

GABRIEL SILVA OLIVEIRA

**BIOFILME MULTIESPÉCIE FORMADO PELA MICROBIOTA CONTAMINANTE DO
LEITE CRU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48b
2017
Oliveira, Gabriel Silva, 1992-
Biofilme multiespécie formado pela microbiota
contaminante do leite cru / Gabriel Silva Oliveira. – Viçosa, MG,
2017.
ix, 43f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Bactérias patogênicas. 2. Leite - Bacteriologia.
3. Alimentos - Contaminação. 4. Aço inoxidável. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

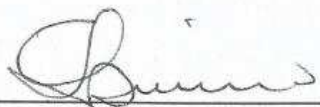
CDD 22 ed. 632.32

GABRIEL SILVA OLIVEIRA

**BIOFILME MULTIESPÉCIE FORMADO PELA MICROBIOTA CONTAMINANTE DO
LEITE CRU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

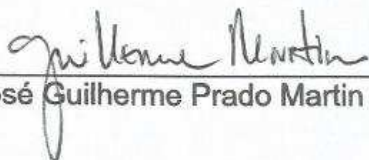
APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.




Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto




François Baglinière
(Coorientador)



José Guilherme Prado Martin



Ramila Cristiane Rodrigues



Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos derramadas sobre mim durante essa caminhada e se fazer sempre presente nas minhas dificuldades e quedas. Obrigado pela força e o dom da Vida!

Aos meus amados pais, Antônio Carlos e Imaculada, pela confiança, dedicação e fonte inesgotável de amor e doação. Dedico a vocês essa vitória!

Às minhas irmãs pelo incentivo, amor e carinho e aos meus adoráveis sobrinhos por alegrarem meus finais de semana. Aos meus avós, tios e primos que contribuíram de forma positiva para a minha caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pelo ensino de excelência. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela orientação, ensinamentos, confiança e compreensão, sendo um exemplo de profissional.

À professora Cynthia, pelas sugestões e disponibilidade.

Ao pós-doutorando François Baglinière, pelas valiosas sugestões, disponibilidade, entusiasmo e pelos chocolates.

À banca examinadora, Dra Cláudia Lúcia, Dr. François, Prof. José Guilherme e Dra. Ramila, pela disponibilidade e sugestões.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia que contribuíram para o meu aprendizado e formação.

Aos amigos dos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Anaeróbios, Deisy, Felipe, Fábio, Cleonice, Jéssica, Leandro, Cláudia, Ramila, Elsa, Débora, Sofia, Juliana e Fábila pelo incentivo, companheirismo, alegrias, experiências vivenciadas e pelos melhores momentos no cafezinho.

Ao meu grande amigo Paulo Eder, companheiro de república, pelos sete anos de convivência, paciência e atenção e à minha amiga Silveli pela amizade, momentos de diversão e comilanças, sem vocês Viçosa não seria a mesma.

À minha amiga e irmã Aline, pelos seus grandes conselhos, ajudas, momentos de descontração e por sempre me apoiar e me entender.

Aos amigos/irmãos Mayara (Xuxu) e Leonardo (Carniça) pela amizade, momentos de estudos, companheirismo e por tornar essa jornada mais animada e prazerosa. À Leticia Let's pelos momentos de descontração e baladinhas.

Aos meus amigos Mica, Fran, Nirlane, Bárbara, Leid e Lílian, pela força, amizade e companheirismo.

Obrigado a todos, que direta ou indiretamente, torceram e me apoiaram para o desenvolvimento desse trabalho.

BIOGRAFIA

Gabriel Silva Oliveira, filho de Imaculada de Souza Silva Oliveira e Antônio Carlos de Oliveira, nasceu em Viçosa, Minas Gerais no dia 25 de junho de 1992.

Em janeiro de 2015, graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

Em março de 2015, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concentrando seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1- População microbiana do leite cru.....	2
2.2- Biofilme.....	8
2.3- Biofilme multiespécie	9
2.4- Biofilme na indústria do leite	11
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1- Amostra.....	14
3.2- Preparo e limpeza dos cupons.....	14
3.3- Condições de cultivo	15
3.4 Quantificação da microbiota planctônica e sésil do leite	15
3.5- Observação do biofilme por microscopia de epifluorescência e confocal de varredura a laser.....	16
3.6- Extração de DNA.....	17
3.7- Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	17
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1- Contagem de células	19
4.2- Estrutura do biofilme	22
4.3- Obtenção de DNA	27
4.4- Análise da diversidade genética pela técnica de DGGE.....	29
5- CONCLUSÃO E PERSPECTIVA.....	31
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

RESUMO

OLIVEIRA, Gabriel Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Biofilme multiespécie formado pela microbiota contaminante do leite cru.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: Cynthia Canêdo da Silva e François Baglinière.

A formação de biofilmes nas indústrias de alimentos é caracterizada, inicialmente, pelo acúmulo de materiais orgânicos em superfícies, sobre as quais comunidades bacterianas podem se formar. Estas estruturas tornam as células mais resistentes e de difícil remoção durante o processo de higienização e representam fonte potencial de contaminação dos alimentos. Objetivou-se neste estudo, avaliar a formação de biofilmes multiespécie em cupons de aço inoxidável pela microbiota contaminante do leite cru e analisar sua diversidade. Foram utilizadas duas amostras de leite, um recém-ordenhado e outro granelizado, com contaminação média de 10^4 UFC/mL e 10^6 UFC/mL de aeróbios mesófilos, respectivamente. Cupons de aço inoxidável foram mantidos imersos no leite a 7 ± 2 °C e, a cada dois dias, o leite cru foi trocado por outro de mesma procedência. A formação do biofilme foi acompanhada por contagem padrão em placas das células sésseis e por microscopia de epifluorescência ao longo de 10 dias. No décimo dia, os biofilmes foram observados também por microscopia confocal a laser para determinar a estrutura em seu estado hidratado e visualizar a viabilidade celular. Para analisar a diversidade do biofilme multiespécie, foi utilizada a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). As bandas de DNA foram obtidas após amplificação do material genético extraído das células do biofilme utilizando oligonucleotídeos universais para o domínio Bacteria. O número de células sésseis no biofilme formado a partir do leite recém-ordenhado alcançou contagem de 10^5 UFC/cm² de psicotróficos no décimo dia, enquanto o biofilme formado na presença do leite granelizado atingiu 10^6 UFC/cm². A partir do 4º dia de incubação foi observado, pela microscopia de epifluorescência, nos cupons imersos no leite granelizado, aglomerados celulares que possivelmente se tratavam de biofilme, enquanto nos cupons imersos no leite recém-ordenhado essas estruturas foram observadas a partir do 8º dia. Nos cupons que ficaram imersos no leite recém-ordenhado não se visualizou biofilme pela

microscopia confocal a laser, enquanto que cupons imersos no leite granelizado foram observados biofilmes com espessuras em torno de 18 μm , com células viáveis desde a base até o ápice. Houve similaridade de 85 % entre a comunidade do biofilme formado na presença das amostras de leite utilizadas. Entretanto, no biofilme formado pela microbiota contaminante do leite recém-ordenhado, a diminuição na diversidade foi observada ao longo dos dias 6, 8 e 10 de incubação, enquanto no biofilme formado pela microbiota contaminante do leite granelizado a diversidade aumentou ao longo do tempo de incubação. Pode-se concluir que a microbiota contaminante do leite cru refrigerado pode se aderir nas superfícies de aço inoxidável e formar biofilmes multiespécies e o grau de contaminação influencia no tempo de formação dessas estruturas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Gabriel Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Multispecies biofilm formed by the contaminating microbiota of raw milk.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: Cynthia Canêdo Da Silva and François Baglinière.

The formation of biofilms in the food industry is characterized initially by the accumulation of organic materials on surfaces on which bacterial communities can form. These structures make the cells more resistant and difficult to remove during the hygiene process and represent a potential source of food contamination. The objective of this study was to evaluate the formation of multispecies biofilms in stainless steel coupons by the contaminating microbiota of raw milk and to analyze its diversity. It used two milk samples, one freshly milked and the other bulk tanks, with a mean contamination of 10^4 CFU/mL and 10^6 CFU/mL of mesophilic aerobes, respectively. Stainless steel coupons were kept immersed in the milk at 7 ± 2 °C and, every two days, raw milk was exchanged for another of the same origin. Biofilm formation was monitored by standard counting on sessile cells and by epifluorescence microscopy over 10 days. On the tenth day, biofilms were also observed by laser confocal microscopy to determine the structure in its hydrated state and visualize cell viability. In order to analyze the diversity of the multispecies biofilm, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) was used. The DNA bands were obtained after amplification of the genetic material, extracted from the biofilm cells and using universal oligonucleotides for the Bacteria domain. The number of sessile cells in the biofilm formed from the freshly milked milk reached a count of 10^5 CFU/cm² of psychrotrophs on the tenth day, while the biofilm formed in the presence of the bulk tanks milk reached 10^6 CFU/cm². From the 4th day of incubation was observed by epifluorescence microscopy, in the coupons immersed in the bulk tanks milk, cell agglomerates that were possibly biofilms, while in the coupons immersed in the freshly milked milk these structures were observed from the 8th day. In the coupons that were immersed in the freshly milked milk, no biofilm was visualized by laser confocal microscopy, while coupons immersed in the bulk tanks milk were observed biofilms with thicknesses around 18 µm, with viable cells from the base to the

apex. There was a similarity of 85% between the community of the biofilm formed in the presence of the milk samples used. However, in the biofilm formed by the contaminating microbiota of freshly milked milk, a decrease in diversity was observed throughout days 6, 8 and 10 of incubation, while in the biofilm formed by the contaminating microbiota of bulk tanks milk the diversity increased over the time of incubation. It can be concluded that the contaminating microbiota of the refrigerated raw milk can adhere to the stainless steel surfaces and form multispecies biofilms and the degree of contamination influences the formation time of these structures.

