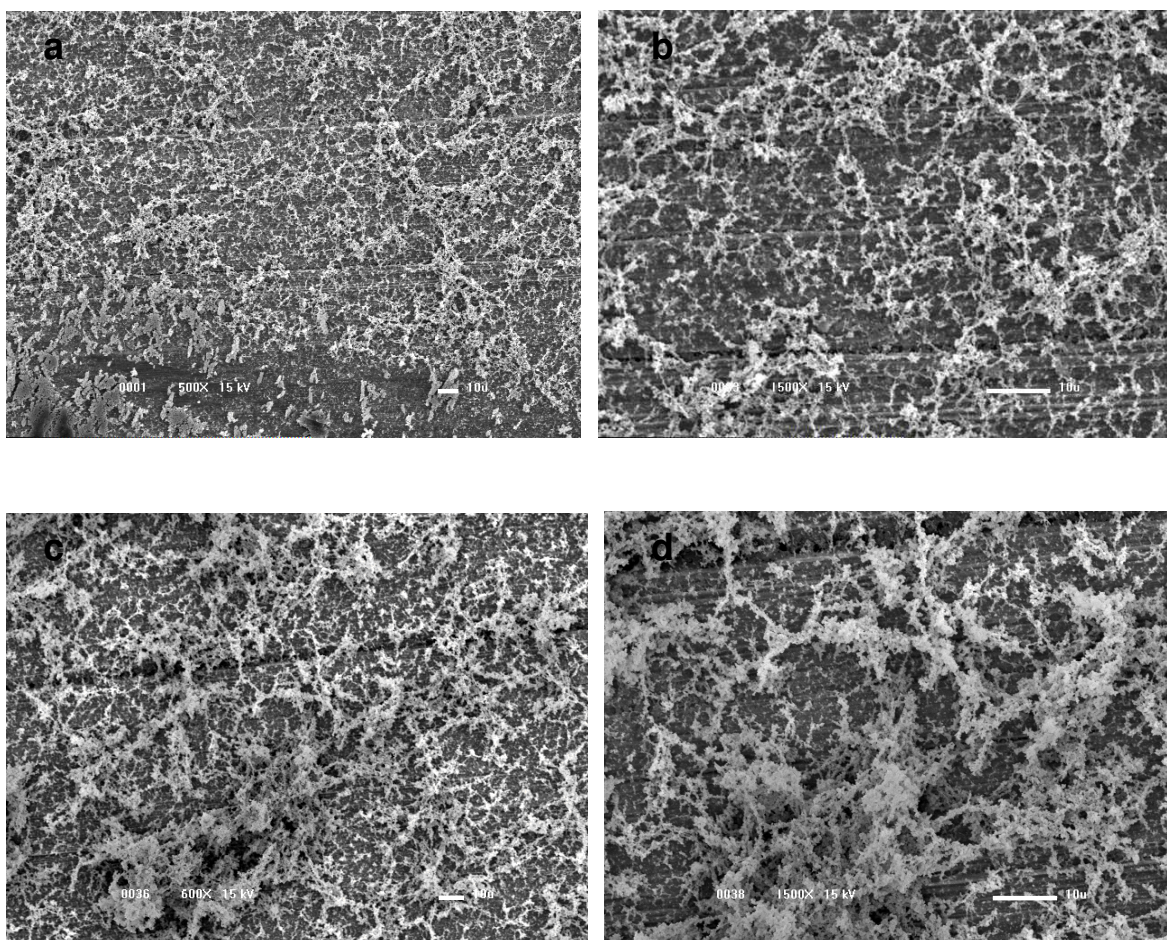


Figura 32. Fotomicrografias de aço inoxidável AISI 304 observadas por MEV, submetidas ao processo de adesão por isolados de *Enterococcus faecium* após 48 horas. a) aumento de 600x (a 27 °C), b) aumento de 1500x (a 27 °C), c) aumento de 600x (a 37 °C), d) aumento de 1500x (a 37 °C)

A partir da Figura 32, pode-se observar que, devido à formação de uma densa matriz composta por bactérias, exopolissacarídeos e constituintes do leite, não foi possível a contagem e visualização das células aderidas.

A formação deste complexo, característica da formação dos biofilmes bacterianos, também dificultou a diferenciação em relação às contagens observadas a 27 e 37 °C. Assim as Figuras 33, 34, 35 e 36 apresentam apenas duas fotomicrografias, sendo uma a 27 °C e uma a 37 °C.

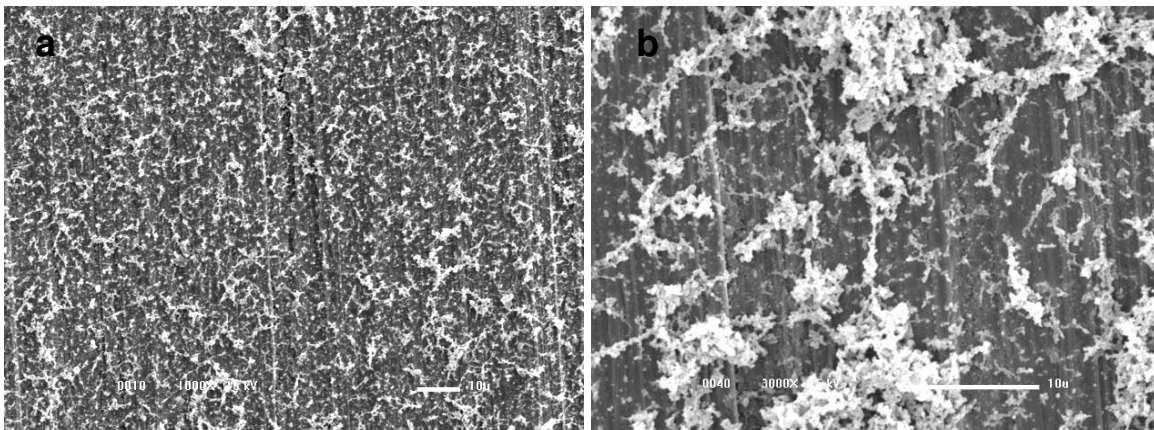


Figura 33. Fotomicrografias de aço inoxidável AISI 304 observadas por MEV, submetidas ao processo de adesão por isolados de *Enterococcus faecalis* após 48 horas. a) aumento de 1000x (a 27 °C), b) aumento de 3000x (a 37 °C)

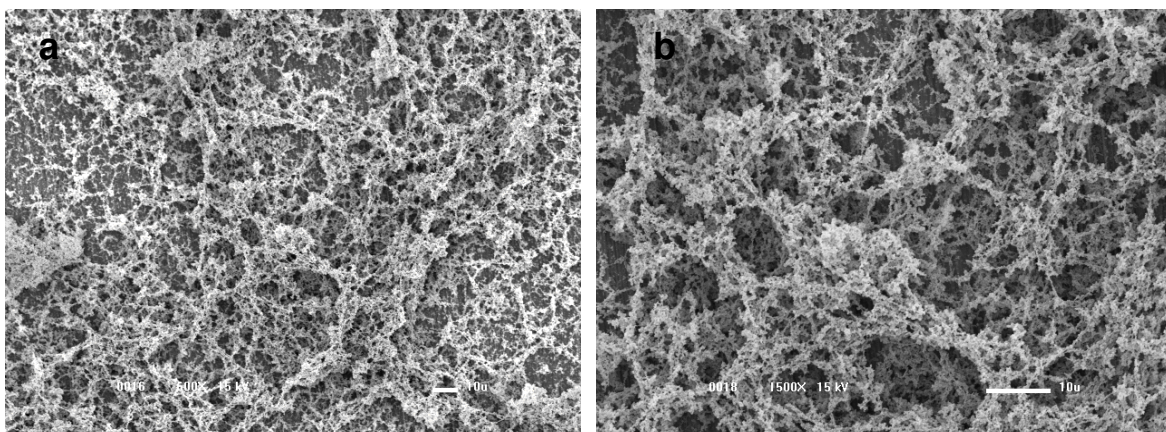


Figura 34. Fotomicrografias de aço inoxidável AISI 304 observadas por MEV, submetidas ao processo de adesão por isolados de *Pseudomonas fluorescens* após 48 horas. a) aumento de 600x (a 27 °C), b) aumento de 1500x (a 37 °C)

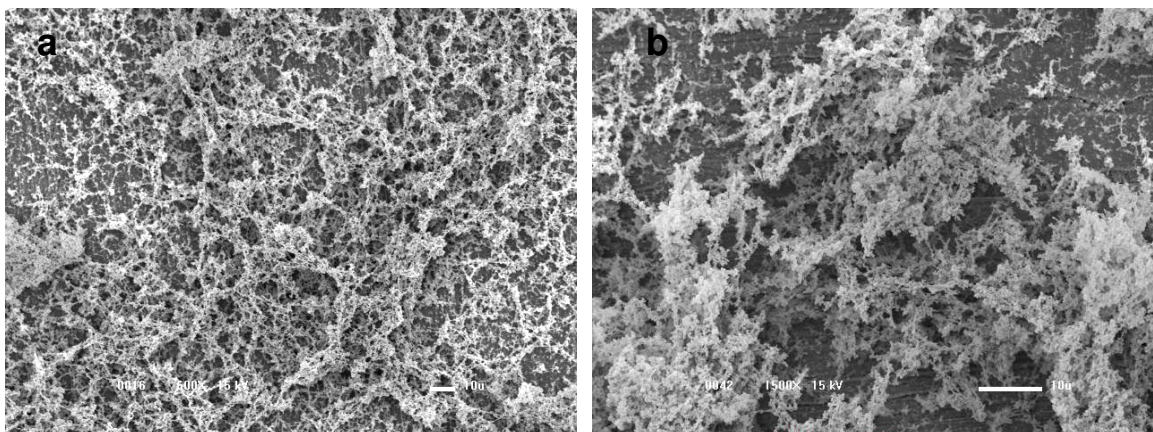


Figura 35. Fotomicrografias de aço inoxidável AISI 304 observadas por MEV, submetidas ao processo de adesão por isolados de *Pseudomonas aeruginosa* após 48 horas. a) aumento de 600x (a 27 °C), b) aumento de 1500x (a 37 °C)

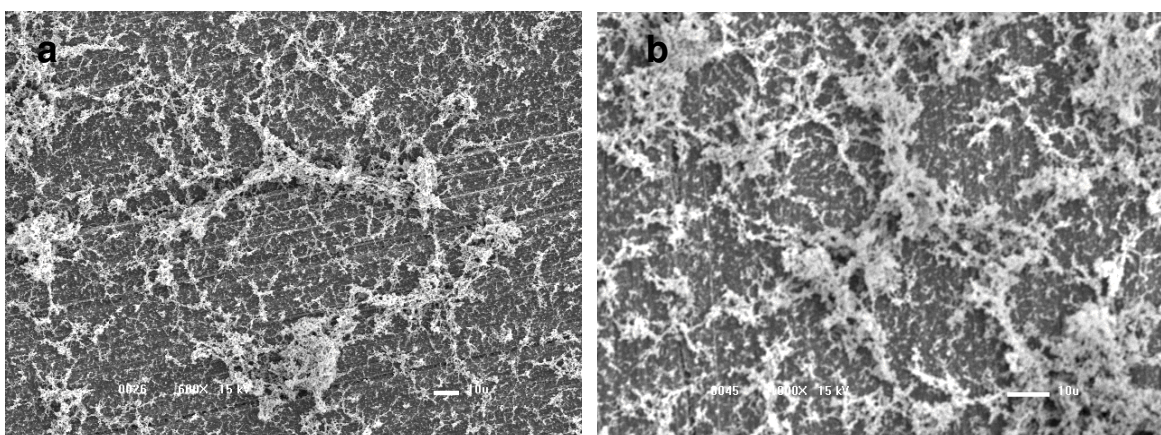


Figura 36. Fotomicrografias de aço inoxidável AISI 304 observadas por MEV, submetidas ao processo de adesão pela interação entre *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* após 48 horas. a) aumento de 600x (a 27 °C), b) aumento de 1500x (a 37 °C)

Pode-se observar que nos biofilmes formados a partir dos isolados de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* (FIGURAS 34 e 35), houve a formação de uma matriz mais densa, quando comparado aos formados apenas por isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* (FIGURAS 32 e 33). Dentre as principais características do gênero *Pseudomonas*, está a capacidade de produção de grande quantidade de exopolissacarídeos, com consequente formação desta complexa matriz.

Observa-se também que, as fotomicrografias dos cupons submetidos à formação de biofilme pela interação entre os gêneros (FIGURA 36), são muito parecidas às obtidas por isolados de *E. faecium* (FIGURA 32) e *E. faecalis* (FIGURA 33), não tendo sido verificado a mesma matriz densa como as obtidas pelo gênero *Pseudomonas* (FIGURAS 34 e 35). Estes resultados se devem ao fato de que, com a interação entre os isolados, houve uma inibição do desenvolvimento das bactérias do gênero *Pseudomonas*, como discutido no item 5.6.4.

5.8 Avaliação da eficiência de diferentes sanitizantes em relação ao biofilme formado

Para avaliação da eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio a 100 mg.L⁻¹, ácido peracético a 300 mg.L⁻¹ e digluconato de clorexidina a 400 mg.L⁻¹, a formação de biofilmes por isolados de *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e pela interação destes, em superfície de aço inoxidável, foi realizada a 25 °C por 3 dias de armazenamento.

As contagens médias referentes aos cupons controle, que não foram tratados com os sanitizantes, e os resultados obtidos para contagens das células recuperadas, após os cupons com os biofilmes formados terem sido submetidos à ação dos sanitizantes, são apresentados na Tabela 42.

Tabela 42. Redução da população nos biofilmes formados por *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e pela junção das espécies, após 10 minutos de contato com os sanitizantes ácido peracético, hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina

Ensaio	Isolados	População inicial*	Ácido peracético 300 mg.L ^{-1**}	Hipoclorito de sódio 100 mg.L ^{-1**}	Digluconato de clorexidina 400 mg.L ^{-1**}
1	<i>E. faecium</i>	6,04 ± 0,34	1,57 ^{c,D} ± 0,17	2,74 ^{b,A} ± 0,47	1,68 ^{c,B} ± 0,08
2	<i>E. faecalis</i>	6,01 ± 0,36	3,18 ^{b,A,B,C} ± 0,87	1,40 ^{c,B,C} ± 0,33	1,72 ^{c,B} ± 0,01
3	<i>P. fluorescens</i>	6,01 ± 0,36	2,28 ^{b,B,C,D} ± 0,24	1,02 ^{c,C} ± 0,27	0,67 ^{c,D} ± 0,43
4	<i>P. aeruginosa</i>	6,39 ± 0,34	1,84 ^{b,C,D} ± 0,70	1,82 ^{b,B,C} ± 0,26	1,12 ^{b,B} ± 0,66
5***	<i>E. faecium</i> + <i>E. faecalis</i>	5,36 ± 0,47	3,84 ^{b,A} ± 0,12	2,11 ^{c,A,B} ± 0,01	1,13 ^{c,B} ± 0,95
6***	<i>P. fluorescens</i> + <i>P. aeruginosa</i>	3,61 ± 0,98	3,10 ^{a,A,B,C} ± 0,16	2,99 ^{a,A} ± 0,24	3,05 ^{a,A} ± 0,15
7***	<i>E. faecium</i> + <i>E. faecalis</i> + <i>P. fluorescens</i> + <i>P. aeruginosa</i>	5,64 ± 0,05	3,30 ^{b,A,B} ± 0,53	1,18 ^{c,C} ± 0,35	1,92 ^{c,B} ± 0,85

*Contagem em logUFC.cm⁻² ± Desvio padrão, após a formação dos biofilmes a 25°C por 3 dias

**Número de reduções decimais em logUFC.cm⁻² ± Desvio padrão

*** Os ensaios 5, 6 e 7 correspondem as contagens realizadas para avaliação do biofilme multi-espécie

Médias seguidas de letras minúsculas iguais sobrescritas para uma mesma linha, não diferem entre si (p>0,05) pelo teste Tukey.