1- INTRODUÇÃO

Da fazenda até o consumidor, o leite entra em contato com equipamentos em que é estocado, transportado e processado e biofilmes podem ser formados nessas superfícies. A formação de biofilme é um problema nas indústrias, visto que estas estruturas são mais resistentes aos processos de limpeza, desinfecção e sanitização. Biofilmes podem ser definidos como uma comunidade microbiana aderida a uma superfície e envolta por uma matriz viscosa composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), produzidas por eles próprios. Células presentes no biofilme podem ser liberadas e constituem em importantes fontes de contaminação dos produtos, causando danos à qualidade e à segurança dos alimentos, caso patógenos também estejam presentes no biofilme.

O leite apresenta uma microbiota diversificada, compreendendo vários gêneros de bactérias pertencentes tanto ao grupo gram-positivo como gram-negativo, este último representa cerca de 90% da microbiota do leite cru refrigerado. As causas mais frequentes da contaminação do leite são a limpeza inadequada dos sistemas de ordenha, sanidade do rebanho e práticas impróprias de ordenha. Outra fonte potencial de contaminação do leite é o biofilme formado em razão da presença de resíduos de leite nas superfícies dos equipamentos. A falta de arrefecimento imediato do leite para temperaturas baixas permite a rápida multiplicação da população contaminante.

Os estudos sobre formação de biofilmes por espécies associadas ao leite cru refrigerado têm se concentrado em isolar e cultivar os microorganismos contaminantes individualmente. No entanto, há um reconhecimento de que tais abordagens não levam em consideração as interações dentro da comunidade bacteriana presente nos biofilmes. Portanto, estudos sobre a microbiota contaminante do leite cru que forma biofilmes multiespécies podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias para inibir ou remover esses biofilmes na indústria laticinista.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- População microbiana do leite cru

O leite é um alimento rico em nutrientes, principalmente em proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais (QUIGLEY et al., 2013). Além disso, é um produto muito perecível e vulnerável à deterioração por vários micro-organismos (SREY et al., 2013). Ele é um dos produtos alimentares mais importantes do mundo, como alimento e como matéria-prima para fabricação de produtos lácteos e não lácteos. Em 2015 a estimativa de produção mundial de leite foi de 802,8 milhões de toneladas, sendo o Brasil o 6º maior produtor, participando com 35,2 milhões de toneladas da produção mundial (BEN-BELHASSEN, 2016). O leite é um produto da agricultura e, como matéria-prima crua proveniente de animais leiteiros, está sujeito a diferentes tipos de contaminação. Muitos surtos de intoxicação e infecção alimentar, bem como outros problemas de segurança alimentar tem sido associados ao consumo de leite e derivados (EARLY, 2017).

A Contagem Padrão em Placas (CPP) é usada em todo o mundo como método indicador da qualidade microbiológica do leite. Nos Estados Unidos, o atual limite regulatório para a CPP de bactérias, definido pelo *Pasteurized Milk Ordinance* (PMO), é de 10^5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, mesmo valor adotado no Brasil (OLIVER et al., 2009; BRASIL, 2011; HHS/PHS/FDA, 2015).

A aplicação consistente de práticas adequadas de ordenha, higiene do úbere e boas práticas de prevenção e controle da mastite permite que os produtores de leite produzam diariamente leite com uma baixa CPP, menor que $5,0 \times 10^3$ UFC/mL (JAYARAO e WOLFGANG, 2003). Contagens bacterianas maiores do que 10^4 UFC/mL sugerem falhas nas Boas Práticas de Fabricação e que há contaminação a partir de uma ou mais fontes. A causa mais frequente de CPP alta é a higienização inadequada dos equipamentos de ordenha (HAYES et al., 2001; JAYARAO et al., 2004). Os resíduos de leite nas superfícies dos equipamentos fornecem nutrientes para a multiplicação de bactérias que contaminam o leite das ordenhas subsequentes. As vacas com mastite, animal sujo, práticas impróprias de ordenha e a falta de arrefecimento

rápido do leite para temperaturas abaixo de 4 °C também podem contribuir para altas contagens bacterianas no leite cru (ROHRBACH et al., 1992; HAYES et al., 2001; JAYARAO et al., 2004; ZADOKS et al., 2004). Embora seja difícil eliminar todas as possíveis fontes de contaminação bacteriana do leite, o leite de vacas limpas e saudáveis que foi adequadamente coletado, geralmente tem uma CPP menor que 10³ UFC/mL (OLIVER et al., 2009).

Vissers e Driehuis (2008) revisaram sobre fontes potenciais de micro-organismos presentes no leite cru, como resumido na Tabela 1. As principais fontes de contaminação bacteriana do leite cru são o ambiente agrícola, fezes, alimentos, tetas da vaca e equipamentos de ordenha. Outros autores acrescentam a água, solo e manipuladores como fontes importantes de contaminação (TOUCH e DEETH, 2009; BIANCHINI et al., 2014; POUTREL et al., 2015).

O leite de qualidade também deve estar livre de patógenos comumente veiculados por alimentos. Vários trabalhos constataram a presença de patógenos no leite estocado em tanques, incluindo *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella* spp., *Coxiella burnetti* e outros (HASSAN et al., 2000; JAYARAO e HENNING, 2001; MURAOKA et al., 2003; VAN KESSEL et al., 2004; OLIVER et al., 2005; JAYARAO et al., 2006; KARNS et al., 2007; OLIVER et al., 2009). Esses agentes patogênicos podem contaminar o leite durante a ordenha ou transporte (MCEWEN e FEDORKA-CRAY, 2002).

Embora a presença de bactérias patogênicas no leite cru seja a principal preocupação dos processadores de leite e dos fabricantes de produtos lácteos do ponto de vista da inocuidade dos alimentos, bactérias deterioradoras, bem como leveduras e fungos filamentosos, são de particular importância para a qualidade e vida útil dos produtos lácteos. A prática do uso dos tanques de refrigeração nas fazendas para armazenar leite cru antes da coleta pela indústria gera grande preocupação com a contaminação por bactérias psicotróficas. Por definição, as bactérias psicotróficas são capazes de crescer a 7 °C ou menos, embora a sua temperatura ótima de crescimento seja maior (MUIR, 1996a; 1996b; PINTO et al., 2006; HANTSIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007; TOUCH e DEETH, 2009; EARLY, 2017).

Tabela 1- Principais fontes de contaminação de micro-organismos que ocorrem no leite, associados à deterioração e questões de segurança nos produtos lácteos

Espécie microbiana	Problemas associados	Fonte de contaminação	Potencial para crescer em tanques de armazenamento de leite refrigerado
<i>Bacillus cereus</i> (esporos)	Deterioração de produtos lácteos pasteurizados	Ambiente (fezes + solo), água, equipamento de ordenha	Sim
<i>Bacillus sporothermodurans</i> (esporos)	Deterioração de produtos lácteos tratados com UHT	Ambiente (fezes)	Não
<i>Clostridium</i> (esporos)	Deterioração dos queijos Gouda e Emmenthal	Ambiente (fezes)	Não
<i>Campylobacter jejuni</i>	Segurança alimentar (produtos à base de leite cru)	Ambiente (fezes)	Não
<i>Escherichia coli</i>	Deterioração e segurança alimentar (produtos de leite cru)	Ambiente (fezes)	Sim
<i>Listeria monocytogenes</i>	Segurança alimentar (produtos fabricados com leite cru e queijos macios ou de superfície curados)	Ambiente (alimentos, fezes)	Sim
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Segurança alimentar (produtos à base de leite cru)	Ambiente (fezes)	Não
<i>Pseudomonas</i> spp.	Deterioração	Ambiente (solo), água, equipamento de ordenha	Sim
<i>Salmonella</i> spp.	Segurança alimentar (produtos à base de leite cru)	Ambiente (fezes)	Sim
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Deterioração	Ambiente (fezes, solo), equipamento de ordenha	Sim
<i>Staphylococcus aureus</i>	Segurança alimentar (produtos à base de leite cru)	Interior das tetas	Sim

Adaptado de VISSERS e DRIEHUIS (2008)

No Brasil, a partir da segunda metade da década de 90, o armazenamento de leite cru em temperaturas baixas e a coleta a granel foram implementadas por meio da Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2002). De acordo com a legislação brasileira atual, a Instrução Normativa nº 62 do MAPA (BRASIL, 2011), o leite deve ser refrigerado a temperatura igual ou inferior a 4 °C em tanques de refrigeração ou no limite de temperatura de 7 °C em tanques de refrigeração por imersão, em até 3 h após o término da ordenha. O transporte do leite para a instalação industrial deve ser feito a temperatura máxima de 10 °C em carro com tanque isotérmico e em intervalo de tempo máximo de 48 h após a ordenha (BRASIL, 2011).

O armazenamento de leite cru refrigerado na fazenda leiteira é uma prática para a conservação de suas propriedades sensoriais e nutricionais (SOBRINHO et al., 1995; JANK e GALAN, 1998), para reduzir o crescimento microbiano e a deterioração em razão da atividade acidificante de bactérias mesófilas (CEMPÍRKOVÁ, 2002; NICODÈME et al., 2005; NÖRNBERG et al., 2010). No entanto, as bactérias psicrófilas, que são capazes de crescer a baixas temperaturas podem se multiplicar no leite armazenado nas temperaturas de 4 °C a 10 °C (JAY, 2005; QUIGLEY et al., 2013; PINTO et al., 2015).

Muitos estudos têm sido realizados para identificar os micro-organismos e caracterizar a microbiota psicrófila predominante no leite após armazenamento sob refrigeração (DOGAN e BOOR, 2003; PINTO et al., 2006; HANTIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007; ERCOLINI et al., 2009; MARCHAND et al., 2009; RASOLOFO et al., 2010; RAATS et al., 2011; TREMONTE et al., 2014; MACHADO et al., 2015). A população de psicrófilas do leite cru refrigerado inclui bactérias tanto gram-positivas quanto gram-negativas e compreende principalmente, representantes dos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* e *Micrococcus* (CHAMPAGNE et al., 1994; LAFARGE et al., 2004; MUNSCH-ALATOSSAVA e ALATOSSAVA, 2006; MACHADO et al., 2015; PINTO et al., 2015).

Embora estes dois grandes grupos de bactérias estejam presentes na microbiota do leite cru refrigerado, as bactérias gram-negativas são predominantes, sendo responsáveis, normalmente, por mais de 90% da microbiota (NÖRNBERG et al., 2010). No entanto, a composição da microbiota do leite cru varia de acordo com a região geográfica e a variação climática, pois as diferenças na temperatura, umidade do ar, período chuvoso e seco, contribuem para as alterações da comunidade microbiana do ambiente e, conseqüentemente, do leite (ROHRBACH et al., 1992; QUIGLEY et al., 2013). Hantis-Zacharov e Halpern (2007) e Raats et al. (2011) evidenciaram no leite cru refrigerado israelense dominância de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e actinobactérias. No leite cru refrigerado brasileiro, as bactérias gram-negativas também são os micro-organismos predominantes (PINTO et al., 2006; NÖRNBERG et al., 2010; MACHADO et al., 2015). Exemplos de espécies bacterianas identificadas em amostras de leite cru brasileiro após armazenamento sob refrigeração estão apresentados na Tabela 2 (MACHADO et al., 2017).

Tabela 2- Grupos bacterianos predominantes encontrados no Brasil em amostras de leite cru após armazenamento sob refrigeração

Grupos Predominantes	Condição de armazenamento	Referências
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Pseudomonas putida</i>		
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		
<i>Serratia liquefaciens</i>		
<i>Serratia odorifera</i>		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	4 °C por 2 dias	Pinto et al. (2015)
<i>Bacillus</i> sp.		
<i>Paenibacillus alvei</i>		
<i>Paenibacillus macerans</i>		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		
<i>Lactococcus</i> sp.		
<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>Enterococcus faecium</i>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Acinetobacter</i> spp.	NI	Arcuri et al. (2008)
<i>Aeromonas hydrophila</i>		

NI – A condição de armazenamento não foi informada.
Adaptado de Machado et al. (2017).

A contaminação do leite pelas bactérias psicotróficas é uma das preocupações para a indústria de laticínios, uma vez que muitos produtos lácteos são armazenados e distribuídos a temperaturas permissivas para o crescimento destes organismos. Além disso, grande parte desses micro-organismos psicotróficos encontrados no leite é produtora de enzimas lipolíticas e proteolíticas. Essas enzimas extracelulares são causadoras da deterioração do leite e produtos lácteos, levando a grandes perdas econômicas (JONGHE et al., 2011). As lipases degradam a gordura presente no leite formando ácidos graxos de cadeia média, dando sabor rançoso, amargo e de sabão. As proteases que degradam a caseína causam aromas amargos e gelificação de produtos UHT (LAW et al., 1977; TERNSTRÖM et al., 1993; DATTA e DEETH, 2001). Apesar dos micro-organismos serem facilmente inativados pela pasteurização ou tratamento UHT, muitas das suas enzimas lipolíticas e proteolíticas são termorresistentes e persistem ativas no leite processado.

Pseudomonas está entre as principais espécies produtoras de enzimas deterioradoras, capaz de superar o crescimento de outras bactérias, como os membros dos gêneros *Aeromonas*, *Listeria*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*, tornando-se assim a microbiota predominante no leite cru refrigerado (ADAMS et al., 1975; CHEN et al., 2003). Machado et al. (2015) destacaram que *S. liquefaciens*, *P. fluorescens* e *P. lundensis*, identificadas por métodos moleculares, são os deterioradores proteolíticos predominantes encontrados no leite cru refrigerado produzido na região de Viçosa, MG.

Algumas bactérias psicotróficas proteolíticas presentes no leite são capazes de formar biofilmes em superfícies de equipamentos e utensílios industriais em várias temperaturas (VIANA et al., 2009; NÖRNBERG et al., 2011; CLETO et al., 2012; PONCE et al., 2012; TEH et al., 2012). Nesta condição, estes micro-organismos são mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos utilizados na sanitização por produzirem grande quantidade de substâncias poliméricas extracelulares que representam uma barreira de proteção. Além disso, isolados bacterianos de superfícies internas dos tanques de leite cru apresentaram capacidade de produzir proteases quando presentes em biofilmes de cultura pura ou em cocultura (TEH et al., 2012; 2014).

2.2- Biofilme

Por muitos anos os estudos sobre a fisiologia bacteriana se concentraram principalmente sobre o estado planctônico, ou seja, células individuais, mas agora é bem estabelecido que as bactérias são capazes de alternar seu modo de vida entre planctônico e sésil (biofilmes). Um biofilme é definido como uma comunidade microbiana sésil, caracterizado por aderência a uma superfície (biótica ou abiótica), capaz de multiplicar-se e embeber-se em uma matriz viscosa composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas pelas próprias células do biofilme (CARPENTIER e CERF, 1993; WINGENDER et al., 2001; WHITCHURCH et al., 2002; COSTERTON et al., 2003; BJARNSHOLT et al., 2009; SIMÕES et al., 2010; SREY et al., 2013). As células bacterianas do biofilme resistem melhor às condições estressantes do ambiente, como por exemplo, estresses provocados por estímulos externos como tratamentos com agentes sanitizantes, aplicação de antimicrobianos, dessecação e luz ultravioleta. Isso se dá em razão da dificuldade de difusão dos sanitizantes e antimicrobianos, do metabolismo e, ou à variabilidade fenotípica das células bacterianas presentes no biofilme (PARSEK e FUQUA, 2004; HERRERA et al., 2007).

A formação do biofilme é um processo gradual e dinâmico, no qual consiste nas etapas de: (i) fixação inicial: a adesão da célula durante este processo depende fortemente das propriedades físico-químicas da superfície celular bacteriana e da superfície na qual a célula irá se aderir. Nesta fase, a adesão é reversível, podendo a célula se separar da superfície e retornar ao estilo de vida planctônico, pois há apenas interações de forças de van der Waals, hidrofóbicas e eletrostáticas; (ii) ligação irreversível: a mudança de ligação reversível para irreversível é uma mudança de uma interação fraca da bactéria com a superfície para uma ligação permanente com a presença de EPS. Após a ligação irreversível, é necessária uma forte força para a quebra dessas ligações com a superfície; (iii) desenvolvimento da arquitetura do biofilme: a formação de microcolônias resulta da acumulação e multiplicação simultânea de micro-organismos e juntamente com a produção de EPS, que ajuda a fortalecer a ligação entre as bactérias e o substrato e protege a colônia

de qualquer estresse ambiental; (iv) maturação: o biofilme se desenvolve em uma estrutura organizada que pode ser plana ou em forma de cogumelo. A maturidade estrutural, dependendo da espécie, pode ocorrer em um período de 10 dias ou mais; (v) dispersão: permite que as células voltem ao estado planctônico. O desprendimento é um processo ativo que permite a colonização de novos nichos, além disso, a falta de nutriente também é considerada como uma razão para o desprendimento, pois permite que as bactérias procurem outros ambientes ricos em nutrientes (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; BRYERS e RATNER, 2004; SREY et al., 2013).

As propriedades da superfície de adesão (por exemplo, rugosidade e características físico-químicas), os fatores ambientais como pH, temperatura, osmolaridade, composição de nutrientes e a presença de outras bactérias são fatores importantes que afetam o processo de formação do biofilme (HOOD e ZOTTOLA, 1997; STEPANOVIĆ et al., 2003; GIAOURIS et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2008; HABIMANA et al., 2010; TANG et al., 2011; GIAOURIS et al., 2014).

Os micro-organismos encontram condições favoráveis dentro do ambiente de processamento de alimentos para a formação de biofilmes, como por exemplo, o acúmulo de matéria orgânica e inorgânica nas superfícies (GIBSON et al., 1999; JOSEPH et al., 2001). Particularmente na indústria de leite, os equipamentos indevidamente higienizados constituem uma das principais fontes de contaminação pelo desprendimento de células do biofilme (KOUTZAYIOTIS, 1992; JESSEN e LAMMERT, 2003; QUIGLEY et al., 2013; SREY et al., 2013) e esta contaminação resulta na redução da vida útil, danos na qualidade e na segurança dos alimentos, uma vez que os patógenos também podem estar presentes em biofilmes (HOOD e ZOTTOLA, 1995; LINDSAY et al., 2002; MARQUES et al., 2007; BROOKS e FLINT, 2008; LATORRE et al., 2010; BAI e RAI, 2011).

2.3- Biofilme multiespécie

Uma comunidade de biofilme bacteriano pode compreender uma única ou múltiplas espécies, formando uma camada ou arranjos tridimensionais. Os biofilmes são ecossistemas grandes, complexos e organizados, em que os

canais de água são dispersos proporcionando passagens para nutrientes, metabólitos e troca de produtos residuais (SAUER et al., 2007; MARCHAND et al., 2012).