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais sobrescritas para uma mesma coluna, não diferem entre si (p>0,05) pelo teste Tukey.

Os resultados apresentados na Tabela 42 permitem observar que houve a redução na contagem dos biofilmes formados por *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e pela junção destes micro-organismos, mas estes não foram eliminados, embora os sanitizantes tenham sido utilizados nas concentrações recomendadas pelos fabricantes e frequentemente utilizadas nas indústrias de alimentos.

Observa-se que para a avaliação da ação dos sanitizantes em relação ao biofilme formado pela junção das espécies *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, a contagem das bactérias do gênero *Pseudomonas* foi em média

de 3,61 logUFC.cm⁻², o que caracteriza apenas o processo de adesão e não a formação de biofilme. Neste caso, os valores observados para as reduções médias promovidas pela ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio, ácido peracético e digluconato de clorexidina, foram próximas as contagens iniciais, o que demonstra que as bactérias do gênero *Pseudomonas* aderidas foram eliminadas na quase totalidade.

Segundo Jessen e Lammert (2003), a remoção de micro-organismos de superfícies de contato torna-se muito mais complicada após a formação do biofilme, e geralmente este procedimento só será possível pela adoção de várias ações combinadas. Dificilmente a utilização de um único sanitizante será capaz de removê-lo completamente.

Assim os micro-organismos sobreviventes poderão se desenvolver rapidamente, principalmente se houver a presença de resíduos, contaminando os alimentos processados.

O ácido peracético foi estatisticamente mais eficiente ($p < 0,05$) na redução decimal dos biofilmes formados por *E. faecalis*, *P. fluorescens* e nas contagens total de bactérias do gênero *Enterococcus* no biofilme multi-espécies.

O hipoclorito de sódio promoveu maior redução no número de células aderidas ($p < 0,05$) apenas para a avaliação do biofilme formado por isolados de *E. faecium*. Resultados semelhantes foram obtidos por Oviedo (1996) que observou maior eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio (100 mg.L⁻¹) e quaternário de amônio (1%) na redução de biofilme formado por *E. faecium*, em comparação ao ácido peracético (300 mg.L⁻¹) e clorexidina (solução 1:1000).

É possível observar pela Tabela 42, que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no número de reduções decimais promovido pela ação do ácido peracético em relação aos biofilmes formados apenas por *E. faecalis* e os ensaios 5, 6 e 7 referentes a junção das espécies. As menores taxas de redução promovidas pela ação deste sanitizante foram observadas para os biofilmes formados por *E. faecium*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*.

Para o hipoclorito de sódio, as maiores reduções foram observadas nos biofilmes formados por *E. faecium*, e pelas contagens de bactérias do gênero

Pseudomonas e bactérias do gênero *Enterococcus* no biofilme multi-espécies. As menores reduções foram verificadas para os biofilmes formados por *P. fluorescens* e pela contagem total do biofilme multi-espécie.

O digluconato de clorexidina foi estatisticamente mais eficiente em relação aos demais sanitizantes, com maior redução decimal nas contagens das bactérias do gênero *Pseudomonas* referente a formação de biofilme multi-espécies. No entanto, a menor taxa de redução foi observada para o biofilme composto apenas por isolados de *P. fluorescens*.

Dentre os sanitizantes utilizados nesta pesquisa, de forma geral, os melhores resultados para redução das contagens dos biofilmes formados, nos diferentes ensaios, foram observados a partir da utilização do ácido peracético.

Segundo Rossoni e Gaylarde (2000), este sanitizante é considerado um dos mais efetivos no combate a biofilmes bacterianos e sua alta eficiência tem sido atribuída a grande capacidade de oxidação do material celular.

A partir da comparação entre o ácido peracético (300 mg.L⁻¹) e o hipoclorito de sódio (100 mg.L⁻¹), Mello (1997) observou reduções de 6,4 e 5,5 ciclos log de *Enterococcus faecium* aderido em cupons de prova de aço inoxidável em curva após 10 minutos de contato, respectivamente. O tempo necessário para redução de 5 ciclos log deste micro-organismo foi de aproximadamente 9 minutos na utilização do ácido peracético e 10 minutos para o hipoclorito de sódio.

Lindsay e Von Holy (1999), compararam a redução de *P. fluorescens* aderida a superfícies de aço inoxidável e poliuretano, pela ação de ácido peracético e digluconato de clorexidina. Os autores observaram que independentemente da superfície, o ácido peracético apresentou melhores resultados, com redução de aproximadamente 3 ciclos log.

Alguns estudos destacam a eficiência do ácido peracético, em comparação a outros sanitizantes, na redução de biofilmes formados por micro-organismos causadores de doenças transmitidas via alimentos. A ação de hipoclorito de sódio a 100 mg.L⁻¹ e ácido peracético nas concentrações de 100, 200 e 400 mg.L⁻¹ na redução na contagem de biofilmes formados por *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, em superfícies de aço

inoxidável e PVC, foi observada por Park et al. (2012). O ácido peracético foi considerado o sanitizante mais eficiente, sendo os melhores resultados observados nas concentrações de 200 e 400 mg.L⁻¹.

Meira et al. (2012), avaliaram a capacidade dos sanitizantes ácido peracético a 30 mg.L⁻¹ e hipoclorito de sódio a 250 mg.L⁻¹, na remoção de biofilme de *Staphylococcus aureus*, isolado de serviço de alimentação, em superfícies de aço inoxidável e polipropileno. Os autores observaram reduções que variaram de 2,0 a 3,3 e 1,5 a 2,1 logUFC.cm⁻² devido a ação do ácido peracético e hipoclorito de sódio, respectivamente.

No entanto, de acordo com Hood e Zottola (1997) a comparação entre resultados de estudos de eficiência de sanitizantes é complicada devido a grande variedade nas condições para a aderência e desenvolvimento do biofilme, podendo interferir na ação do agente sanitizante.

Além disso, fatores inerentes à genética dos micro-organismos envolvidos, como as variações entre gêneros e dentro de uma mesma espécie, bem como variações nas características das superfícies de contato, tempo e temperatura de exposição, entre outros, podem interferir na ação dos sanitizantes. Assim um mesmo sanitizante pode ser mais ou menos efetivo em relação a outro, de acordo com a situação de exposição.

Em estudo realizado por Rossoni e Gaylarde (2000), o hipoclorito de sódio em concentrações de 100 e 200 mg.L⁻¹ foi mais efetivo na redução de biofilmes de *E. coli*, *P. fluorescens* e *S. aureus* aço inoxidável, quando comparado ao ácido peracético nas concentrações de 250 e 1000 mg.L⁻¹. Guerreiro-Tanomaru et al. (2011) observaram que os sanitizantes hipoclorito de sódio a 2,5% e clorexidina a 2% foram mais efetivos na redução de *E. faecalis* causadores de infecções odontológicas, quando comparado ao ácido peracético a 1%.

Estas diferenças evidenciam a necessidade da utilização de sanitizantes adequados a cada processo, e da importância da adoção de ferramentas preventivas, como as Boas Práticas de Fabricação, Procedimentos Padrão de Higiene Operacional e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, já que uma vez formado o biofilme, sua remoção torna-se muito mais complicada.

6 CONCLUSÕES

- ❖ Bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas* estão comumente presentes na matéria-prima e no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal.
- ❖ Tanto o aumento do tempo, quanto da temperatura promoveram a elevação das contagens de mesófilos aeróbios, *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp., de forma significativa ($p < 0,05$).
- ❖ Dentre os isolados de bactérias do gênero *Enterococcus*, *E. faecalis* foi a espécie predominante nas amostras de leite cru, queijo e ambiente de processamento, coletadas na indústria avaliada, e nas amostras de Leite Cru 4. Para os isolados de bactérias do gênero *Pseudomonas*, *P. fluorescens* foi a espécie predominantes em todas as amostras.
- ❖ Bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas* isoladas a partir das coletas realizadas na indústria de laticínios e das amostras de leite cru 3 e 4, foram capazes de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas, frequentemente associadas à deterioração de produtos lácteos. Dos isolados pertencentes ao gênero *Enterococcus*, 49,52 e 38,75% apresentaram resultados positivos para produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, respectivamente. Para o gênero *Pseudomonas* estes percentuais foram de 71,29 e 98,38%, respectivamente.
- ❖ Foi possível a adesão e formação de biofilmes por *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e pela interação destas espécies, em aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4 e rugosidade de 0,366 μm .
- ❖ As bactérias do gênero *Enterococcus* apresentam capacidade de inibição das bactérias do gênero *Pseudomonas*, durante a formação de biofilmes pela interação entre as espécies.
- ❖ Os fatores temperatura e tempo de contato tiveram influência significativa no processo de adesão e formação de biofilmes mono e multi-espécies pelas bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas*.

❖ Embora os sanitizantes hipoclorito de sódio 100 mg.L^{-1} CRT, ácido peracético 300 mg.L^{-1} APA e digluconato de clorexidina 400 mg.L^{-1} DC tenham sido utilizados nas concentrações recomendadas pelos fabricantes e frequentemente utilizadas nas indústrias de alimentos, em praticamente todos os tratamentos, houve apenas a redução da contagem bacteriana dos biofilmes, mas não a eliminação destes.

REFERÊNCIAS

ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Heat Resistant Proteases Produced in Milk by Psychrotrophic Bacteria of Dairy Origin. **Journal Dairy Science**, v.58, n.6, p.828-834, 1975.

AKUTSU, C.K. **Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado**. 2001.83f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, p.83, 2001.

ALASRI, A.; ROQUES, C.; MICHEL, G.; CABASSUD, C.; APTEL, P. Bacterial properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n.7, p.635-642, 1992.

AL-AHMAD, A.; MAIER, J.; FOLLO, M.; TECHNICIAN, B.S.; WITTMER, A.; HELLWIG, E.; HÜBNER, J.; JONAS, D. Food-borne *Enterococci* Integrate Into Oral Biofilm: An In Vivo Study. **Journal of Endodontics**, v.36, n.11, p.1812-1819, 2010.

ANDRADE, N. J.; AJAO, D. B.; ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. **Journal of Food Protection**, v.61, p. 1454-1458, 1998.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo (SP): Varela, 2008. 410p.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo(SP): Varela, 2008. 410p.

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

ANDREATTA, E. **Avaliação da qualidade dos queijos Minas Frescal e tipo Mussarela produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas.** 110f. 2006. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, p. 110, 2006.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AWWA – AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION; WPCF – WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. **Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater.** 21th ed., Washington: American Public Health Association, 2005.

ARAÚJO, F.D.S.; ESPER, L.M.R.; KUAYE, A.Y.; SIRCILI, M.P.; MARSAIOLI, A.J. N-Acyl-homoserine Lactones from *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and Their Degradation by *Bacillus cereus* Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.585-592, 2012.

ARAÚJO, T.F. **Caracterização e identificação de *Enterococcus* spp. Isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Minas Artesanal da região da Canastra, Minas Gerais.** 2008. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, p.63, 2008.

ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; LANGE, C.C.; MAGALHÃES, M.M.A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.

AYLWARD, E.B.; O'LEARY, J.; LANGLOIS, B.E. Effect of Milk Storage on Cottage Cheese Yield. **Journal Dairy Science**, v.63, p.1819-1825, 1980.

BAGGE, N.; SCHSTER, M.; HENTZER, M.; CIOFU, O.; GIVSKOV, M.; GREENBERG, E.P.; HØIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -Lactamase and Alginate production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.4, p.1175-1187, 2004.

BANKS, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; PHILLIPS, J.D.; MUIR, D.D. A comparison of the effects of storage of raw milk at 2°C and 6 °C on the yield and quality on Cheddar cheese. **Food Microbiology**, v.5, p.9-16, 1988.

BEDELTA VANA, A.; HAGHKHAH, M.; NAZER, A. Phenotypic characterization and PCR-ribotyping of *Pseudomonas fluorescens* isolates in tracking contamination routes in the production line of pasteurized milk. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.11, n.3, p.222-232, 2010.

BELTRAME, C.A.; KUBIAK, G.B.; LERIN, L.A.; ROTTAVA, I.; MOSSI, A.J.; OLIVEIRA, D.; CANSIAN, R.L.; TREICHELL, H. TONIAZZO, G. Influence of different sanitizer on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.2, p.228-233, 2012.

BERESFORD, M.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.1000-1005, 2001.

BLASCHEK, H.P.; WANG, H.H.; AGLE, M.E. **Biofilms in the Food Environment**. 5th ed., Ames (Iowa – USA):Blackwell Publishing, 2007. 208p.

BOARI, C. A.; ALVES, M.P.; TEBALDI, V.M.R.; SAVIAN, T.V.; PICCOLI, R.H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p.886-895, 2009.

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

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

BRADLEY, C.R.; FRAISE, A.P. Heat and chemical resistance of enterococci. **Journal of Hospital Infection**, v.34, p.191-196, 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Regulamento Técnico de Identidade e**

Qualidade de Leite Cru Refrigerado, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.

BROWN, V.I.; LOWBURY, J.L. Use of an improved cetremid agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Pathology**, v.18, p.752-756, 1965.

CABEÇA, T.K.; PIZZOLITTO, A.C.; PIZZOLLITO, E.L. Assessment of action of disinfectants against *Listeria monocytogenes* biofilms. **Revista Alimentos e Nutrição - Araraquara**, v.17, n.2, p.121-125, 2006.

CAIXETA, D.S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável.** 2008.75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, p.75, 2008.

CARDOSO, R.R. **Influência da microbiota psicrótrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração.** 2006. 43f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, p.43, 2006.

CARELI, R.T.; ANDRADE, N.J.; SOARES, N.F.; JÚNIOR, J.I.R.; ROSADO, M.S.; BERNARDES, P.C. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.1, p.171-176, 2009.

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

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da Microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas.** 2007. 154f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 154p., 2007.

CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. **International Dairy Journal**, v.7, p.119-127, 1997.

CHARACKLIS, W. G. Laboratory biofilm reactors. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (Eds.). **Biofilms**. New York: John Wiley and Sons, 1990.

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

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

CHINGWARU, W.; MPUCHANE, S.F.; GASHE, B.A. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance. **Journal of Food Protection**, v.66, n.6, p.931-936, 2003.

CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HAVARSTEIN, L.S.; HERNÁNDEZ, P.E.; NES, I.F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, p.4321-4330, 1997.