A colonização de superfícies por um único tipo de bactéria pode favorecer a adesão de outros micro-organismos não formadores de biofilme na mesma superfície, aumentando assim a contaminação microbiana (BROOKS e FLINT, 2008). Este processo permite o desenvolvimento de comunidades multiespécies (Figura 1), as quais, frequentemente, possuem maior estabilidade e resistência combinada do que a estrutura formada por uma das espécies individuais (MOLLER et al., 1998; BURMOLLE et al., 2006). Espécies bacterianas que residem nos biofilmes multiespécies normalmente interagem intra e inter especificamente. Interações, tanto espaciais e metabólicas, entre espécies contribuem para a organização de biofilmes multiespécies e a produção de um ambiente dinâmico (TOLKER-NIELSEN e MOLIN, 2000, NADELL et al., 2009, GIAOURIS et al., 2014; LIU et al., 2016). Essas interações podem também resultar na regulação coordenada da expressão gênica nas diferentes espécies presentes e levar ao aumento da tolerância a antibióticos, a resposta imune do hospedeiro e a outros estresses, resultando em benefícios a todos os membros do biofilme (LIU et al., 2016). Estudos sobre a formação de biofilmes multiespécies a partir de amostras naturais não submetidos a cultivo individual são altamente relevantes do ponto de vista ecológico e, possivelmente, o mais próximo das condições naturais em modelos de biofilme *in vitro* (RODER et al., 2016).

Li et al. (2016) observaram que a formação de biofilme pelas espécies *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* foi dominado por *P. mirabilis* e a distribuição da biomassa desta bactéria foi fortemente correlacionada com a fração mineral do biofilme. Por outro lado, o crescimento das duas espécies sem biomineralização produziu padrões marcadamente diferentes no biofilme, com *P. aeruginosa* dominando a biomassa, demonstrando que o ambiente pode influenciar na composição bacteriana dos biofilmes.

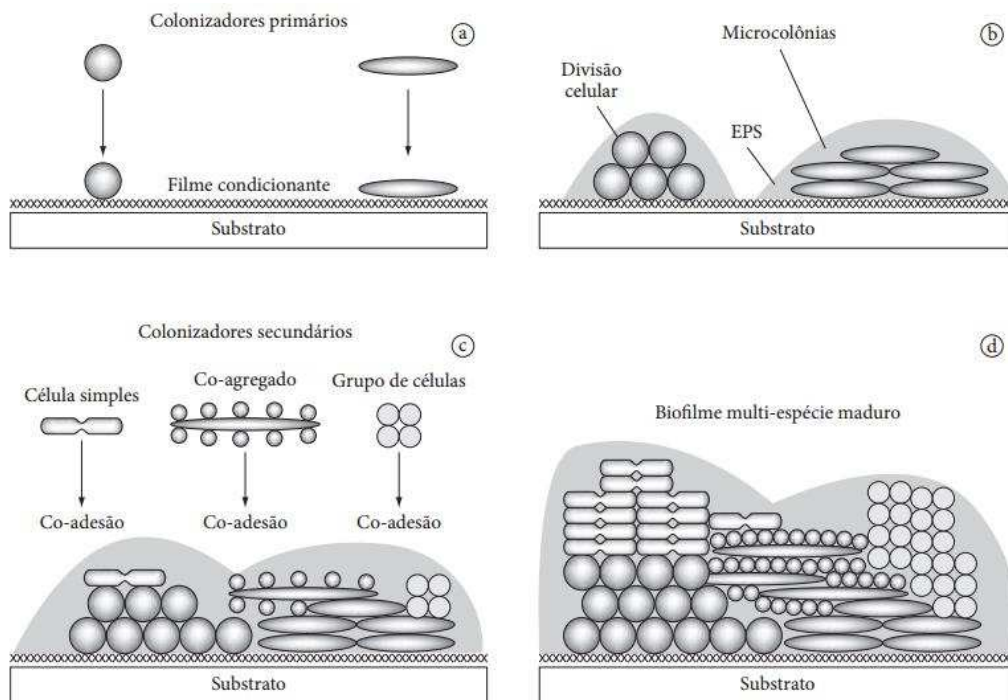


Figura 1- Esquema das etapas de formação de um biofilme multiespécie. a) Colonização primária da superfície; b) desenvolvimento, divisão celular, síntese de EPS e composição das microcolônias; c) coadesão de células simples e ou coagregados de células e ou grupo de micro-organismos; d) maturação e formação de um biofilme multiespécie. (BOARI et al., 2009)

As interações metabólicas se fazem presentes em biofilmes multiespécies e podem levar à competição ou cooperação. Essas interações são importantes, pois desempenham função relevante na manutenção da diversidade e estabilidade de comunidades microbianas (MOLLER et al., 1998; EMBREE et al., 2015; ZELEZNIAK et al., 2015). Em estudo realizado por Palmer et al. (2001) foi observado que *Streptococcus oralis* e *Actinomyces naeslundii* foram incapazes de formar biofilme quando cultivadas individualmente, porém quando foram cultivadas em cocultura, houve formação de biofilme, indicando uma cooperação metabólica entre as duas espécies.

2.4- Biofilme na indústria do leite

As superfícies das indústrias de alimentos que não são submetidas a limpeza e sanitização adequadas apresentam uma comunidade microbiana complexa, ao contrário dos biofilmes estudados no laboratório de espécies puras (BROOKS e FLINT, 2008; POIMENIDOU et al., 2009; SKANDAMIS et al., 2009). As interações entre as diferentes espécies podem influenciar a

capacidade de formação de biofilme de cada uma e este processo pode ser mediado por *quorum sensing*, o qual é um sistema de comunicação celular (SKANDAMIS e NYCHAS, 2012).

A presença de biofilmes em equipamentos e utensílios da indústria de processamento do leite, tais como curvas das tubulações, juntas, pisos, entre outros, tem sido bem documentada. O desenvolvimento dos biofilmes cria sérios problemas nas indústrias lácteas devido ao aumento na taxa de corrosão de superfícies metálicas, redução da eficiência de transferência de calor e aumento da resistência de fricção do fluido, além da redução da qualidade microbiológica dos produtos finais e perdas econômicas (MITTELMAN, 1998; BROOKS e FLINT, 2008; CHERIF-ANTAR et al., 2016).

A fixação de bactérias, com posterior desenvolvimento de biofilmes, permite que estas vivam em nichos protegidos. Essas comunidades bacterianas nos biofilmes podem compreender tanto espécies gram-positivas como gram-negativas. A presença de bactérias aderidas ou formadoras de biofilmes nas superfícies de utensílios e equipamentos de indústrias de leite é amplamente relatada e, entre elas, destacam-se *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Citrobacter*, *Shigella*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Flavobacterium*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella* spp. e *B. cereus*. (SHARMA e ANAND, 2002; VLKOVÁ et al., 2008; CLETO et al., 2012).

Latorre et al. (2010) avaliaram a presença de biofilmes em amostras retiradas diretamente de equipamentos de ordenha. Muitas bactérias foram encontradas aderidas à superfície dos medidores de leite, bem como em biofilme. Por microscopia eletrônica de varredura foi observado que as bactérias se encontravam especialmente nos arranhões da superfície interna dos medidores de leite.

Da fazenda até o consumidor, o leite entra em contato com as paredes de equipamentos em que é transportado e processado e os biofilmes podem ser formados nessas superfícies. Grande parte dos estudos considera a formação de biofilmes por culturas puras de bactérias isoladas de leite, não levando em consideração as interações dentro da comunidade bacteriana presente neste meio. Destaca-se, portanto a importância de avaliar a formação

de biofilmes multiespécie pela microbiota contaminante do leite. Assim, objetivou-se neste estudo, analisar a formação de biofilmes multiespécie em aço inoxidável pela microbiota contaminante do leite cru refrigerado, sua biodiversidade e a presença de micro-organismos proteolíticos no biofilme formado.

3- MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, Microbiologia de Anaeróbios e Associações Micorrizas do Departamento de Microbiologia, pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais. As instalações do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV também foram utilizadas.

3.1- Amostra

Foram utilizadas amostras de duas fontes de leite cru. Uma delas coletada diretamente no estábulo, logo após a ordenha mecânica e antes da entrada no tanque de refrigeração. A outra amostra foi de um laticínio da região, que recebia leite granelizado, ou seja, leite proveniente de vários produtores que foi armazenado em tanques de expansão a 4 °C na fazenda ou em unidades coletoras por até 48 h após a ordenha e transportado por caminhões com tanques isotérmicos.

Os experimentos foram conduzidos com amostras coletadas em três ocasiões diferentes no período correspondente ao inverno, ou seja, de 22 de junho a 21 de setembro de 2016.

3.2- Preparo e limpeza dos cupons

Cupons de aço inoxidável (AISI 304), acabamento # 4, nas dimensões de 1 x 1 cm e 4,8 x 1,5 cm foram perfurados em um dos vértices e previamente higienizados com esponja macia, detergente líquido neutro e água. Após serem enxaguados, os cupons foram imersos em NaOH 1 % por uma hora e enxaguados em água destilada. Em seguida, os cupons foram imersos em etanol 100 % e deixados em banho ultrassom 100 W MSE 20 KH2 (Cole-Parmer, EUA) por 30 min, este processo resulta na remoção de células aderidas. Posteriormente, os cupons foram esterilizados em autoclave, a 121 °C por 15 min (OULAHAL-LAGSIR et al., 2003).

3.3- Condições de cultivo

O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL (Figura 2). Em cada Erlenmeyer, no total de cinco para cada amostra de leite, foram pendurados oito cupons de aço inoxidável (AISI 304), sendo dois cupons de 1 x 1 cm para a microscopia de epifluorescência e confocal e seis cupons de 4,8 x 1,5 cm para a análise das células sésseis. Posteriormente, foi colocado um volume de 350 mL das amostras de leite cru coletadas, quantidade suficiente para cobrir os cupons. As amostras foram então incubadas em BOD a 7 ± 2 °C por até 240 h.

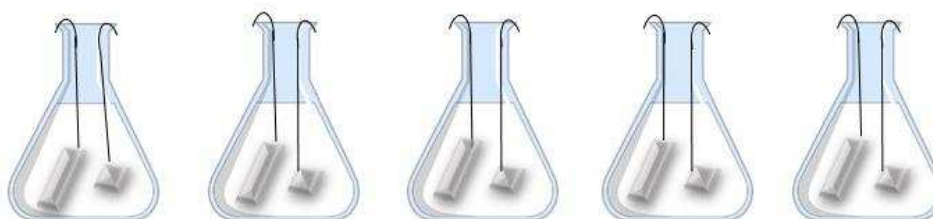


Figura 2- Esquema da montagem do experimento para cada uma das duas amostras de leite. O leite foi distribuído em cinco frascos Erlenmeyer contendo oito cupons de aço inoxidável e incubados em BOD a 7 ± 2 °C por até 240 h. A cada 24 h os cupons de um dos frascos Erlenmeyer eram analisados e o leite trocado por outra amostra de mesma procedência.

A cada dois dias, foram retirados os cupons de um dos Erlenmeyers para as análises de microscopia de epifluorescência, remoção das células sésseis para contagem, extração de DNA e análises metagenômicas. Nos demais frascos Erlenmeyer restantes, os cupons foram lavados de forma branda apenas com água esterilizada e, posteriormente o leite foi trocado por outro de mesma procedência, coletado no dia da troca. Essa estratégia foi adotada para simular o processo que ocorre nos tanques de refrigeração de leite nas fazendas leiteiras.

3.4 Quantificação da microbiota planctônica e sésil do leite

Para a quantificação da microbiota do leite, foi feita a Contagem Padrão em Placa de cada amostra de leite cru coletado. Para isso, diluições decimais seriadas foram feitas e posteriormente plaqueadas pelo método de espalhamento em superfície (*spread plate*) em ágar padrão para contagem

(PCA) suplementado com leite desnatado reconstituído 12 %. Após incubação por 7 dias a 7 °C e por 24 a 48 h a 30 °C, as colônias foram contadas em contador de colônias. Também foi observada a formação de halo ao redor das colônias, para quantificar a população de proteolíticos.

Para quantificação das células sésseis, os cupons foram retirados nos diferentes tempos de amostragem (2, 4, 6, 8 e 10 dias) e lavados com tampão fosfato-salina esterilizado (PBS, pH 7,4) (RYU e BEUCHAT, 2005), para a retirada de células planctônicas. Em seguida, cada cupom de 4,8 x 1,5 cm foi transferido para tubo de ensaio contendo 15 mL de PBS (pH 7,4) e submetido à ação de ultrassom por 30 min, para a remoção das células sésseis (OULAHAL-LAGSIR et al., 2003). Posteriormente, foi retirada uma alíquota da suspensão para o preparo de diluições decimais seriadas, que foram plaqueadas pela técnica de espalhamento em superfície em ágar PCA suplementado com leite desnatado reconstituído 12 %. A determinação de UFC/mL foi realizada após incubação por 7 dias a 7 °C e por 24 a 48 h a 30 °C. As suspensões de células obtidas dos seis cupons foram centrifugadas a 5000 g por 15 min e armazenadas a - 80 °C, para posterior extração de DNA.

O plaqueamento para quantificação da microbiota planctônica do leite foi feito em três repetições em duplicatas, enquanto que para a quantificação de células sésseis, foi feito o plaqueamento de duas repetições, em duplicata.

3.5- Observação do biofilme por microscopia de epifluorescência e confocal de varredura a laser

Nos tempos 2, 4, 6, 8 e 10 dias de incubação a 7 °C dos cupons em amostras de leite cru recém-ordenhado e granelizado, os biofilmes formados foram observados em microscópio de epifluorescência. Os cupons foram retirados e lavados com tampão fosfato (PBS) para a remoção das células que não aderiram. Posteriormente, os cupons foram fixados em lâminas de vidro e cobertos com solução de Kirkpatrick durante 3 min para fixar as células à superfície e, então, foram lavados com PBS. Em seguida, as células foram coradas com alaranjado de acridina (0,04 %) durante 5 min. Os cupons foram lavados novamente com PBS e mantidos protegidos da luz para serem

observados após 1 h, em microscópio de epifluorescência em filtro WB2 (Olympus, Japão).

Os biofilmes formados por 10 dias nos cupons de aço inoxidável, foram lavados duas vezes em PBS 0,2 M, pH 7,2 e incubados por 15 min na ausência de luz com uma mistura de iodeto de propídeo (IP) 20 µg/mL e isotiocianato de fluoresceína (FITC) 2 µg/mL em PBS 0,2 M pH 7,2. Posteriormente, os cupons foram lavados em PBS 0,2 M, pH 7,2 e analisados ao microscópio confocal de varredura a laser, marca Zeiss, modelo LSM 510 META (Zeiss, Alemanha) usando o laser Argônio (comprimento de onda 458 nm e 514 nm). As células que apresentaram coloração avermelhada ou amarelada foram consideradas mortas e aquelas com coloração esverdeada foram consideradas viáveis (WANG et al., 2012). A ferramenta “z-stack” presente no *software* LSM 510 META foi utilizada para avaliação da espessura do biofilme.

3.6- Extração de DNA

As células removidas do biofilme foram centrifugadas em tubos Eppendorfs de 2 mL a 1000 g por 5 min para concentração e posterior extração do DNA total, utilizando-se o kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega, EUA), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, a partir da etapa para bactérias gram-positivas, o qual também apresenta eficiência para gram-negativas.

O DNA extraído teve sua qualidade analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8 %. O rendimento das extrações foi avaliado pela quantificação em espectrofotômetro Thermo Scientific SkanIt® Software 3.2 for Multiskana (Massachusetts, EUA) pela relação de absorvância A_{260}/A_{280} e da concentração em ng/µL pelo Thermo Scientific nDrop Plate (Vantaa, Finland).

3.7- Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Para a realização da técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante - DGGE foi feita uma PCR utilizando os oligonucleotídeos 341f-GC (5' -CCTACGGGAGGCAGCAGCGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3') e 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). A amplificação foi realizada em termociclador modelo A200 (Veragle, China), em

volume final de 25 μL contendo 2,5 μL de tampão GoTaq, 2,0 μL de MgCl_2 (25 mM), 2,0 μL de dNTPs (2 mM), 0,3 μL de cada oligonucleotídeo (10 mM), 0,4 μL de BSA acetilado (10 mg/mL), 0,5 μL de GoTaq polimerase, 1 μL de DNA e 16 μL de água MiliQ. As amostras utilizadas na reação de amplificação continham de 10 a 30 ng de DNA. Os reagentes utilizados foram adquiridos da Promega (Promega, Madison, EUA). A qualidade do produto da PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,8 %.

A DGGE foi feita utilizando o equipamento DGGE-2401 (C.B.S., Scientific Company, INC., EUA). Um volume de 8 μL dos produtos de PCR foram aplicados juntamente com 8 μL do tampão da amostra (azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%, glicerol 70% e TAE 1 X), em gel de poliacrilamida (acrilamida:N,N'-metilenobisacrilamida, 37:5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE 1X, para fragmentos de tamanhos variando de 200 pb a 400 pb. O gradiente desnaturante variou linearmente de 40% a 60% para a análise dos fragmentos. Como marcador foi utilizado uma mistura de fragmentos de rRNA 16S das espécies bacterianas: *E. coli* ATCC 29214 (γ -Proteobacteria), *S. enterica* Typhimurium ATCC 14028 (γ -Proteobacteria), *B. cereus* ATCC 14579 (Firmicutes) e *L. lactis* ATCC 19435 (Firmicutes) (BENTO et al., 2015).

A eletroforese foi feita em temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 16 h e com voltagem constante de 150 V. O gel foi corado por 20 min com solução de SYBR® Gold (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A partir do sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene, EUA) o gel foi visualizado e foto-documentado. Os dados obtidos da eletroforese em gel de gradiente desnaturante foram analisados pelo programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). As similaridades foram calculadas usando a correlação de DICE e o agrupamento pelo método do grupo de pares não ponderado (UPGMA). A partir da matriz binária gerada pelo programa BioNumerics, o índice de Shannon–Wiener e de riqueza foram calculados utilizando o programa Past (HAMMER et al., 2001; BENTO et al., 2015).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Contagem de células

A contagem padrão de mesófilos aeróbios das amostras de leite coletadas imediatamente após a ordenha foi de, no máximo $7,9 \times 10^4$ UFC/mL (Figura 3A) e este valor está dentro do permitido pela legislação brasileira que é de, no máximo, $1,0 \times 10^5$ UFC/mL no leite produzido nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste a partir de 1 de julho de 2016 (BRASIL, 2011). É possível obter leite com contagens tão baixas como de, aproximadamente, 10^3 UFC/mL, uma vez que os animais e equipamentos de ordenhas estejam devidamente higienizados (OLIVER et al., 2009). Por outro lado, a contagem de mesófilos aeróbios na amostra de leite granelizado alcançou valores de até $8,1 \times 10^6$ UFC/mL (Figura 3B). Além de estar fora do limite máximo permitido pela IN nº 62 de 2011 para a região Sudeste (BRASIL, 2011), esta contaminação elevada compromete a qualidade da matéria-prima e do produto final. Pinto et al. (2006) observaram que 58,3 % das amostras de leite granelizado recebidos em uma indústria de laticínios apresentaram contagens de mesófilos entre 10^5 e 10^7 UFC/mL. Valores entre $1,4 \times 10^5$ UFC/mL e $8,8 \times 10^7$ UFC/mL de mesófilos também foram relatados por Machado et al. (2015) em amostras de leite cru granelizado coletadas em fazendas da região de Viçosa, MG. Estes resultados indicam falhas na higiene com a ocorrência de contaminação e, ou crescimento microbiano, uma vez que estas amostras estavam previamente armazenadas em tanques coletivos.