CLONTZ, L. A contaminação microbiana pode causar uma redução de fluxo e corrosão das linhas do sistema de água. **Revista Controle de Contaminação**, n.109, 2008.

COLLINS, E.B. Heat Resistant Psychrotrophic Microorganisms. **Journal Dairy Science**, v.64, p.157-160, 1981.

CORNELIS, P. ***Pseudomonas* – Genomics and Molecular Biology**. 1^a ed., Norfolk (UK): Caister Academic Press, 2008. 264p.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SOCOTT, H. M. Microbial Biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, V.49, p.711-745, 1995.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products. – A review.. **Journal of Food Protection**, v.45, n.2, p.172-207, 1982.

CRAVEN, H.M.; MACAULEY, B.J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. 1. Identification of types. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.47, n.5, p.38-45, 1992.

CRIADO, M. T.; SUÁREZ, B.; FERREIRÓS, C. M., The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. **Food technology**, v.48, n.2, p.123-126, 1994.
DATTA, N.; DEETH, H.C. Age Gelation of UHT Milk – A review. **Trans IChemE**, vol.79, Part C, 2001.

DATTA, N.; DEETH, H.C. Age Gelation of UHT Milk – A review. **Trans IChemE**, vol.79, Part C, 2001.

DEVRIESE, L.A.; POT, B.; DAMME, L.V.; KERSTERS, K.; HAESEBROUCK, F. Identification of Enterococcus species isolated from foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.187-197, 1995.

DIAS, B.M. **Influência da adição de CO₂ ao leite sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal**. 108f. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, p.108, 2009.

DINSMORE, R.P.; MEYER, S.; GARRY, F.; HIRST, H. **Sources of *Pseudomonas* spp. in Bulk Tank Milk on Colorado Dairy Farms**. Published in the Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality - Colorado State University, 2003.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.130-138, 2003.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V. ZEPPA, G. RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Microbiological characterization of artesanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.25, p.392-399, 2008.

DOMIG, K. J.; MAYER, H. K.; KNEIFEL, W., Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.147-164, 2003.

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

DOUROU, D.; AMMOR, M.S.; SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.J.E. Growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the presence of quorum sensing signaling compounds produced by spoilage and pathogenic bacteria. **Food Microbiology**, v.28, p.1011-1018, 2011.

DUPRÈ, I.; ZANETTI, S.; SCHITO, A.M.; FADDA, G.; SECHI, L.A. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.491-498, 2003.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinical relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n.1, p.24-27, 1995.

EFTHYMIU, C.J.; BACCASH, P.; LABOMBARDI, V.J.; EPSTEIN, D.S. Improved isolation and differentiation of *Enterococci* in cheese. **Applied Microbiology**, v.28, n.3, p. 417-422, 1974.

EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfection using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environement International**, v.30, p.891-900. 2004

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; GÖRAN, M. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**, v.10, p.325-331, 2000.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C.; MARCHESAN, M. A.; PÉCORA, J. D. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v.13, N.2, p.113-117, 2002.

EVANCHO, G. M.; SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; FRANK, J. F. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In: DOWNES, F.P., ITO, K.

Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 th ed. Washington : American Public Health Association (APHA), 2001, 676p.

FAGAN, E.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; JOBIM, C.C. Avaliação de padrões físico-químicos e microbiológicos do leite em diferentes fases de lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.3, p.651-660, 2008.

FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W.P.; CARBONERA, N. ARAÚJO, M.R. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.568-572, 2006.

FERNANDES, M.S. **Avaliação de riscos e de pontos críticos de contaminação por *Enterococcus* spp. E *Bacillus cereus* no processamento de ricota.** 2010. 152f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, p.152, 2010.

FERREIRA, A. E. **Estudo de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus*.** 2005. 126 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 126p., 2005.

FIORENTINO, F.A.M. **Desenvolvimento e controle de qualidade de formulação cosmética contendo digluconato de clorexidina.** 2009. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, p.164, 2009.

FLEMMING, H.C.; NEU, T.R.; WOZNIAK, D.J. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.22, p.7945-7947, 2007.

FONSECA, C.R.; PORTO, E.; DIAS, C.T.S., SUSIN, I. Qualidade do leite de cabra in natura e do produto pasteurizado armazenados por diferentes períodos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.944-949, 2006.

FONSECA, J.F.S.G. **Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em enterococos clínicos e alimentares.** 2010. 46f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade de Lisboa, p.46, 2010.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.4, p.151-154.

FOULQUIÉ-MORENO; M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.1-24, 2006.

FOX, P.F. Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. **Journal Dairy Science**, v.72, p.1379-1400, 1989.

FRANCIOSI, E.; SABBATA, G.D.; GARDINI, F.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Changes in psychrotrophic microbial populations during milk creaming to produce Grana Trentino cheese. **Food Microbiology**, v.28, p.43-51, 2011.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington: American Public Health Association, 2005. p. 271-286.

FRANK, J.F.; YOUSEF, A.E. Tests for groups of microorganisms. In: WEHR, H.M.; FRANK, J.F. **Standard methods for the examination of dairy products**. 17th ed. Washington: American Public Health Association, 2004. 570p.

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

FRANZ, C. M. A. P.; HUCH, M. ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, p.125-140, 2011.

FRANZ, C.M.A.P.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.B.; YOUSIF, N.M.K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W.H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.9, p.4385-4389, 2001.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H., Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.105-122, 2003.

FRIEDRICH, M.T.; FRANKEN, R.B.C.; AZEVEDO, M.S.; PRESTA, M.A.; AGNOL, C.D. Avaliação da estabilidade do leite *in natura* e UHT quanto ao índice de CMP. **Revista CIATEC – UFP**, v.2, n.1, p.21-27, 2010.

FUJIMOTO, G. **Estudo de fatores de virulência e propriedades tecnológicas de culturas de Enterococcus spp. isoladas de queijo de coalho**. 121f. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, p.121, 2011.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELIN, C.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, n.5, p. 372-379, 1991.

GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, 2000.

GARDINI, F. MARTUSCELLI, M. CARUSO, M.C.; GALGANO, F.; CRUDELE, M.A.; FAVATI, F.; GUERZONI, M.E.; SUZZI, G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.105-117, 2001.

GAUCHER, I.; TANGUY, G.; FAUQUANT, J.; JARDIN, J.; ROUSSEAU, F.; ROBERT, B.; MADEC, M.N.; GAUCHERON, F. Proteolysis of casein micelles by *Pseudomonas fluorescens* CNRZ 798 contributes to the destabilization of UHT milk during its storage. **Dairy Science and Technology**, v.91, p.413-429, 2011.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de Alimentos – Princípios e Aplicações**. São Paulo (SP): Nobel, 2009. 512p.

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

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWINGS, L.; COGAN, T. M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.177-188, 2001.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**, São Paulo (SP): Varela, 2003.

GIAOURIS, E. CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G.J.E. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica Enteritidis* PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. **Journal of Food Protection**, v.68, n.10, p.2149-2154, 2005.

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

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, V. 88, p. 215-222, 2003.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risk and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v.60, p.732- 738, 1997.

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

GONZÁLEZ, L.; SANDOVAL, H.; SACRISTÁN, N.; CASTRO, J.M.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food control**, v.18, p.716-722, 2007.

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

GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; MORGENTAL, R.D.; FARIA-JUNIOR, N.B.; BERBERT, F.L.C.; TANOMARU-FILHO, M. Antibacterial effectiveness of peracetic acid and conventional endodontic irrigants. **Brazilian Dental Journal**, v.22, n.4, p.285-287, 2011.

HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOTT, A.J.; DEETH, H.C. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.58, n.1, p.15-20, 2003.

HARTMAN, P. A.; DEIBEL, R. H.; SIEVERDING, L. M. Enterococci. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

HAUN, M.A.D. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens***. 2004. 71f.Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, p.71, 2004.

HAYES, J.R.; ENGLISH, L.L.; CARTER, P.J.; PROESCHOLDT, T.; LEE, K.Y.; WAGNER, D.D.; WHITE, D.G. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.12, p.7153-7160, 2003.

HOLAH, J. T.; HIGGS, C.; ROBINSON, S.; WORTHINGTON, D.; SPENCELEY, H. A conductance-based surface disinfection test food hygiene. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.255-259, 1990.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.145-153, 1997.

IRIE, Y.; STARKEY, M.; EDWARDS, A.N.; WOZNIAK, D.J.; ROMEO, T.; PARSEK, M.R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. **Molecular Microbiology**, v.78, n.1, p.158-172, 2010.

JAMET, E.; AKARY, E.; POISSON, M.A.; CHAMBA, J.F.; BERTRAND, X.; SERROR, P. Prevalence and characterization of antibiotic resistance *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food Microbiology**, v.31, n.2, p.191-198, 2012.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 7th ed., New York: Springer, 2005. 810p.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and Disinfection in Meat Processing Plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, n.4, p.265-269, 2003.

JUFFS, H.S. Identification of *Pseudomonas* spp. isolated from milk produced in South Eastern Queensland. **Journal of Applied Microbiology**, v. 36, p.585-598, 1973.

JENNES, W.; DICKS, L.M.T.; VERWOERD, D.J. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.349-357, 2000.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, v. 30, p.47-55, 2004.

KOLUMAN, A.; AKAN, L.S.; ÇAKIROĞLU, F.P. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. **Food Control**, v.20, p.281-283, 2009.

KUMAR, A.; BHUSHAN, V.; VERMA, S.; SRIVASTAV, G.; KUMAR, S. Isolation and Characterization of Microorganisms Responsible for Different Types of Food Spoilages. **International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology**, v.1, n.2, p.22-31, 2011.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic Spoilage of Raw Milk at Different Temperatures of Storage. **Journal of Applied Sciences Research**, v.3, n.11, p.1383-1387, 2007.

LAIRD, D.T.; GAMBREL-LENARZ, S.A.; SCHER, F.M.; GRAHAM, T.E.; REDDY, R. Microbial Count Methods. In: WEHR, H.M.; FRANK, J.F. **Standard methods for the examination of dairy products**. 17th ed. Washington: American Public Health Association, 2004. 570p.

LAPPIN-SCOTT, H.M. Claude E. Zobell – his life and contributions to biofilm microbiology. In: BELL, C.R.; BRYLINSKY, M.; JOHNSON-GREEN, P. **Microbial Biosystems: New frontiers**. Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecoogy, 1999.

LAW, B.A. Reviews of the progress of Dairy Science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v.46, n.3, p.573-588, 1979.

LECLERC, H.; DEVRIESE, L.A.; MOSSEL, D.A.A. Taxinomial changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.459-466, 1996.

LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.266-272, 2009.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L.R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ªed., São Paulo (SP): Atheneu, 2008. p.369-381.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Different responses of planktonic and attached *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* to sanitizer treatment. **Journal of Food Protection**, v.62, n.4, 1999.

LISITA, M.O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo Minas Frescal em uma indústria de laticínios**. 61f. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, p.61, 2005.

LITZ, V.M.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; PILOTTO, F. Anti-sepsia de mãos na indústria de carnes: avaliação da clorhexidina, triclosan e iodóforo na redução da contaminação microbiana em manipuladores. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.35, n.3, p.321-326, 2007.

MACHADO, A.D.S. **Atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em biofilmes e detecção das células por anti-soro policlonal**. 2006. 74f. Tese

(Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 74p. 2006.

MALLET, A.; KAUFFMAN, F.; CHESNEAU, C.; DESBOUE, A.; DESMASURES, N. Microbial diversity of raw milk and influence of farm practices. **10th International Meeting on Mountain Cheese**, 2011.

MAMEDE, P.L. **Efeito da temperatura de cozimento sobre as propriedades tecnológicas do Queijo de Coalho**. 2008. 79f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, p.79, 2008.

MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R., ZANETTI, S., I. DUPRÈ, SECHI, L.A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.291-304, 2003.

MARQUES, E. B. **Estudo da formação de biofilme em superfícies abióticas: influência de cátions divalentes e ocorrência de determinantes de virulência em amostras clínicas de *Enterococcus faecalis***. 2004. 136f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 136p., 2004.

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

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

MARTINS, M.L.; PINTO, C.L.O.; ROCHA, R.B.; ARAÚJO, E.F.; VANETTI, M.C.D. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.144-148, 2006.

McKELLAR, R.C. Factors influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.53, p.305-316, 1982.

MEDEIROS, A.W. **Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilme in vitro em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* sp. e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*.** 2011. 113f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.113, 2011.

MEIRA, Q.G.S.; BARBOSA, I.M.; ATHAYDE, A.J.A.A.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; SOUZA, E.L. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, v.25, n.2, p.469-475, 2012.

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

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration Biodegradation**, v.51, p.249-253, 2003.

MIDURA, T.; BRYANT, R. G. Sampling Plans, Sample Collection, Shipment, and Preparation for Analysis. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001, 676P.

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biology**, v.5, n.11, p.2458-2461, 2007.

MORALES, P.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; NUÑEZ, M. Volatile Compounds Produced in Cheese by *Pseudomonas* Strains of Dairy Origin Belonging to Six Different Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.6835-6843, 2005.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LODI, R. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from North-west italian dairy products. **International Dairy Journal**, v.16, p.867-875, 2006.

MORAIS, P.V.; MESQUITA, C.; ANDRADE, J.L.; COSTA, M. Invertigation of persistente colonization by *Pseudomonas aeruginosa* – Like strains in a spring

water bottling plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.3, p.851-856, 1997.

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

NIELSEN, S.S. Plasmin System and Microbial Proteases in Milk: Characteristics, Roles, and Relationship. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6628-6634, 2002.

NÖRNBERG, M.F.B.L.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrófilas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, n.2, p.157-163, 2009.

NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.576-582, 1999.

OVIEDO, M.T. **Resistência de psicrófilo acidificante isolado de leite cru a agentes sanitizantes**. 1996, 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, p.51, 1996.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, A. S.; SOARES, N. F. F. S.; SILVA, A. M. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77-83, 2004.

PARK, S.H.; CHEON, H.L.; PARK, K.H.; CHUNG, M.S.; CHOI, S.H.; RYU, S.; KANG, D.H. Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v.154, p.130-134, 2012.

PEÑA, W E. L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã**. 2005. 355f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência de alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 355p., 2005.

PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of a

anaerobic consortium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 181-186, 2000.

PERKO, B. Effect of prolonged storage on microbiological quality of raw milk. **Mljekarstvo**, v.61, n.2, p.114-124, 2011.

PERRI, J.M. **Bactérias do gênero *Enterococcus* em queijo de coalho: influência do processamento na seleção microbiana, perfil tecnológico e implicações em segurança de alimentos**. 2010. 82f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, p.82, 2010.

PINTO, C.L.O. **Bactérias psicrótróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT**. 2004. 97f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, p.97, 2004.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrótróficas proteolíticas. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, nº3, p.645-651, 2006.

PINTO, U.M. **Quorum sensing em bactérias psicrótróficas proteolíticas isoladas de leite**. 2005.70f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, p.70, 2005.

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

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensm. – Wiss.u.-Technology**, v.32, p.321-326, 1999.

RAMOS, J.L.; FILLoux, A. ***Pseudomonas* – A model System in Biology**. New York (NY): Springer, v.5, 2007. 464p.

RAMOS, J.M.S. **Efeito da refrigeração em leite de ovelha – evolução da flora microbiana e efeito na aptidão tecnológica para queijo**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, p.82, 2009.

RESENDE, M.F.S.; COSTA, H.H.S.; ANDRADE, E.H.P.; ACÚRCIO, L.B.; DRUMMOND, A.F.; CUNHA, A.F.; NUNES, A.C.; MOREIRA, J.L.S.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326p.

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

ROSADO, M. S.; ANDRADE, N. J.; PENA, W. E. L.; CARELI, R. T.; PIAZZA, J. L.; MINIM, L. A. Modeling *Pseudomonas fluorescens* biofilm formation on marble, granite and stainless steel as a function of time and temperature. **Journal of Food Process Engineering**, v.34, n.5, p.1623-1638, 2011.

ROSADO, M.S. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: Caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes sanitizantes**. 2009. 84f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, p.84, 2009.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.81-85, 2000.

SANABE, M.E.; MOTISUKI, C.; NEGRINI, T.C.; SPOLIDORIO, D.M.P.; HEBLING, J. Efeito da aplicação da clorexidina no controle de estreptococos mutans do biofilme oclusal. **Brazilian Journal Health**, v.1, n.1, p.37-46, 2010.

SANVIDO, G.B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, p.78, 2007.

SANTOS, P.A.; SILVA, M.A.P.; MOREIRA, G.N.; BARROS, J.C.; OLIVEIRA, A.N.; NICOLAU, E.D. Evolução da proteólise do leite inoculado in vitro com *Pseudomonas fluorescens*. **Boletim CEPPA**, v.28, n.2, p.313-320, 2010.

SARANTINOPOULOS, P. ANDRIGHETTO, C.; GEORGALAKI, M.D.; REA, M.C.; LOMBARDI, A.; COGAN, T.M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v.11, p.621-647, 2001.

SARANTINOPOULOS, P. KALANTZOPOULOS, G. TSAKALIDOU, E. Citrate Metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.12, p.5482-5487, 2001.

SCARPELLINI, M.; FRANZETTI, L.; GALLI, A. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. **FEMS Microbiology Letters**, v.236, p. 257-260, 2004.

SCHNEIDER, R. P. Biofilmes Microbianos. **Revista Microbiologia in foco – Sociedade Brasileira de Microbiologia**, 2007.

SILVA, A.M.S.; RIVAS, P.M.; ZANELA, M.B.; PINTO, A.T.; RIBEIRO, M.E.R.; SILVA, F.F.P.; MACHADO, M. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma Granja Leiteira no RS. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, n.1, p.51-57, 2010a.

SILVA, L.C.C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; D'OVIDIO, L.; MATTOS, M.R.; ARRUDA, A.M.C.T.; PIRES, E.M.F. Rastreamento de fontes de contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Ciências Agrárias**, v.32, n.1, p.267-276, 2011.

SILVA, M.A.P.; SANTOS, P.A.; LEÃO, K.M.; NEVES, R.B.S.; GUIMARÃES, K.C.; NICOLAU, E.S. Qualidade do leite na indústria de laticínios. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, p.23-28, 2010b.

SILVA, M.R.; SACANAVACCA, J.; GANDRA, A.K.V.; SEIXAS, F.A.; GANDRA, E.A. Avaliação higiênico-sanitária do leite produzido em Umuarama (Paraná). **Boletim do CEPPA**, v.28, n.2, p. 271-280, 2010c.

SILVA, P.D.L. **Avaliação, identificação e atividade enzimática de bactérias psicrotróficas presentes no leite cru refrigerado.** 118f. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, p.118, 2005.

SIRAGUSA, G.R. Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria species* by *Enterococcus hirae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.11, p.3508-3513, 1992.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Journal Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.35-41, 1997.

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

SPIPKER, T.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J. PCR-Based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.5, p.2074-2079, 2004.

SREBERNICH, S. M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.744-750, 2007.

STONE, L. S.; ZOTTOLLA, E. A. Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and its attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**, v.50, p. 957-960, 1985.

SUZZI, G.; CARUSO, M.; GARDINI, F.; LOMBARDI, A.; VANNINI, L. GUERZONI, M.E.; ANDRIGHETTO, C.; LANORTE, M.T. A survey of the enterococci isolated from na artisanal italian goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of Applied Microbiology**, v.8, p.267-274, 2000.

TEBALDI, V.M.R.; OLIVEIRA, T.L.C.; BOARI, C.A.; PICCOLI, H. Isolamento de Coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.753-760, 2008.

TEIXEIRA, L.M.; MERQUIOR, V.L.C.; TRABULSI, L.R. *Enterococcus faecalis*. In: In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ªed., São Paulo (SP): Atheneu, 2008. p.369-381.

TEMELLI, S.; ANAR, S.; SEN, C.; AKYUVA, P. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. **Food Control**, v,17, p. 856-861, 2006.

THOMAS, L.; MAILLARD, J.Y.; LAMBERT, R.J.W.; RUSSELL, A.D. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a residual concentration. **Journal of Hospital Infection**, v.46, p.297-303, 2000.

TOPÇU, A.; NUMANOĞLU, E.; SALDAMLI, I. Proteolysis and storage stability of UHT milk produced in Turkey. **International Dairy Journal**, v.16, p.633-638, 2006.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre (RS): Artmed, 2012, 934p.

TROLLER, J. A. **Sanitation in Food Processing**. 2th Ed. Academic Press, 1993. 456p.

UBBINK, J.; ZAMMARETTI, P. S. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, p. 263-270, 2007.

VANETTI, C. A.; CEOTTO FILHO, G.; ALVES, E.; ANDRADE, N. J. Técnicas em microscopia usadas no estudo da adesão e da formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo (SP): Varela, 2008. 400p.

VERDI, R.J.; BARBANO, D.M.; DELLAVALLE, M.E.; SENYK, G.F. Variability in True Protein, Casein, Nonprotein Nitrogen, and Proteolysis in High and Low Somatic Cell Milks. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.2, p.230-242, 1987.

VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de Quorum Sensing em biofilmes formados por bactérias psicotróficas isoladas de leite**. 2006. 176f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 176 p., 2006.

VIDAL-MARTINS, A.M.; SALOTTI, B.; ROSSI JUNIOR, O.D.; PENNA, A.L. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.698-704, 2005.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**, 2nd ed., Boca Raton (FL – USA): CRC Taylor & Francis, 2006. 782p.

WANG, J.J.; FRANK, J.F. Characterization of Psychrotrophic Bacterial Contamination in Commercial Buttermilk. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.2154-2160, 1981.

WANG, L.; JAYARAO, B.M. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from Bulk Tank Milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1421-1429, 2001.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview – Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 2675-2679, 2000.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINENE, S.S.; RALYEA, R.; BOOR, K.J. Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.5, p.2085-2095, 2000.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial Evaluation of the Biotransfer Potential from Surfaces with *Bacillus* Biofilms after Rinsing and Cleaning Procedures in Closed Food-Processing Systems. **Journal of Food Protection**, v.59, n.7, p.727-733, 1996.

WONG, A.C.L. Biofilms in Food Processing Environments. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2765-2770, 1998.

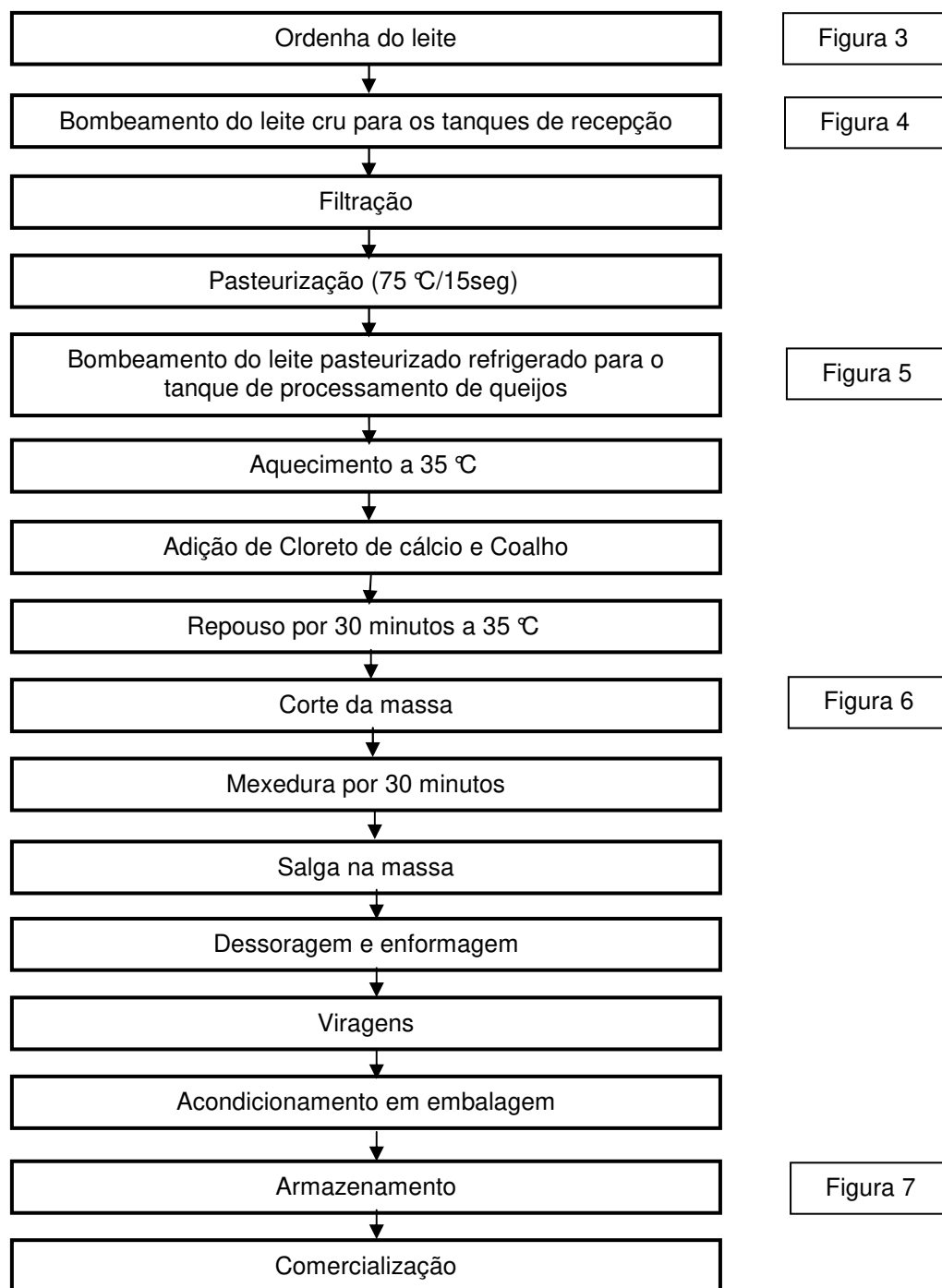
ZOBELL, C.E. The Effect of Solid Surfaces Upon Bacterial Activity. **Journal of Bacteriology**, v.46, p.39-56, 1943.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A

- Fluxograma de produção do queijo Minas Frescal na indústria avaliada



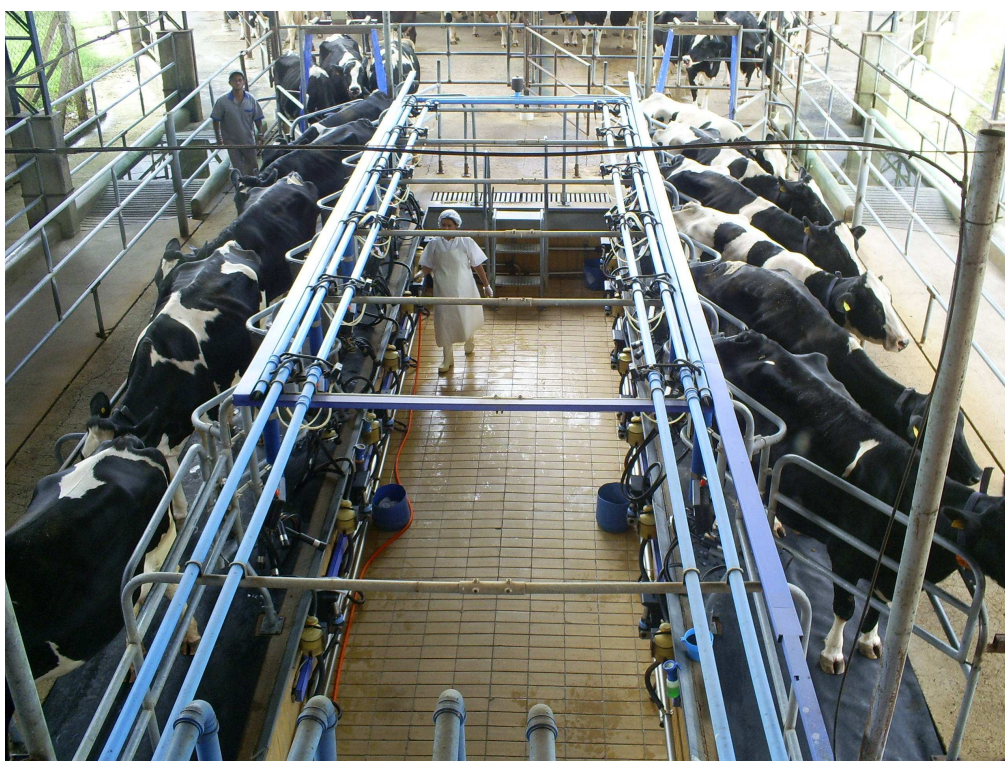


Figura 3.Ordenha do leite tipo A destinado a produção do queijo Minas Frescal



Figura 4. Tanques de recepção do leite cru, localizados na sala de recepção



Figura 5. Recebimento do leite pasteurizado refrigerado no tanque de processamento de queijo Minas Frescal