A contaminação do leite cru por bactérias psicrotóxicas aeróbias foi, em média, de $4,8 \times 10^4$ UFC/mL nas amostras de leite recém-ordenhado (Figura 3A), enquanto, nas amostras de leite granelizado foi, em média, $4,5 \times 10^6$ UFC/mL (Figura 3B). A diferença de 0,2 a 0,3 ciclo log entre a população de mesófilos e psicrotóxicos nas amostras analisadas indica que a maioria dos contaminantes psicrotóxicos presentes no leite cru têm crescimento ótimo próximo de 30 °C. De fato, Pinto et al. (2006) e Hantis-Zacharov e Halpern (2007) encontraram semelhança na relação entre as contagens de microorganismos mesófilos e psicrotóxicos em amostras de leite cru refrigerado, e

Machado et al. (2015) também não registraram diferenças significativas entre as contagens da população destes dois grupos microbianos.

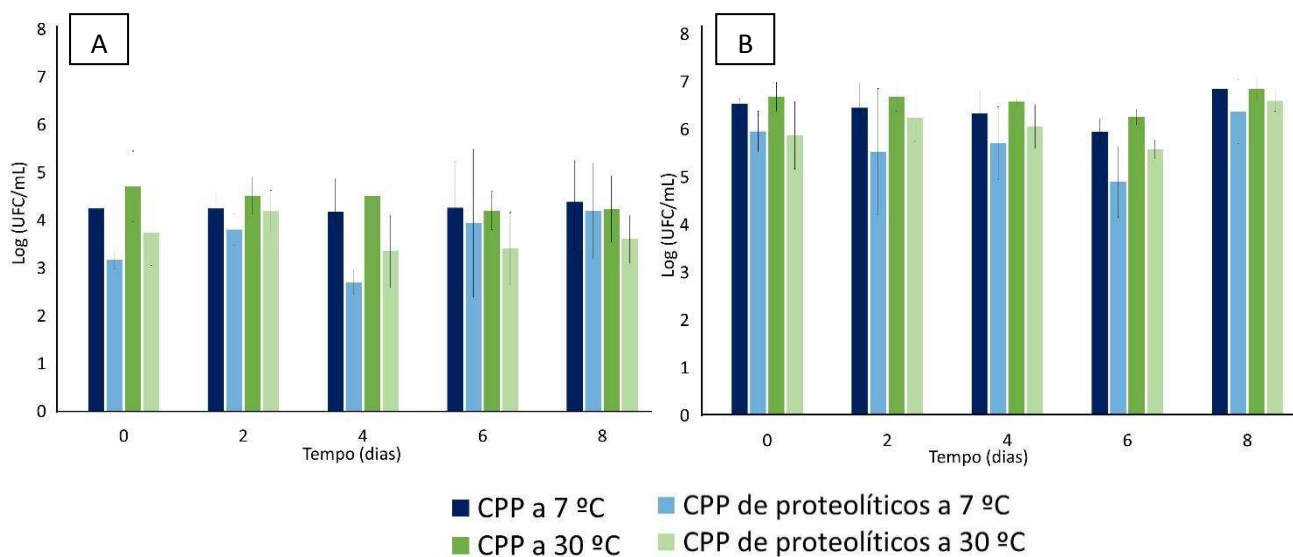


Figura 3- Logarítmo do número de Unidades Formadoras de Colônias/mL da microbiota psicrotrófica, mesófila e proteolítica do leite. (A) População do leite recém ordenhado; (B) População do leite granelizado. Incubação a 7 °C por 7 dias e 30 °C por 24 a 48 h.

O plaqueamento das amostras de leite para a contagem padrão foi feito em meio de cultura suplementado com leite para observar a presença de micro-organismos proteolíticos. A porcentagem de proteolíticos na amostra de leite recém-ordenhado foi em média 23 % em relação à população de mesófilos e de 32 % em relação à população de psicrotróficos (Figura 3 A e B). A amostra de leite granelizado apresentou uma média de 37 % de mesófilos proteolíticos e 35 % de psicrotróficos proteolíticos. Pinto et al. (2006) observaram que 80 % de mesófilos e psicrotróficos eram proteolíticos em amostras de leite cru. Altas porcentagens de proteolíticos não são desejáveis para as indústrias de leite e derivados, pois as enzimas liberadas por esses micro-organismos podem degradar as proteínas do leite e comprometer a qualidade sensorial, o rendimento e a vida de prateleira dos produtos lácteos (BAUR et al., 2015).

A Figura 4 ilustra o número de células (UFC/cm²) da microbiota das amostras de leite cru aderidas aos cupons de aço inoxidável ao longo de 10 dias de incubação. O número de células sésseis nos cupons imersos no leite recém-ordenhado alcançou contagem de 10⁵ UFC/cm² de psicrotróficos no décimo dia, enquanto o biofilme formado na presença do leite granelizado

atingiu 10^6 UFC/cm². No biofilme formado a partir do leite recém-ordenhado, houve um aumento médio de 2,7 ciclos log de mesófilos e de 3,3 ciclos log de psicrotróficos, entre o 2º e 10º dia de incubação a 7 °C. Neste mesmo período, este aumento foi de 2,2 ciclos log de mesófilos e 1,9 ciclos log de psicrotróficos quando a amostra era de leite granelizado. Pode-se sugerir que a presença de maior número de células sésseis nos cupons imersos no leite granelizado é em razão do alto número de contaminantes planctônicos nesta matéria prima e não em razão de maior adesão e capacidade de formação de biofilmes destes contaminantes. Além disso, estudos demonstram que, em muitas espécies, o desenvolvimento de biofilme é regulado pelo *quorum sensing*, mecanismo que depende de uma alta densidade populacional.

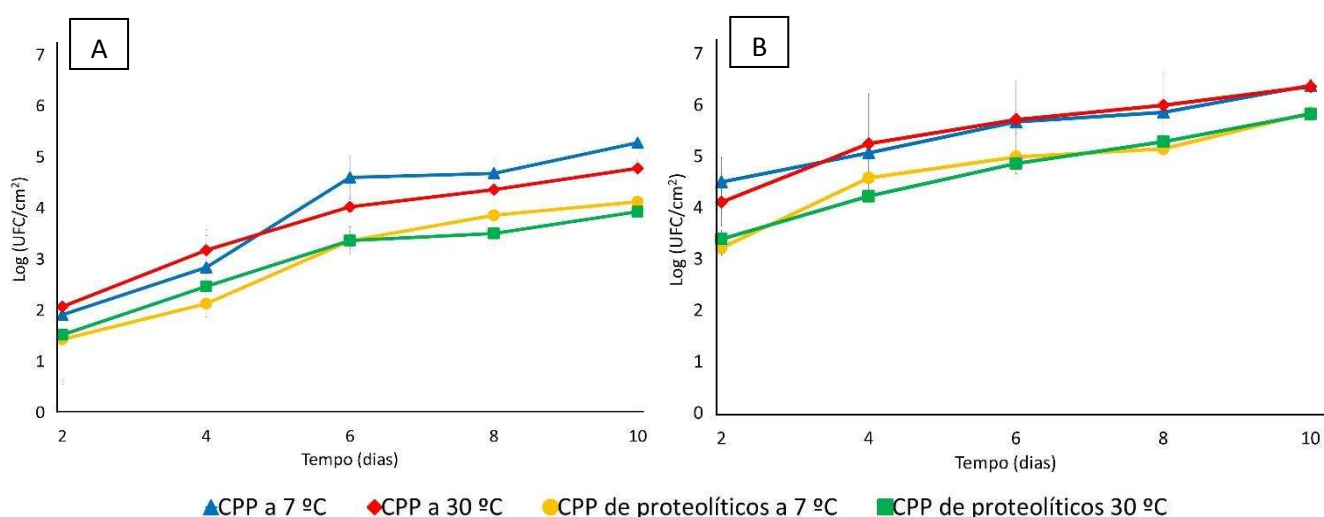


Figura 4- Logarítmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/cm²) da microbiota psicrotrófica, mesófila, psicrotrófica proteolítica e mesófila proteolítica aderida a cupons de aço inoxidável imersos em amostras de leite cru incubadas a 7 °C por 7 dias e a 30 °C por 24 a 48 h. (A) Amostras de leite recém-ordenhado; (B) Amostras de leite granelizado.

A proporção de micro-organismos proteolíticos presentes no biofilme formado a partir do leite recém-ordenhado após 10 dias de incubação representou 13 % em relação a população de mesófilos e 7 % em relação a população de psicrotróficos (Figura 4A). No biofilme formado a partir do leite granelizado, 29 % dos mesófilos e psicrotróficos foram proteolíticos (Figura 4B). Biofilmes formados por espécies proteolíticas nas indústrias de leite

podem se tornar fonte de micro-organismos produtores de proteases, que são liberadas no leite cru durante seu armazenamento, causando efeitos prejudiciais na qualidade tanto da matéria-prima como do produto final. Teh et al. (2014) investigaram os efeitos das proteases produzidas por micro-organismos presentes no biofilme multiespécie em leite desnatado UHT. O leite foi exposto ao biofilme multiespécie formado em recipientes de aço inoxidável por um período de 10 h a 20 °C e foi observada ao longo dos cinco meses de estocagem, proteólise gradual maior do que a do controle.

4.2- Estrutura do biofilme

A observação dos cupons imersos nas amostras de leite cru por microscopia de epifluorescência permitiu a distinção de aglomerados celulares que podem se tratar de biofilmes (Figura 5). Essa técnica de microscopia, juntamente com a contagem de células sésseis permite analisar a possível formação de biofilme. Salta et al. (2013) ressaltaram que é interessante utilizar a microscopia em trabalhos de biofilme para confirmar dados quantitativos e qualitativos para obter informações a respeito da estrutura do biofilme.