a



b



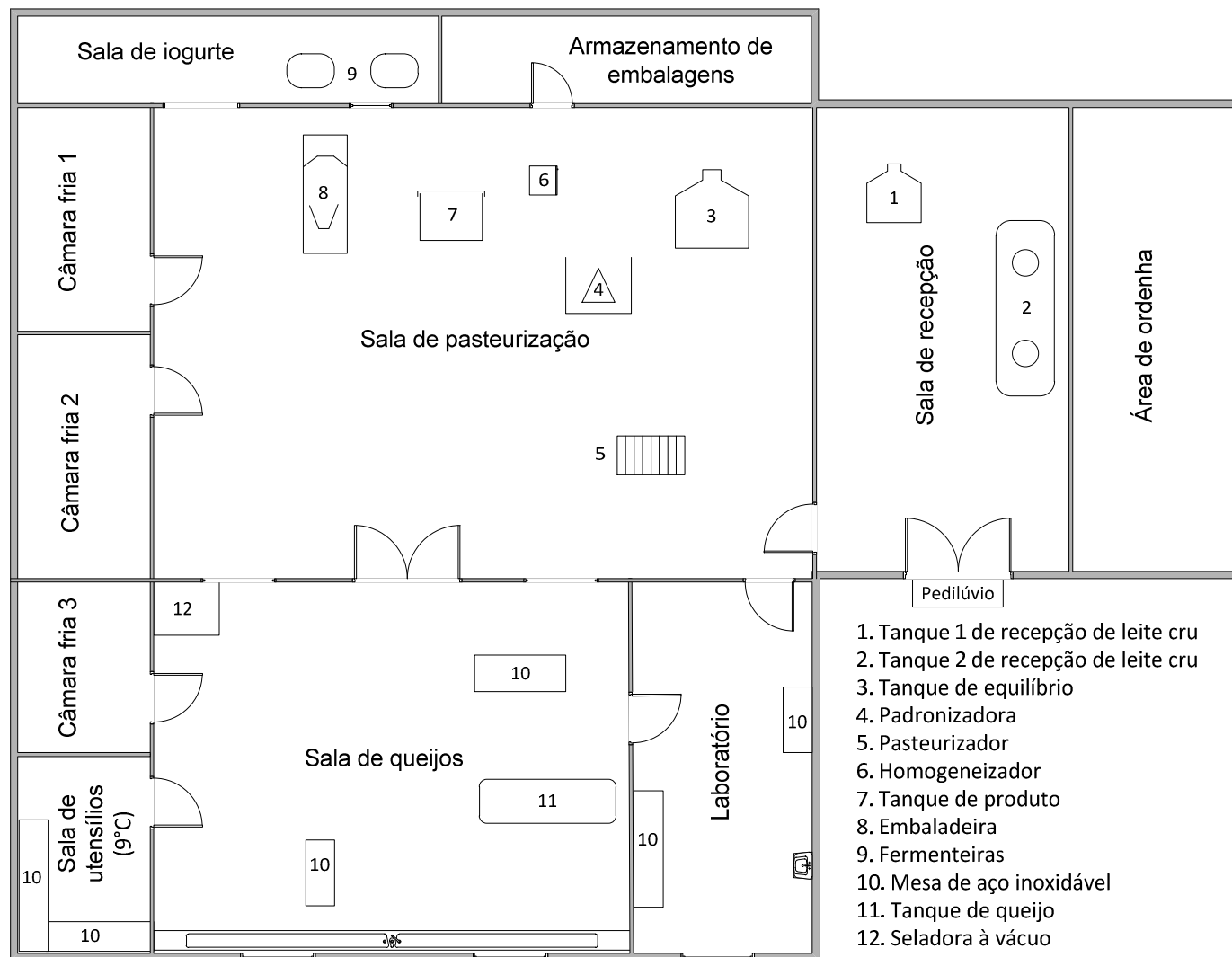
Figura 6. Verificação do ponto de corte (a) e corte (b) da massa do queijo durante o processamento do queijo Minas Frescal



Figura 7. Armazenamento dos queijos Minas Frescal embalados em câmara fria a 5 °C

APÊNDICE B

❖ Croqui da planta da processamento de queijo Minas Frescal da indústria avaliada



- ❖ Fotos de algumas das amostras de superfícies do ambiente de processamento



Figura 8. Mesa em aço inoxidável localizada na sala de processamento de queijos



Figura 9. Estante em polipropileno localizada na câmara fria de armazenamento do queijo Minas Frescal



Figura 10. Seladora à vácuo para acondicionamento dos queijos Minas Frescal em embalagens de polietileno, localizada na sala de processamento de queijo



Figura 11. Equipamento utilizado na ordenha mecânica para obtenção do leite destinado ao processamento de queijo Minas Frescal

a



b



Figura 12. Maçanetas localizadas na câmara fria (a) e sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C (b))



Figura 13. Mangueira conectada ao equipamento de bombeamento de leite, localizada na sala de processamento de queijos



Figura 14. Pisos localizados nas salas de recepção (a), pasteurização (b), queijos (c), armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C) (d), câmara fria (e) e sala de ordenha (f)



Figura 15. Paredes localizadas nas salas de recepção (a), pasteurização (b), queijos (c), armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C) (d), câmara fria (e) e sala de ordenha (f)



Figura 16. Ralos localizados nas salas de processamento de queijos (a) e armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C)(b)



Figura 17. Rodo localizado nas sala de armazenamento dos utensílios para produção do queijo (refrigerada a 9 °C)

a



b



Figura 18. Tanque de processamento do queijo Minas Frescal (a), localizado na sala de processamento de queijos, com destaque para o dreno de saída do soro (b)

a



b



Figura 19. Tanques de recepção do leite cru, localizados na sala de recepção do leite cru. Tanque 1 (a) e Tanque 2 (b)



Figura 20. Fôrmas em polietileno, com capacidade para 0,5kg, utilizadas no processamento de queijo Minas Frescal



Figura 21. Lira em aço inoxidável utilizada no processamento de queijo Minas Frescal



Figura 22. Mexedor em aço inoxidável utilizado no processamento de queijo Minas Frescal



Figura 23. Termômetro digital utilizado no processamento de queijo Minas Frescal

Apêndice C

Tabela 43. Resultados dos testes bioquímicos e da técnica da PCR para confirmação e identificação das bactérias do gênero *Enterococcus* isoladas de matéria-prima, produtos e ambiente de processamento de produtos lácteos

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E1	Leite cru - tanque 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E2	Leite cru - tanque 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E3	Leite cru - tanque 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E4	Leite cru - tanque 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E5	Leite cru - tanque 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E6	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E7	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E8	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E9	Leite cru tanque 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E10	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E11	Queijo 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E12	Queijo 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E13	Queijo 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E14	Queijo 1 (1º dia)	+	-	-	+	+	+	-			
E15	Queijo 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E16	Queijo 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E17	Queijo 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							Continuação ...		
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina	PCR	PCR	Outras
									<i>E.faecium</i>	<i>E.faecalis</i>	espécies do gênero
E18	Queijo 2 (1º dia)	+	-	-	+	+	+	-			
E19	Queijo 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E20	Queijo 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E21	Queijo 5 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E22	Queijo 5 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E23	Queijo 5 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E24	Queijo 5 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E25	Queijo 5 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E26	Ralo – interior sala de queijos	+	-	-	+	+	+	+			
E27	Ralo – interior sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+		+	
E28	Ralo – interior sala de queijos	+	-	-	-	-	+	-			
E29	Ralo – interior sala de queijos	+	-	-	+	+	+	-			
E30	Ralo – interior sala de queijos	+	-	-	+	+	+	-			
E31	Equipamento de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E32	Equipamento de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E33	Equipamento de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E34	Equipamento de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E35	Equipamento de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E36	Termômetro – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	-			
E37	Termômetro – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	-			
E38	Termômetro – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+		+	
E39	Termômetro – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+		+	
E40	Termômetro – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+		+	

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E41	Maçaneta – câmara fria	+	-	+	+	+	+	+			+
E42	Maçaneta – câmara fria	+	-	+	+	+	+	+	+		
E43	Maçaneta – câmara fria	+	-	+	+	+	+	+		+	
E44	Maçaneta – câmara fria	+	-	+	+	+	+	-			
E45	Maçaneta – câmara fria	+	-	+	+	+	+	+		+	
E46	Maçaneta – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+			+
E47	Maçaneta – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+		+	
E48	Maçaneta – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+			+
E49	Maçaneta – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+			+
E50	Maçaneta – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+		+	
E51	Leite cru tanque 1 – após 2 dias a 7°C	+	-	+	+	+	+	+		+	
E52	Leite cru tanque 1 – após 2 dias a 7°C	+	-	+	+	+	+	+		+	
E53	Leite cru tanque 1 – após 2 dias a 7°C	+	-	+	+	+	+	+		+	
E54	Leite cru tanque 1 – após 2 dias a 7°C	+	-	+	+	+	+	+		+	
E55	Leite cru tanque 1 – após 2 dias a 7°C	+	-	+	+	+	+	+		+	
E56	Leite cru tanque 2 –após 2 dias a 7 °C	+	-	+	+	+	+	+		+	
E57	Leite cru tanque 2 –após 2 dias a 7 °C	+	-	+	+	+	+	+		+	
E58	Leite cru tanque 2 –após 2 dias a 7 °C	+	-	+	+	+	+	+		+	
E59	Leite cru tanque 2 –após 2 dias a 7 °C	+	-	+	+	+	+	+		+	
E60	Leite cru tanque 2 –após 2 dias a 7 °C	+	-	+	+	+	+	+		+	
E61	Leite Cru 3(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E62	Leite Cru 3(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E63	Leite Cru 3(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+	+		

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E64	Leite Cru 3(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E65	Leite Cru 3(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E66	Leite Cru 3(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E67	Leite Cru 3(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E68	Leite Cru 3(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E69	Leite Cru 3(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E70	Leite Cru 3(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E71	Soro de queijo- leite 3	+	-	+	+	+	+	+	+		
E72	Soro de queijo- leite 3	+	-	+	+	+	+	+		+	
E73	Soro de queijo- leite 3	+	-	-	+	+	+	+			
E74	Soro de queijo- leite 3	+	-	+	+	+	+	+		+	
E75	Soro de queijo- leite 3	+	-	+	+	+	+	+		+	
E76	Soro de queijo- leite 3	+	-	+	+	+	+	+		+	
E77	Soro de queijo- leite 3	+	-	+	+	+	+	+		+	
E78	Soro de queijo- leite 3	+	-	+	+	+	+	+		+	
E79	Soro de queijo- leite 3	+	-	+	+	+	+	+		+	
E80	Soro de queijo- leite 3	+	-	+	+	+	+	+		+	
E81	Ar recepção	+	-	+	+	+	+	+	+		
E82	Ar ordenha	+	-	+	+	+	+	+			+
E83	Leite cru tanque 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+			+
E84	Leite cru tanque 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E85	Leite cru tanque 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E86	Leite cru tanque 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E87	Leite cru tanque 1 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E88	Leite cru tanque 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E89	Leite cru tanque 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E90	Leite cru tanque 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E91	Leite cru tanque 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E92	Leite cru tanque 2 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E93	Equipamento de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E94	Equipamento de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E95	Equipamento de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E96	Equipamento de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E97	Equipamento de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E98	Maçaneta – câmara fria	+	-	+	+	+	+	-			
E99	Maçaneta – câmara fria	+	-	+	+	+	+	-			
E100	Maçaneta – câmara fria	+	-	+	+	+	+	+		+	
E101	Maçaneta – câmara fria	+	-	+	+	-	+	+			
E102	Maçaneta – câmara fria	+	-	+	+	+	+	+		+	
E103	Parede- sala ordenha	+	-	-	-	+	+	+			
E104	Piso – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+		+	
E105	Piso – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+			+
E106	Piso – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+	+		
E107	Piso – sala de queijos	+	-	-	+	-	+	+			
E108	Piso – sala de queijos	+	-	-	+	+	+	+			
E109	Maçaneta – sala de queijos	+	-	+	+	-	+	+			

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E110	Maçaneta – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+		+	
E111	Maçaneta – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+			+
E112	Maçaneta – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	-			
E113	Maçaneta – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+	+		
E114	Ralo – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+			+
E115	Ralo – sala de queijos	+	-	-	-	-	+	+			
E116	Ralo – sala de queijos	+	-	-	+	-	+	+			
E117	Ralo – sala de queijos	+	-	-	+	-	+	-			
E118	Ralo – sala de queijos	+	-	-	-	-	+	+			
E119	Piso – sala de ordenha	+	-	+	+	+	+	+		+	
E120	Piso – sala de ordenha	+	-	+	+	+	+	+	+		
E121	Piso – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+	+		
E122	Piso – sala de queijos	+	-	-	-		+	-			
E123	Piso – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+	+		
E124	Piso – sala de queijos	+	-	-	-	+	+	+			
E125	Piso – sala de queijos	+	-	+	+	+	+	+	+		
E126	Leite cru tanque 1 (2º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E127	Leite cru tanque 1 (2º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E128	Leite cru tanque 1 (2º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E129	Leite cru tanque 1 (2º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E130	Leite cru tanque 1 (2º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E131	Leite cru tanque 1 (2º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E132	Leite cru tanque 1 (2º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	

Continuação ...											
Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E133	Leite cru tanque1 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E134	Leite cru tanque 1 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E135	Leite cru tanque 1 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E136	Leite cru tanque 1 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E137	Leite cru tanque 1 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E138	Leite cru tanque 1 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E139	Leite cru tanque 1 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E140	Leite cru tanque 1 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E141	Leite cru tanque 2 (2º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E142	Leite cru tanque 2 (2º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E143	Leite cru tanque 2 (2º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	-			
E144	Leite cru tanque 2 (2º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E145	Leite cru tanque 2 (2º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E146	Leite cru tanque 2 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E147	Leite cru tanque 2 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E148	Leite cru tanque 2 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E149	Leite cru tanque 2 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E150	Leite cru tanque 2 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E151	Leite cru tanque 2 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E152	Leite cru tanque 2 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E153	Leite cru tanque 2 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E154	Leite cru tanque 2 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E155	Leite cru tanque 2 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+		+	

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E156	Leite cru tanque 1 (4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E157	Leite cru tanque 1 (4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E158	Leite cru tanque 1 (4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E159	Leite cru tanque 1 (4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E160	Leite cru tanque 1 (4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E161	Leite cru tanque 1 (4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E162	Leite cru tanque 1 (4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E163	Leite cru tanque 1 (4º dia a 7°C)	+	+	+	+	+	+	+			
E164	Leite cru tanque 1 (4º dia a 7°C)	+	+	+	+	+	+	+			
E165	Leite cru tanque 1 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E166	Leite cru tanque 1 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E167	Leite cru tanque 1 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E168	Leite cru tanque 1 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E169	Leite cru tanque 1 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E170	Leite cru tanque 2 (4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E171	Leite cru tanque 2 (4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E172	Leite cru tanque 2 (4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E173	Leite cru tanque 2 (4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E174	Leite cru tanque 2 (4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E175	Leite cru tanque 2 (4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E176	Leite cru tanque 2 (4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E177	Leite cru tanque 2 (4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E178	Leite cru tanque 2 (4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E179	Leite cru tanque 2 (4º dia a 7°C)	+	-	-	+	+	+	+			
E180	Leite cru tanque 2 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E181	Leite cru tanque 2 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E182	Leite cru tanque 2 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E183	Leite cru tanque 2 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E184	Leite cru tanque 2 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E185	Leite cru tanque 1 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E186	Leite cru tanque 1 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E187	Leite cru tanque 1 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E188	Leite cru tanque 1 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E189	Leite cru tanque 1 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E190	Leite cru tanque 1 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E191	Leite cru tanque 1 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E192	Leite cru tanque 1 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E193	Leite cru tanque 1 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E194	Leite cru tanque 1 (8º dia a 7°C)	+	+	+	+	-	+	+			
E195	Leite cru tanque 1 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E196	Leite cru tanque 1 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E197	Leite cru tanque 1 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E198	Leite cru tanque 1 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E199	Leite cru tanque 1 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E200	Leite cru tanque 2 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E201	Leite cru tanque 2 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	