As imagens da microscopia de epifluorescência (Figura 5) sugerem que, na presença do leite recém-ordenhado, o biofilme foi formado a partir do 8º dia de incubação (Figura 5D), enquanto nos cupons no leite granelizado, no 4º dia de incubação já foi possível a observação dessas estruturas (Figura 5G). Em ambas as amostras, as populações de células viáveis dessas estruturas se encontravam em torno de 10^5 UFC/cm².

A contagem do número de colônias que representa o número de células sésseis (Figura 3) corrobora a observação microscópica de que a menor contaminação do leite recém-ordenhado resultou em menor formação de biofilme. Deve-se destacar que, durante as análises de microscopia de epifluorescência, a presença da gordura do leite dificultou a observação do biofilme pois, esta era capaz de reter o corante alaranjado de acridina.

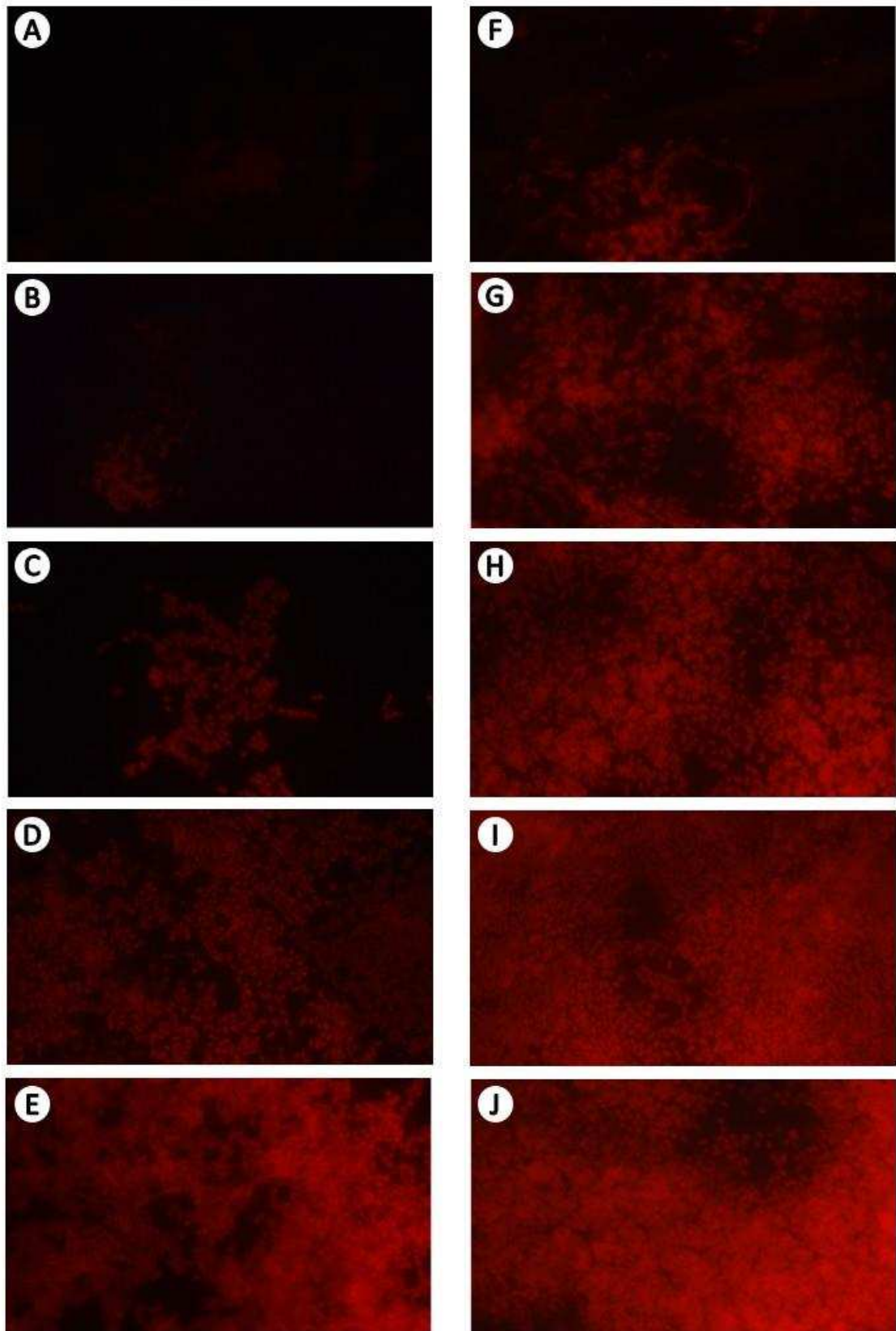


Figura 5- Imagens de microscopia de epifluorescência em aumento de 1000 vezes. A, B, C, D e E representam imagens do cupom de aço inoxidável imerso no leite recém-ordenhado, nos dias 2, 4, 6, 8 e 10, respectivamente. F, G, H, I e J representam imagens do cupom de aço inoxidável imerso no leite granelizado, nos dias 2, 4, 6, 8 e 10, respectivamente.

Outra técnica microscópica utilizada para a observação dos biofilmes nos cupons de aço inoxidável formados no décimo dia de incubação foi a microscopia confocal a laser. Por esta técnica, a estrutura do biofilme foi observada em seu estado hidratado, podendo ser diferenciada a viabilidade celular com a utilização dos fluoróforos iodeto de propídeo e fluoresceína isotiocianetada (FITC). Esses corantes são capazes de penetrar tanto nas células viáveis como nas mortas, no entanto, as células viáveis são capazes de lançar o iodeto de propídeo para fora. Dessa forma, o corante FITC permanece dentro das células viáveis, dando a estas uma coloração esverdeada, enquanto que nas células mortas, o vermelho do iodeto de propídeo sobressai ao FITC. Assim, as células com tom de vermelho ou laranja são consideradas inviáveis (WANG et al. 2012). A maioria das células dos biofilmes observados estava na forma viável (Figura 6).

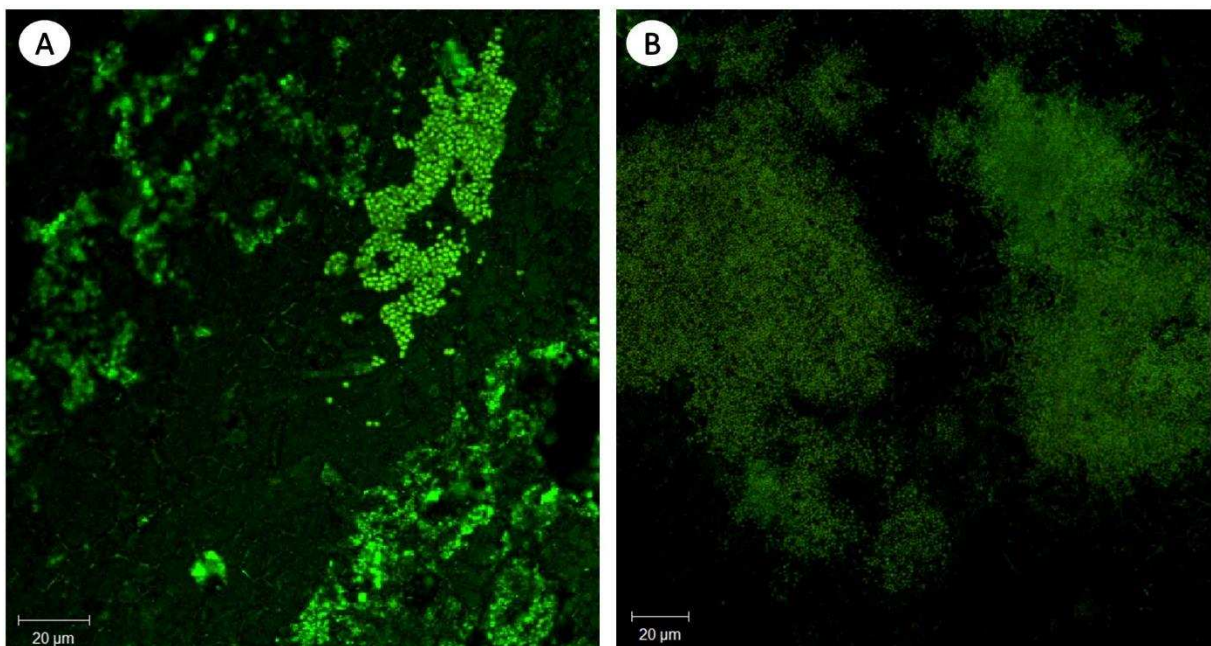


Figura 6- Imagens de microscopia confocal a laser do biofilme no 10º dia de incubação. A: Cupom de aço inoxidável imerso no leite recém-ordenhado. B: Cupom de aço inoxidável imerso no leite granelizado.

Na Figura 7 podem-se visualizar dois tipos de morfologia celular, cocos e bacilos, indicando a formação de biofilmes multiespécie. A coagregação bacteriana na fase planctônica desempenha função fundamental no desenvolvimento de biofilmes multiespécies e a dominância de algumas espécies pode ser atribuída à capacidade das bactérias colonizadoras

formarem microcolônias rapidamente e produzirem compostos antibacterianos inibindo outros organismos (RICKARD et al., 2003; FILOCHE et al., 2004; RAO et al., 2006). Cherif-Antar et al. (2016) observaram a microbiota aderente à tubulação em uma indústria de laticínios em duas posições diferentes, antes e após o processo de pasteurização. Esses autores verificaram que o número de bactérias gram-negativas recuperadas antes da pasteurização representava 63 % da população total, porém, após o processo de pasteurização os isolados gram-positivos representavam maior porcentagem, 69%. Em biofilmes formados pelas espécies *E. coli* e *B. cereus*, Al-Adawi et al. (2016) observaram que *E. coli* se encontrava principalmente na parte interna do biofilme, na proximidade da superfície metálica, enquanto que *B. cereus* foi observado sozinho nas partes externas, sugerindo que *E. coli* aderiu primeiro.