Continuação ...											
Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E202	Leite cru tanque 2 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E203	Leite cru tanque 2 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E204	Leite cru tanque 2 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E205	Leite cru tanque 2 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E206	Leite cru tanque 2 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E207	Leite cru tanque 2 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E208	Leite cru tanque 2 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E209	Leite cru tanque 2 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E210	Leite cru tanque 2 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E211	Leite cru tanque 2 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E212	Leite cru tanque 2 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E213	Leite cru tanque 2 (8º dia a 10°C)	+	-	-	+	+	+	+			
E214	Leite cru tanque 2 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E215	Leite Cru 3 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E216	Leite Cru 3 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E217	Leite Cru 3 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E218	Leite Cru 3 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E219	Leite Cru 3 (1º dia)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E220	Leite Cru 3 (2º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E221	Leite Cru 3 (2º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E222	Leite Cru 3 (2º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E223	Leite Cru 3 (2º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E224	Leite Cru 3 (2º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E225	Leite Cru 3 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E226	Leite Cru 3 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E227	Leite Cru 3 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E228	Leite Cru 3 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E229	Leite Cru 3 (2º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E230	Leite Cru 3 (2º dia a 7ºC)	+	-	-	+	+	+	+			
E231	Leite Cru 3 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E232	Leite Cru 3 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E233	Leite Cru 3 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E234	Leite Cru 3 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E235	Leite Cru 3 (2º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E236	Leite Cru 3 (4º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E237	Leite Cru 3 (4º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E238	Leite Cru 3 (4º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E239	Leite Cru 3 (4º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E240	Leite Cru 3 (4º dia a 4ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E241	Leite Cru 3 (4º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E242	Leite Cru 3 (4º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E243	Leite Cru 3 (4º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E244	Leite Cru 3 (4º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E245	Leite Cru 3 (4º dia a 7ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E246	Leite Cru 3 (4º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E247	Leite Cru 3 (4º dia a 10ºC)	+	-	+	+	+	+	+	+		

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E248	Leite Cru 3 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E249	Leite Cru 3 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E250	Leite Cru 3 (4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E251	Leite Cru 3 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E252	Leite Cru 3 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E253	Leite Cru 3 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E254	Leite Cru 3 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E255	Leite Cru 3 (8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E256	Leite Cru 3 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E257	Leite Cru 3 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E258	Leite Cru 3 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E259	Leite Cru 3 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E260	Leite Cru 3 (8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E261	Leite Cru 3 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E262	Leite Cru 3 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E263	Leite Cru 3 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E264	Leite Cru 3 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E265	Leite Cru 3 (8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E266	Leite Cru 4(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E267	Leite Cru 4(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E268	Leite Cru 4(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E269	Leite Cru 4(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E270	Leite Cru 4(1º dia)	+	-	+	+	+	+	+		+	

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E271	Leite Cru 4(2º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E272	Leite Cru 4(2º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E273	Leite Cru 4(2º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E274	Leite Cru 4(2º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E275	Leite Cru 4(2º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E276	Leite Cru 4(2º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E277	Leite Cru 4(2º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E278	Leite Cru 4(2º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E279	Leite Cru 4(2º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E280	Leite Cru 4(2º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E281	Leite Cru 4(2º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E282	Leite Cru 4(2º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E283	Leite Cru 4(2º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E284	Leite Cru 4(2º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E285	Leite Cru 4(2º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E286	Leite Cru 4(4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E287	Leite Cru 4(4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+			+
E288	Leite Cru 4(4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E289	Leite Cru 4(4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+			+
E290	Leite Cru 4(4º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E291	Leite Cru 4(4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E292	Leite Cru 4(4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E293	Leite Cru 4(4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos							PCR <i>E.faecium</i>	PCR <i>E.faecalis</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Catalase	NaCl a 6,5%	pH 9,6	10°C	45°C	Bile Esculina			
E294	Leite Cru 4(4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E295	Leite Cru 4(4º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E296	Leite Cru 4(4º dia a 10°C)	+	-	-	+	-	+	+			
E297	Leite Cru 4(4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+	+		
E298	Leite Cru 4(4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+			+
E299	Leite Cru 4(4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E300	Leite Cru 4(4º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E301	Leite Cru 4(8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E302	Leite Cru 4(8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E303	Leite Cru 4(8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E304	Leite Cru 4(8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E305	Leite Cru 4(8º dia a 4°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E306	Leite Cru 4(8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E307	Leite Cru 4(8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E308	Leite Cru 4(8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E309	Leite Cru 4(8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E310	Leite Cru 4(8º dia a 7°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E311	Leite Cru 4(8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E312	Leite Cru 4(8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E313	Leite Cru 4(8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E314	Leite Cru 4(8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	
E315	Leite Cru 4(8º dia a 10°C)	+	-	+	+	+	+	+		+	

Apêndice D

Tabela 44. Resultados dos testes bioquímicos e da técnica da PCR para confirmação e identificação das bactérias do gênero *Pseudomonas* isoladas de matéria-prima, produtos e ambiente de processamento de produtos lácteos

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR	PCR	Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P.fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P1	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	-	+	+	+		
P2	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	-	+	+	+		
P3	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	-	+	+			+
P4	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	-	-	+			
P5	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	-	-	+			
P6	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	-	+	+		+	
P7	Leite cru tanque 1-1ª coleta	-	+	+	+		
P8	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	-	+	+	+		
P9	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	-	+	+	+		
P10	Leite cru - tanque 1 (1º dia)	-	+	+	+		
P11	Queijo 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P12	Queijo 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P13	Queijo 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P14	Queijo 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P15	Queijo 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P16	Queijo 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P17	Queijo 2 (1º dia)	-	+	+			+
P18	Queijo 2 (1º dia)	-	+	+			+

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR	PCR	Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P.fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P19	Queijo 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P20	Queijo 2 (1º dia)	-	+	+			+
P21	Equipamento de ordenha	-	+	+	+		
P22	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P23	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P24	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P25	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P26	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+	+		
P27	Maçaneta - Câmara Fria	-	+	+	+		
P28	Maçaneta - Câmara Fria	-	+	+	+		
P29	Maçaneta - Câmara Fria	-	+	+	+		
P30	Maçaneta - Câmara Fria	-	+	+			+
P31	Maçaneta - Câmara Fria	-	+	+	+		
P32	Leite cru tanque 2 - após 2 dias a 4°C	-	+	+	+		
P33	Leite cru tanque 2 - após 2 dias a 4°C	-	+	+	+		
P34	Leite cru tanque 2 - após 2 dias a 4°C	-	+	+		+	
P35	Leite cru tanque 2 - após 2 dias a 4°C	-	+	+		+	
P36	Leite cru tanque 2 - após 2 dias a 4°C	-	+	+		+	
P37	Leite Cru 3 (1º dia)	-	+	+	+		
P38	Leite Cru 3 (1º dia)	-	+	+			+
P39	Leite Cru 3 (1º dia)	-	+	+			+
P40	Leite Cru 3 (1º dia)	-	+	+			+
P41	Leite Cru 3 (1º dia)	-	+	+			+

Continuação ...

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR	PCR	Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P42	Leite Cru 3 (1º dia)	-	+	+	+		
P43	Leite Cru 3 (1º dia)	-	+	+			+
P44	Leite Cru 3 (1º dia)	-	+	+	+		
P45	Leite Cru 3 (1º dia)	-	+	+			+
P46	Leite Cru 3 (1º dia)	-	+	+	+		
P47	Soro de queijo - leite 3	-	+	+			+
P48	Soro de queijo - leite 3	-	+	+	+		
P49	Soro de queijo - leite 3	-	+	+			+
P50	Soro de queijo - leite 3	-	+	+			+
P51	Soro de queijo - leite 3	-	+	+	+		
P52	Soro de queijo - leite 3	-	+	+	+		
P53	Soro de queijo - leite 3	-	+	+	+		
P54	Soro de queijo - leite 3	-	+	+	+		
P55	Soro de queijo - leite 3	-	+	+			+
P56	Soro de queijo - leite 3	-	+	+	+		
P57	Leite cru tanque 1 (1º dia)	-	+	+	+		
P58	Leite cru tanque 1 (1º dia)	-	+	+		+	
P59	Leite cru tanque 1 (1º dia)	-	+	+	+		
P60	Leite cru tanque 1 (1º dia)	-	+	+			+
P61	Leite cru tanque 1 (1º dia)	-	+	+			+
P62	Leite cru tanque 1 (1º dia)	-	+	+			+
P63	Leite cru tanque 1 (1º dia)	-	+	+			+
P64	Leite cru tanque 1 (1º dia)	-	+	+			+

Continuação ...

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR		Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P65	Leite cru tanque 1 (1º dia)	-	+	+			+
P66	Leite cru tanque 1 (1º dia)	-	+	+			+
P67	Leite cru tanque 2 (1º dia)	-	+	+		+	
P68	Leite cru tanque 2 (1º dia)	-	+	+		+	
P69	Leite cru tanque 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P70	Leite cru tanque 2 (1º dia)	-	-	-			
P71	Leite cru tanque 2 (1º dia)	-	+	+			+
P72	Leite cru tanque 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P73	Leite cru tanque 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P74	Leite cru tanque 2 (1º dia)	-	+	+	+		
P75	Equipamento de ordenha	-	+	+	+		
P76	Equipamento de ordenha	-	+	+	+		
P77	Equipamento de ordenha	-	+	+	+		
P78	Equipamento de ordenha	-	+	+	+		
P79	Equipamento de ordenha	-	+	+	+		
P80	Equipamento de ordenha	-	+	+	+		
P81	Equipamento de ordenha	-	+	+		+	
P82	Equipamento de ordenha	-	+	+	+		
P83	Equipamento de ordenha	-	+	+	+		
P84	Equipamento de ordenha	-	+	+	+		
P85	Piso - sala de pasteurização	-	+	+			+
P86	Piso - sala de pasteurização	-	+	+			+
P87	Piso - sala de pasteurização	-	+	+			+

Continuação ...

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR		Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P88	Piso - sala de pasteurização	-	+	+			+
P89	Piso - sala de pasteurização	-	+	+		+	
P90	Piso - sala de pasteurização	-	+	+		+	
P91	Piso - sala de pasteurização	-	+	+		+	
P92	Piso - sala de pasteurização	-	+	+			+
P93	Piso - sala de pasteurização	-	+	+			+
P94	Piso - sala de pasteurização	-	+	+			+
P95	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P96	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+		+	
P97	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P98	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+		+	
P99	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P100	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P101	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P102	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P103	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P104	Ralo – interior sala de queijos	-	+	+			+
P105	Piso - sala de armazenamento de utensílios	-	+	+			+
P106	Piso - sala de armazenamento de utensílios	-	+	+	+		
P107	Piso - sala de armazenamento de utensílios	-	+	+	+		
P108	Piso - sala de armazenamento de utensílios	-	+	+	+		
P109	Piso - sala de armazenamento de utensílios	-	+	+	+		
P110	Piso - sala de armazenamento de utensílios	-	+	+	+		

Continuação ...

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR	PCR	Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P.fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P111	Piso - sala de armazenamento de utensílios	-	+	+			+
P112	Piso - sala de armazenamento de utensílios	-	+	+	+		
P113	Piso - sala de armazenamento de utensílios	-	+	+	+		
P114	Piso - sala de armazenamento de utensílios	-	+	+	+		
P115	Piso - sala de queijos	-	-	+		+	
P116	Piso - sala de queijos	-	+	+	+		
P117	Piso - sala de queijos	-	+	+	+		
P118	Piso - sala de queijos	-	+	+		+	
P119	Piso - sala de queijos	-	+	+		+	
P120	Piso - sala de queijos	-	+	+		+	
P121	Leite cru tanque 1 (2º dia a 4 °C)	-	-	+			
P122	Leite cru tanque 1 (2º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P123	Leite cru tanque 1 (2º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P124	Leite cru tanque 1 (2º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P125	Leite cru tanque 1 (2º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P126	Leite cru tanque 1 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P127	Leite cru tanque 1 (2º dia a 7 °C)	-	-	+			
P128	Leite cru tanque 1 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P129	Leite cru tanque 1 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P130	Leite cru tanque 1 (2º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P131	Leite cru tanque 1 (2º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P132	Leite cru tanque 1 (2º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P133	Leite cru tanque 1 (2º dia a 10 °C)	-	+	+	+		

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR	PCR	Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P.fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P134	Leite cru tanque 1 (2º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P135	Leite cru tanque 1 (2º dia a 10 °C)	-	+	+		+	
P136	Leite cru tanque 2 (2º dia a 4 °C)	-	+	+		+	
P137	Leite cru tanque 2 (2º dia a 4 °C)	-	-	-			+
P138	Leite cru tanque 2 (2º dia a 4 °C)	-	-	-			+
P139	Leite cru tanque 2 (2º dia a 4 °C)	-	-	-			+
P140	Leite cru tanque 2 (2º dia a 4 °C)	-	-	-			+
P141	Leite cru tanque 2 (2º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P142	Leite cru tanque 2 (2º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P143	Leite cru tanque 2 (2º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P144	Leite cru tanque 2 (2º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P145	Leite cru tanque 2 (2º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P146	Leite cru tanque 2 (2º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P147	Leite cru tanque 2 (2º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P148	Leite cru tanque 2 (2º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P149	Leite cru tanque 2 (2º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P150	Leite cru tanque 2 (2º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P151	Leite cru tanque 1 (4º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P152	Leite cru tanque 1 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P153	Leite cru tanque 1 (4º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P154	Leite cru tanque 1 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P155	Leite cru tanque 1 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P156	Leite cru tanque 1 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR	PCR	Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P157	Leite cru tanque 1 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P158	Leite cru tanque 1 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P159	Leite cru tanque 1 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P160	Leite cru tanque 1 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P161	Leite cru tanque 1 (4º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P162	Leite cru tanque 1 (4º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P163	Leite cru tanque 1 (4º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P164	Leite cru tanque 1 (4º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P165	Leite cru tanque 1 (4º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P166	Leite cru tanque 2 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P167	Leite cru tanque 2 (4º dia a 4 °C)	-	+	+		+	
P168	Leite cru tanque 2 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P169	Leite cru tanque 2 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P170	Leite cru tanque 2 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P171	Leite cru tanque 2 (4º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P172	Leite cru tanque 2 (4º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P173	Leite cru tanque 2 (4º dia a 7 °C)	-	+	+		+	
P174	Leite cru tanque 2 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P175	Leite cru tanque 2 (4º dia a 7 °C)	-	+	+		+	
P176	Leite cru tanque 2 (4º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P177	Leite cru tanque 2 (4º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P178	Leite cru tanque 2 (4º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P179	Leite cru tanque 2 (4º dia a 10 °C)	-	+	+	+		

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR		Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P180	Leite cru tanque 2 (4º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P181	Leite cru tanque 1 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P182	Leite cru tanque 1 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P183	Leite cru tanque 1 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P184	Leite cru tanque 1 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P185	Leite cru tanque 1 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P186	Leite cru tanque 1 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P187	Leite cru tanque 1 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P188	Leite cru tanque 1 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P189	Leite cru tanque 1 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P190	Leite cru tanque 1 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P191	Leite cru tanque 1 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P192	Leite cru tanque 1 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P193	Leite cru tanque 1 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P194	Leite cru tanque 1 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P195	Leite cru tanque 1 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P196	Leite cru tanque 2 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P197	Leite cru tanque 2 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P198	Leite cru tanque 2 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P199	Leite cru tanque 2 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P200	Leite cru tanque 2 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P201	Leite cru tanque 2 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P202	Leite cru tanque 2 (8º dia a 7 °C)	-	+	+	+		

Continuação ...

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR	PCR	Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P203	Leite cru tanque 2 (8º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P204	Leite cru tanque 2 (8º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P205	Leite cru tanque 2 (8º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P206	Leite cru tanque 2 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P207	Leite cru tanque 2 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P208	Leite cru tanque 2 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P209	Leite cru tanque 2 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P210	Leite cru tanque 2 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P211	Leite Cru 3 - (1º dia)	-	-	+			
P212	Leite Cru 3 - (1º dia)	-	-	+			
P213	Leite Cru 3 - (1º dia)	-	+	+			+
P214	Leite Cru 3 - (1º dia)	-	+	+			+
P215	Leite Cru 3 - (1º dia)	-	+	+		+	
P216	Leite Cru 3 (2º dia a 4°C)	-	+	+			+
P217	Leite Cru 3 (2º dia a 4°C)	-	+	+	+		
P218	Leite Cru 3 (2º dia a 4°C)	-	+	+			+
P219	Leite Cru 3 (2º dia a 4°C)	-	+	+	+		
P220	Leite Cru 3 (2º dia a 4°C)	-	+	+	+		
P221	Leite Cru 3 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P222	Leite Cru 3 (2º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P223	Leite Cru 3 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P224	Leite Cru 3 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P225	Leite Cru 3 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+

Continuação ...

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR		Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P226	Leite Cru 3 (2º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P227	Leite Cru 3 (2º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P228	Leite Cru 3 (2º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P229	Leite Cru 3 (2º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P230	Leite Cru 3 (2º dia a 10 °C)	-	+	+		+	
P231	Leite Cru 3 (4º dia a 4 °C)	-	+	+		+	
P232	Leite Cru 3 (4º dia a 4 °C)	-	+	+		+	
P233	Leite Cru 3 (4º dia a 4 °C)	-	+	+		+	
P234	Leite Cru 3 (4º dia a 4 °C)	-	+	+		+	
P235	Leite Cru 3 (4º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P236	Leite Cru 3 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P237	Leite Cru 3 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P238	Leite Cru 3 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P239	Leite Cru 3 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P240	Leite Cru 3 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P241	Leite Cru 3 (4º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P242	Leite Cru 3 (4º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P243	Leite Cru 3 (4º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P244	Leite Cru 3 (4º dia a 10 °C)	-	+	+		+	
P245	Leite Cru 3 (4º dia a 10 °C)	-	+	+		+	
P246	Leite Cru 3 (8º dia a 4 °C)	-	+	+		+	
P247	Leite Cru 3 (8º dia a 4 °C)	-	+	+		+	
P248	Leite Cru 3 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+

Continuação ...

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR <i>P.fluorescens</i>	PCR <i>P. aeruginosa</i>	Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase			
P249	Leite Cru 3 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P250	Leite Cru 3 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P251	Leite Cru 3 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P252	Leite Cru 3 (8º dia a 7 °C)	-	+	+		+	
P253	Leite Cru 3 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P254	Leite Cru 3 (8º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P255	Leite Cru 3 (8º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P256	Leite Cru 3 (8º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P257	Leite Cru 3 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P258	Leite Cru 3 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P259	Leite Cru 3 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P260	Leite Cru 3 (8º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P261	Leite Cru 4- (dia da coleta)	-	+	+		+	
P262	Leite Cru 4- (dia da coleta)	-	+	+		+	
P263	Leite Cru 4- (dia da coleta)	-	+	+		+	
P264	Leite Cru 4- (dia da coleta)	-	+	+		+	
P265	Leite Cru 4- (dia da coleta)	-	+	+			+
P266	Leite Cru 4 (2º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P267	Leite Cru 4 (2º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P268	Leite Cru 4 (2º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P269	Leite Cru 4 (2º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P270	Leite Cru 4 (2º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P271	Leite Cru 4 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+

Continuação ...

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR	PCR	Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P272	Leite Cru 4 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P273	Leite Cru 4 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P274	Leite Cru 4 (2º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P275	Leite Cru 4 (2º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P276	Leite Cru 4 (2º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P277	Leite Cru 4 (2º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P278	Leite Cru 4 (2º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P279	Leite Cru 4 (2º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P280	Leite Cru 4 (2º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P281	Leite Cru 4 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P282	Leite Cru 4 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P283	Leite Cru 4 (4º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P284	Leite Cru 4 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P285	Leite Cru 4 (4º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P286	Leite Cru 4 (4º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P287	Leite Cru 4 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P288	Leite Cru 4 (4º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P289	Leite Cru 4 (4º dia a 7 °C)	-	+	+	+		
P290	Leite Cru 4 (4º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P291	Leite Cru 4 (4º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P292	Leite Cru 4 (4º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P293	Leite Cru 4 (4º dia a 10 °C)	-	+	+	+		
P294	Leite Cru 4 (4º dia a 10 °C)	-	+	+			+

Continuação ...

Isolados	Origem	Testes Bioquímicos			PCR	PCR	Outras espécies do gênero
		Gram	Oxidase	Catalase	<i>P.fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
P295	Leite Cru 4 (4º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P296	Leite Cru 4 (8º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P297	Leite Cru 4 (8º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P298	Leite Cru 4 (8º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P299	Leite Cru 4 (8º dia a 4 °C)	-	+	+			+
P300	Leite Cru 4 (8º dia a 4 °C)	-	+	+	+		
P301	Leite Cru 4 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P302	Leite Cru 4 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P303	Leite Cru 4 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P304	Leite Cru 4 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P305	Leite Cru 4 (8º dia a 7 °C)	-	+	+			+
P306	Leite Cru 4 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P307	Leite Cru 4 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P308	Leite Cru 4 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P309	Leite Cru 4 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+
P310	Leite Cru 4 (8º dia a 10 °C)	-	+	+			+

Apêndice E

Tabela 45. Resultados referentes à avaliação da capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas pelas bactérias do gênero *Enterococcus* isoladas de matéria-prima, produtos e ambiente de processamento de produtos lácteos

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
E1	<i>E. faecalis</i>	-	+
E2	<i>E. faecalis</i>	-	+
E3	<i>E. faecalis</i>	+	+
E4	<i>E. faecalis</i>	-	-
E5	<i>E. faecalis</i>	-	-
E6	<i>E. faecalis</i>	-	-
E7	<i>E. faecalis</i>	+	+
E8	<i>E. faecalis</i>	-	+
E9	<i>E. faecalis</i>	-	-
E10	<i>E. faecalis</i>	-	-
E11	<i>E. faecalis</i>	+	+
E12	<i>E. faecalis</i>	-	+
E13	<i>E. faecalis</i>	-	+
E14	Não pertencente ao gênero	+	+
E15	<i>E. faecalis</i>	-	-
E16	<i>E. faecalis</i>	-	-
E17	<i>E. faecalis</i>	+	+
E18	Não pertencente ao gênero	-	-
E19	<i>E. faecalis</i>	-	-
E20	<i>E. faecalis</i>	-	-
E21	<i>E. faecalis</i>	-	-
E22	<i>E. faecalis</i>	-	-
E23	<i>E. faecalis</i>	-	-
E24	<i>E. faecalis</i>	-	-
E25	<i>E. faecalis</i>	+	+
E26	Não pertencente ao gênero	-	+
E27	<i>E. faecalis</i>	+	+
E28	Não pertencente ao gênero	-	-
E29	Não pertencente ao gênero	-	-

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
E30	Não pertencente ao gênero	-	-
E31	<i>E. faecalis</i>	-	-
E32	<i>E. faecalis</i>	-	-
E33	<i>E. faecalis</i>	-	-
E34	<i>E. faecalis</i>	-	-
E35	<i>E. faecalis</i>	-	-
E36	Não pertencente ao gênero	-	-
E37	Não pertencente ao gênero	-	-
E38	<i>E. faecalis</i>	-	-
E39	<i>E. faecalis</i>	-	-
E40	<i>E. faecalis</i>	-	-
E41	Outra espécie do gênero	-	-
E42	<i>E. faecium</i>	-	-
E43	<i>E. faecalis</i>	-	-
E44	Não pertencente ao gênero	-	-
E45	<i>E. faecalis</i>	-	-
E46	Outra espécie do gênero	+	-
E47	<i>E. faecalis</i>	-	-
E48	Outra espécie do gênero	-	-
E49	Outra espécie do gênero	-	-
E50	<i>E. faecalis</i>	-	-
E51	<i>E. faecalis</i>	+	-
E52	<i>E. faecalis</i>	-	-
E53	<i>E. faecalis</i>	+	-
E54	<i>E. faecalis</i>	-	-
E55	<i>E. faecalis</i>	+	-
E56	<i>E. faecalis</i>	+	-
E57	<i>E. faecalis</i>	+	-
E58	<i>E. faecalis</i>	-	-
E59	<i>E. faecalis</i>	-	-
E60	<i>E. faecalis</i>	+	-
E61	<i>E. faecalis</i>	-	-
E62	<i>E. faecalis</i>	-	-
E63	<i>E. faecium</i>	-	-
E64	<i>E. faecalis</i>	-	-

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
E65	<i>E. faecalis</i>	-	-
E66	<i>E. faecalis</i>	-	-
E67	<i>E. faecalis</i>	-	-
E68	<i>E. faecalis</i>	-	-
E69	<i>E. faecalis</i>	-	-
E70	<i>E. faecalis</i>	-	-
E71	<i>E. faecium</i>	-	-
E72	<i>E. faecalis</i>	-	-
E73	Não pertencente ao gênero	-	-
E74	<i>E. faecalis</i>	-	-
E75	<i>E. faecalis</i>	-	-
E76	<i>E. faecalis</i>	-	-
E77	<i>E. faecalis</i>	-	+
E78	<i>E. faecalis</i>	-	+
E79	<i>E. faecalis</i>	-	+
E80	<i>E. faecalis</i>	+	+
E81	<i>E. faecium</i>	+	+
E82	Outra espécie do gênero	+	+
E83	Outra espécie do gênero	+	+
E84	<i>E. faecium</i>	+	+
E85	<i>E. faecalis</i>	+	+
E86	<i>E. faecalis</i>	+	+
E87	<i>E. faecalis</i>	+	+
E88	<i>E. faecalis</i>	+	+
E89	<i>E. faecalis</i>	+	+
E90	<i>E. faecalis</i>	-	+
E91	<i>E. faecalis</i>	+	+
E92	<i>E. faecalis</i>	-	+
E93	<i>E. faecalis</i>	+	+
E94	<i>E. faecalis</i>	-	-
E95	<i>E. faecalis</i>	-	-
E96	<i>E. faecalis</i>	-	-
E97	<i>E. faecalis</i>	+	-
E98	Não pertencente ao gênero	-	-
E99	Não pertencente ao gênero	-	+

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
E100	<i>E. faecalis</i>	+	+
E101	Não pertencente ao gênero	-	+
E102	<i>E. faecalis</i>	-	+
E103	Não pertencente ao gênero	-	-
E104	<i>E. faecalis</i>	+	-
E105	Outra espécie do gênero	+	-
E106	<i>E. faecium</i>	+	-
E107	Não pertencente ao gênero	+	-
E108	Não pertencente ao gênero	+	+
E109	Não pertencente ao gênero	+	-
E110	<i>E. faecalis</i>	+	+
E111	Outra espécie do gênero	+	+
E112	<i>E. faecalis</i>	+	+
E113	<i>E. faecium</i>	+	-
E114	Outra espécie do gênero	+	-
E115	Não pertencente ao gênero	-	-
E116	Não pertencente ao gênero	-	+
E117	Não pertencente ao gênero	-	-
E118	Não pertencente ao gênero	-	-
E119	<i>E. faecalis</i>	+	+
E120	<i>E. faecium</i>	-	+
E121	<i>E. faecium</i>	-	-
E122	Não pertencente ao gênero	-	-
E123	<i>E. faecium</i>	+	+
E124	Não pertencente ao gênero	+	-
E125	<i>E. faecium</i>	+	-
E126	<i>E. faecalis</i>	+	-
E127	<i>E. faecalis</i>	+	-
E128	<i>E. faecium</i>	-	-
E129	<i>E. faecalis</i>	+	+
E130	<i>E. faecalis</i>	+	+
E131	<i>E. faecalis</i>	-	+
E132	<i>E. faecalis</i>	-	+
E133	<i>E. faecalis</i>	+	+
E134	<i>E. faecalis</i>	-	+

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
E135	<i>E. faecalis</i>	-	+
E136	<i>E. faecalis</i>	-	+
E137	<i>E. faecalis</i>	+	+
E138	<i>E. faecium</i>	-	+
E139	<i>E. faecalis</i>	-	-
E140	<i>E. faecalis</i>	+	+
E141	<i>E. faecium</i>	-	-
E142	<i>E. faecalis</i>	-	-
E143	Não pertencente ao gênero	+	-
E144	<i>E. faecalis</i>	+	-
E145	<i>E. faecium</i>	+	-
E146	<i>E. faecium</i>	-	-
E147	<i>E. faecalis</i>	-	-
E148	<i>E. faecium</i>	-	-
E149	<i>E. faecium</i>	-	-
E150	<i>E. faecalis</i>	-	-
E151	<i>E. faecium</i>	-	-
E152	<i>E. faecalis</i>	-	+
E153	<i>E. faecium</i>	-	-
E154	<i>E. faecalis</i>	-	-
E155	<i>E. faecalis</i>	-	+
E156	<i>E. faecium</i>	+	+
E157	<i>E. faecium</i>	+	+
E158	<i>E. faecium</i>	-	+
E159	<i>E. faecium</i>	+	+
E160	<i>E. faecium</i>	+	+
E161	<i>E. faecium</i>	+	-
E162	<i>E. faecium</i>	-	-
E163	Não pertencente ao gênero	+	+
E164	Não pertencente ao gênero	-	+
E165	<i>E. faecalis</i>	+	+
E166	<i>E. faecalis</i>	+	+
E167	<i>E. faecium</i>	+	+
E168	<i>E. faecalis</i>	+	-
E169	<i>E. faecalis</i>	+	-

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
E170	<i>E. faecalis</i>	-	+
E171	<i>E. faecalis</i>	-	-
E172	<i>E. faecalis</i>	-	-
E173	<i>E. faecium</i>	-	+
E174	<i>E. faecalis</i>	+	+
E175	<i>E. faecalis</i>	-	+
E176	<i>E. faecalis</i>	+	+
E177	<i>E. faecium</i>	-	+
E178	<i>E. faecium</i>	-	+
E179	Não pertencente ao gênero	-	+
E180	<i>E. faecalis</i>	-	+
E181	<i>E. faecalis</i>	-	+
E182	<i>E. faecium</i>	-	+
E183	<i>E. faecalis</i>	-	+
E184	<i>E. faecalis</i>	+	+
E185	<i>E. faecalis</i>	+	+
E186	<i>E. faecalis</i>	-	+
E187	<i>E. faecalis</i>	+	+
E188	<i>E. faecalis</i>	+	+
E189	<i>E. faecalis</i>	+	+
E190	<i>E. faecalis</i>	+	+
E191	<i>E. faecalis</i>	+	+
E192	<i>E. faecalis</i>	+	-
E193	<i>E. faecium</i>	+	-
E194	Não pertencente ao gênero	+	+
E195	<i>E. faecalis</i>	+	+
E196	<i>E. faecium</i>	+	+
E197	<i>E. faecium</i>	+	+
E198	<i>E. faecalis</i>	+	+
E199	<i>E. faecalis</i>	+	+
E200	<i>E. faecium</i>	+	-
E201	<i>E. faecalis</i>	-	-
E202	<i>E. faecalis</i>	+	-
E203	<i>E. faecalis</i>	+	-
E204	<i>E. faecalis</i>	-	-

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
E205	<i>E. faecium</i>	-	-
E206	<i>E. faecalis</i>	+	-
E207	<i>E. faecalis</i>	-	+
E208	<i>E. faecalis</i>	-	-
E209	<i>E. faecalis</i>	+	+
E210	<i>E. faecalis</i>	+	-
E211	<i>E. faecalis</i>	+	-
E212	<i>E. faecalis</i>	+	+
E213	Não pertencente ao gênero	+	+
E214	<i>E. faecalis</i>	+	+
E215	<i>E. faecalis</i>	+	+
E216	<i>E. faecium</i>	+	-
E217	<i>E. faecium</i>	+	-
E218	<i>E. faecium</i>	+	-
E219	<i>E. faecium</i>	+	-
E220	<i>E. faecium</i>	+	-
E221	<i>E. faecium</i>	+	-
E222	<i>E. faecium</i>	+	-
E223	<i>E. faecium</i>	+	-
E224	<i>E. faecium</i>	+	-
E225	<i>E. faecium</i>	+	-
E226	<i>E. faecium</i>	+	-
E227	<i>E. faecium</i>	+	-
E228	<i>E. faecium</i>	+	-
E229	<i>E. faecium</i>	-	-
E230	Não pertencente ao gênero	-	-
E231	<i>E. faecium</i>	+	+
E232	<i>E. faecium</i>	+	-
E233	<i>E. faecium</i>	+	-
E234	<i>E. faecium</i>	+	-
E235	<i>E. faecium</i>	+	-
E236	<i>E. faecium</i>	+	+
E237	<i>E. faecium</i>	+	+
E238	<i>E. faecium</i>	+	-
E239	<i>E. faecium</i>	+	+

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
E240	<i>E. faecium</i>	+	+
E241	<i>E. faecium</i>	-	-
E242	<i>E. faecium</i>	+	+
E243	<i>E. faecium</i>	+	+
E244	<i>E. faecium</i>	+	-
E245	<i>E. faecium</i>	+	-
E246	<i>E. faecium</i>	+	-
E247	<i>E. faecium</i>	+	-
E248	<i>E. faecium</i>	+	-
E249	<i>E. faecium</i>	+	-
E250	<i>E. faecium</i>	+	-
E251	<i>E. faecium</i>	+	-
E252	<i>E. faecium</i>	+	+
E253	<i>E. faecium</i>	+	+
E254	<i>E. faecium</i>	+	+
E255	<i>E. faecium</i>	+	+
E256	<i>E. faecium</i>	-	+
E257	<i>E. faecalis</i>	-	-
E258	<i>E. faecium</i>	+	-
E259	<i>E. faecium</i>	-	+
E260	<i>E. faecium</i>	-	-
E261	<i>E. faecalis</i>	-	-
E262	<i>E. faecium</i>	+	-
E263	<i>E. faecium</i>	+	-
E264	<i>E. faecium</i>	+	+
E265	<i>E. faecalis</i>	+	-
E266	<i>E. faecalis</i>	+	-
E267	<i>E. faecium</i>	+	+
E268	<i>E. faecalis</i>	+	-
E269	<i>E. faecalis</i>	-	-
E270	<i>E. faecalis</i>	-	-
E271	<i>E. faecium</i>	-	-
E272	<i>E. faecium</i>	-	-
E273	<i>E. faecium</i>	-	-
E274	<i>E. faecium</i>	-	-

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
E275	<i>E. faecium</i>	-	-
E276	<i>E. faecalis</i>	-	-
E277	<i>E. faecalis</i>	-	-
E278	<i>E. faecalis</i>	-	-
E279	<i>E. faecium</i>	-	-
E280	<i>E. faecium</i>	-	-
E281	<i>E. faecalis</i>	-	-
E282	<i>E. faecalis</i>	-	-
E283	<i>E. faecalis</i>	-	-
E284	<i>E. faecalis</i>	+	-
E285	<i>E. faecium</i>	-	-
E286	<i>E. faecium</i>	-	-
E287	Outra espécie do gênero	-	-
E288	<i>E. faecalis</i>	-	-
E289	Outra espécie do gênero	+	-
E290	<i>E. faecalis</i>	+	+
E291	<i>E. faecalis</i>	-	-
E292	<i>E. faecalis</i>	-	+
E293	<i>E. faecium</i>	-	+
E294	<i>E. faecalis</i>	-	-
E295	<i>E. faecalis</i>	-	-
E296	Não pertencente ao gênero	-	-
E297	<i>E. faecium</i>	-	-
E298	Outra espécie do gênero	-	+
E299	<i>E. faecalis</i>	-	+
E300	<i>E. faecalis</i>	+	-
E301	<i>E. faecalis</i>	+	+
E302	<i>E. faecalis</i>	+	-
E303	<i>E. faecalis</i>	+	-
E304	<i>E. faecalis</i>	+	-
E305	<i>E. faecalis</i>	+	-
E306	<i>E. faecalis</i>	+	-
E307	<i>E. faecalis</i>	+	-
E308	<i>E. faecalis</i>	+	+
E309	<i>E. faecalis</i>	+	+

Continuação...			
E310	<i>E. faecalis</i>	+	+
E311	<i>E. faecalis</i>	+	+
E312	<i>E. faecalis</i>	+	-
E313	<i>E. faecalis</i>	+	-
E314	<i>E. faecalis</i>	+	-
E315	<i>E. faecalis</i>	+	-

Apêndice F

Tabela 46. Resultados referentes à avaliação da capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas pelas bactérias do gênero *Pseudomonas* isoladas de matéria-prima, produtos e ambiente de processamento de produtos lácteos

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
P1	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P2	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P3	Outra espécie do gênero	+	+
P4	Não pertencente ao gênero	+	+
P5	Não pertencente ao gênero	+	+
P6	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P7	Outra espécie do gênero	+	+
P8	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P9	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P10	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P11	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P12	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P13	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P14	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P15	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P16	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P17	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P18	Outra espécie do gênero	-	+
P19	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P20	Outra espécie do gênero	-	+
P21	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P22	Outra espécie do gênero	+	+
P23	Outra espécie do gênero	-	+
P24	Outra espécie do gênero	-	+
P25	Outra espécie do gênero	-	+
P26	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P27	<i>P.fluorescens</i>	+	+

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
P28	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P29	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P30	Outra espécie do gênero	+	+
P31	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P32	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P33	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P34	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P35	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P36	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P37	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P38	Outra espécie do gênero	+	+
P39	Outra espécie do gênero	+	+
P40	Outra espécie do gênero	+	+
P41	Outra espécie do gênero	+	+
P42	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P43	Outra espécie do gênero	+	+
P44	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P45	Outra espécie do gênero	+	+
P46	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P47	Outra espécie do gênero	+	+
P48	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P49	Outra espécie do gênero	+	+
P50	Outra espécie do gênero	+	+
P51	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P52	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P53	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P54	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P55	Outra espécie do gênero	-	+
P56	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P57	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P58	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P59	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P60	Outra espécie do gênero	-	+
P61	Outra espécie do gênero	-	+
P62	Outra espécie do gênero	-	+

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
P63	Outra espécie do gênero	-	+
P64	Outra espécie do gênero	-	+
P65	Outra espécie do gênero	-	+
P66	Outra espécie do gênero	-	+
P67	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P68	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P69	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P70	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P71	Outra espécie do gênero	+	+
P72	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P73	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P74	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P75	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P76	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P77	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P78	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P79	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P80	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P81	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P82	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P83	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P84	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P85	Outra espécie do gênero	+	+
P86	Outra espécie do gênero	+	+
P87	Outra espécie do gênero	+	+
P88	Outra espécie do gênero	+	+
P89	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P90	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P91	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P92	Outra espécie do gênero	+	+
P93	Outra espécie do gênero	+	+
P94	Outra espécie do gênero	+	+
P95	Outra espécie do gênero	+	+
P96	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P97	Outra espécie do gênero	+	+

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
P98	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P99	Outra espécie do gênero	+	+
P100	Outra espécie do gênero	-	+
P101	Outra espécie do gênero	+	+
P102	Outra espécie do gênero	+	+
P103	Outra espécie do gênero	+	+
P104	Outra espécie do gênero	-	+
P105	Outra espécie do gênero	+	+
P106	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P107	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P108	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P109	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P110	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P111	Outra espécie do gênero	+	+
P112	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P113	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P114	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P115	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P116	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P117	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P118	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P119	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P120	<i>P. aeruginosa</i>	-	+
P121	Não pertencente ao gênero	-	+
P122	Outra espécie do gênero	+	+
P123	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P124	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P125	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P126	Outra espécie do gênero	-	+
P127	Não pertencente ao gênero	-	+
P128	Outra espécie do gênero	+	+
P129	Outra espécie do gênero	-	+
P130	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P131	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P132	Outra espécie do gênero	-	+

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
P133	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P134	Outra espécie do gênero	-	+
P135	<i>P. aeruginosa</i>	-	+
P136	<i>P. aeruginosa</i>	-	+
P137	Outra espécie do gênero	-	+
P138	Outra espécie do gênero	+	+
P139	Outra espécie do gênero	+	+
P140	Outra espécie do gênero	+	+
P141	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P142	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P143	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P144	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P145	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P146	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P147	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P148	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P149	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P150	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P151	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P152	Outra espécie do gênero	+	+
P153	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P154	Outra espécie do gênero	+	+
P155	Outra espécie do gênero	-	+
P156	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P157	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P158	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P159	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P160	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P161	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P162	Outra espécie do gênero	-	+
P163	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P164	Outra espécie do gênero	+	+
P165	Outra espécie do gênero	+	+
P166	Outra espécie do gênero	+	+
P167	<i>P. aeruginosa</i>	+	+

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
P168	Outra espécie do gênero	+	+
P169	Outra espécie do gênero	+	+
P170	Outra espécie do gênero	+	+
P171	Outra espécie do gênero	-	+
P172	Outra espécie do gênero	+	+
P173	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P174	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P175	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P176	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P177	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P178	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P179	<i>P. fluorescens</i>	+	+
P180	Outra espécie do gênero	-	+
P181	Outra espécie do gênero	+	+
P182	Outra espécie do gênero	+	+
P183	Outra espécie do gênero	+	+
P184	Outra espécie do gênero	-	+
P185	Outra espécie do gênero	-	+
P186	Outra espécie do gênero	-	+
P187	Outra espécie do gênero	-	+
P188	Outra espécie do gênero	-	+
P189	Outra espécie do gênero	-	+
P190	Outra espécie do gênero	-	+
P191	Outra espécie do gênero	-	+
P192	Outra espécie do gênero	-	+
P193	Outra espécie do gênero	-	+
P194	Outra espécie do gênero	+	+
P195	Outra espécie do gênero	-	+
P196	Outra espécie do gênero	+	+
P197	Outra espécie do gênero	+	+
P198	Outra espécie do gênero	+	+
P199	Outra espécie do gênero	+	+
P200	Outra espécie do gênero	+	+
P201	Outra espécie do gênero	-	+
P202	<i>P. fluorescens</i>	+	+

Continuação...

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
P203	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P204	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P205	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P206	Outra espécie do gênero	-	+
P207	Outra espécie do gênero	+	+
P208	Outra espécie do gênero	+	+
P209	Outra espécie do gênero	+	+
P210	Outra espécie do gênero	+	+
P211	Não pertencente ao gênero	+	+
P212	Não pertencente ao gênero	+	+
P213	Outra espécie do gênero	-	+
P214	Outra espécie do gênero	-	+
P215	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P216	Outra espécie do gênero	+	+
P217	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P218	Outra espécie do gênero	+	+
P219	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P220	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P221	Outra espécie do gênero	-	+
P222	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P223	Outra espécie do gênero	-	+
P224	Outra espécie do gênero	-	+
P225	Outra espécie do gênero	+	+
P226	Outra espécie do gênero	-	+
P227	Outra espécie do gênero	-	+
P228	Outra espécie do gênero	-	+
P229	Outra espécie do gênero	-	+
P230	<i>P. aeruginosa</i>	-	+
P231	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P232	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P233	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P234	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P235	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P236	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P237	<i>P.fluorescens</i>	+	+

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
P238	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P239	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P240	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P241	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P242	Outra espécie do gênero	+	+
P243	Outra espécie do gênero	-	+
P244	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P245	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P246	<i>P. aeruginosa</i>	-	+
P247	<i>P. aeruginosa</i>	-	+
P248	Outra espécie do gênero	-	+
P249	Outra espécie do gênero	-	+
P250	Outra espécie do gênero	-	+
P251	Outra espécie do gênero	-	+
P252	<i>P. aeruginosa</i>	-	+
P253	Outra espécie do gênero	-	+
P254	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P255	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P256	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P257	Outra espécie do gênero	-	+
P258	Outra espécie do gênero	-	+
P259	Outra espécie do gênero	-	+
P260	<i>P.fluorescens</i>	-	+
P261	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P262	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P263	<i>P. aeruginosa</i>	-	+
P264	<i>P. aeruginosa</i>	+	+
P265	Outra espécie do gênero	-	+
P266	Outra espécie do gênero	+	+
P267	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P268	Outra espécie do gênero	+	+
P269	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P270	Outra espécie do gênero	+	-
P271	Outra espécie do gênero	+	+
P272	Outra espécie do gênero	-	+

Continuação...

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
P273	Outra espécie do gênero	+	+
P274	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P275	Outra espécie do gênero	-	+
P276	Outra espécie do gênero	-	+
P277	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P278	Outra espécie do gênero	+	+
P279	Outra espécie do gênero	-	+
P280	Outra espécie do gênero	+	+
P281	Outra espécie do gênero	+	+
P282	Outra espécie do gênero	+	-
P283	<i>P.fluorescens</i>	+	-
P284	Outra espécie do gênero	+	+
P285	Outra espécie do gênero	+	-
P286	Outra espécie do gênero	+	+
P287	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P288	Outra espécie do gênero	+	+
P289	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P290	Outra espécie do gênero	+	+
P291	Outra espécie do gênero	+	+
P292	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P293	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P294	Outra espécie do gênero	+	+
P295	Outra espécie do gênero	+	+
P296	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P297	<i>P.fluorescens</i>	+	-
P298	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P299	Outra espécie do gênero	+	+
P300	<i>P.fluorescens</i>	+	+
P301	Outra espécie do gênero	+	+
P302	Outra espécie do gênero	+	+
P303	Outra espécie do gênero	+	+
P304	Outra espécie do gênero	+	+
P305	Outra espécie do gênero	+	+
P306	Outra espécie do gênero	+	+
P307	Outra espécie do gênero	+	+

Continuação...

Isolados	Identificação	Proteólise	Lipólise
P308	Outra espécie do gênero	+	+
P309	Outra espécie do gênero	+	+
P310	Outra espécie do gênero	+	+