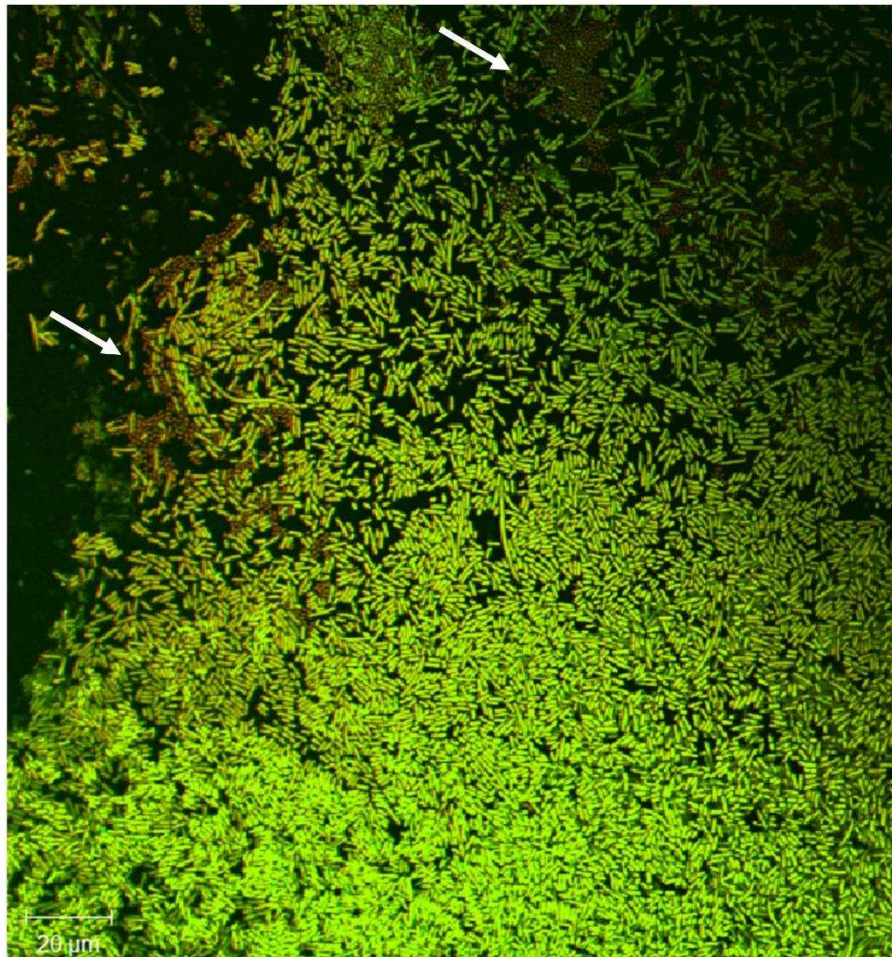


Figura 7- Imagem de microscopia confocal a laser do cupom de aço inoxidável imerso no leite granelizado a 7 °C no 10º dia de incubação. As setas indicam regiões onde se encontram dois tipos de morfologia celular, cocos e bacilos.

Considerando que biofilme espesso só foi observado quando os cupons de aço inoxidável estavam imersos no leite granelizado, estes foram usados para avaliação pela ferramenta “z-stack” presente no *software* LSM 510 META, para obtenção de informações mais detalhadas sobre o biofilme. Esta ferramenta permite observar desde a base do biofilme, passando pelo interior, até a extremidade (Figura 8). O biofilme observado apresentou espessura em torno de 18 μm e essas imagens possibilitaram também visualizar a presença de células viáveis no biofilme desde a base até o ápice. A Figura 9 foi feita utilizando a mesma ferramenta “z-stack” e permite visualizar a espessura do biofilme em dois eixos. Com estas imagens, pode-se verificar que o biofilme é denso e apresenta estrutura tridimensional irregular, em relevos.

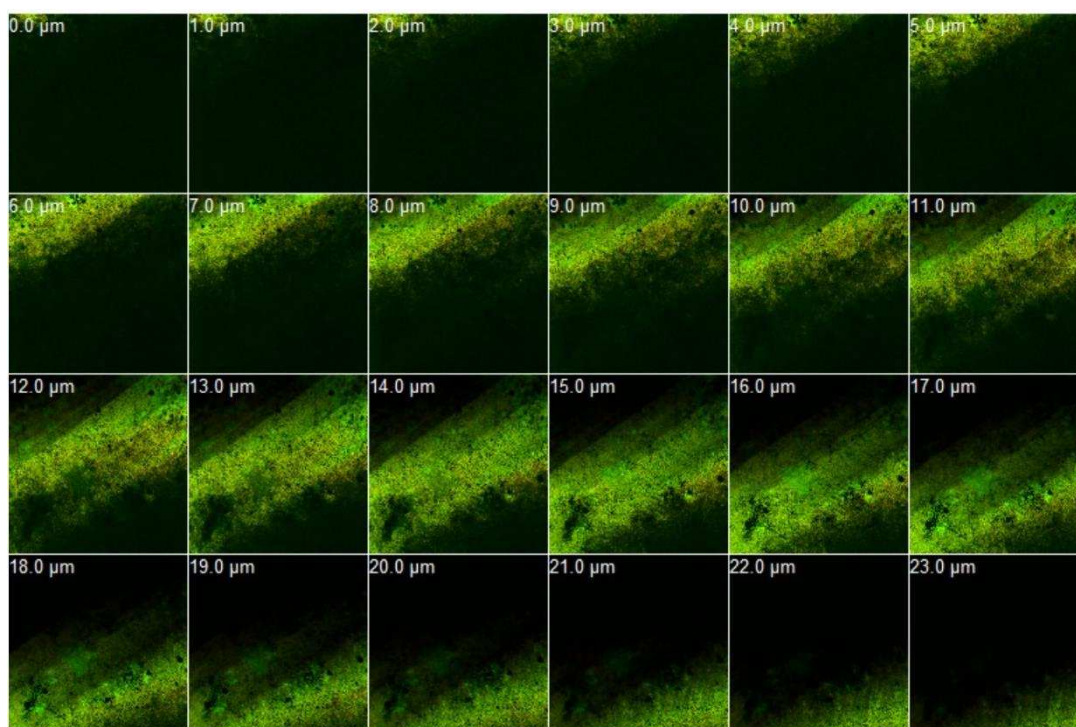


Figura 8- Imagens de microscopia confocal a laser no 10º dia do biofilme em cupom de aço inoxidável imerso no leite granelizado, utilizando ferramenta “z-stack” presente no *software* LSM 510 META.

Alguns autores divergem quanto ao número de células/cm² para se considerar a presença de um biofilme. Para Wirtanen et al. (1996), número de células aderidas de 10³ UFC/cm² pode representar um biofilme enquanto Andrade et al. (1998) acreditam que são necessárias, no mínimo, 10⁷ UFC/cm² para considerar um biofilme. No presente trabalho, analisando os dados de

microscopia e contagem de células, pode-se sugerir que a partir de 10^5 UFC/cm² há presença de biofilme.

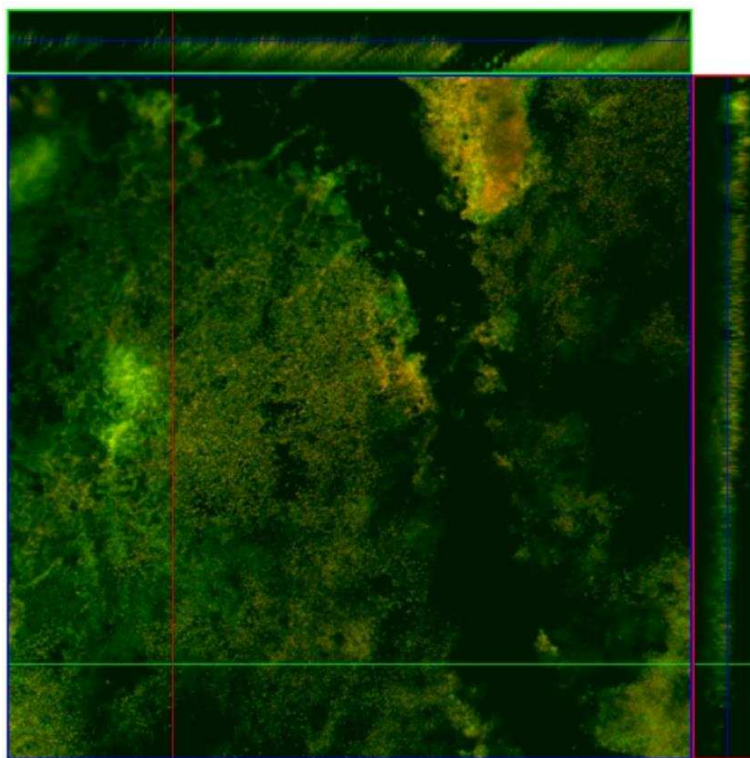


Figura 9- Imagens de microscopia confocal a laser no 10º dia do biofilme em cupom de aço inoxidável imerso no leite granelizado, utilizando a ferramenta “z-stack” presente no *software* LSM 510 META.

4.3- Obtenção de DNA

A concentração do DNA das amostras e sua integridade, em relação à quebra durante o processo de extração, foram avaliadas pela presença de bandas no gel de agarose a 0,8 %, porém, esta não correspondeu àquela observada pela espectrofotometria a 260 nm (Tabela 3). Este resultado pode estar relacionado à presença de resquícios da matriz do leite, que apresenta interferentes como lipídios e proteínas e também, à presença de moléculas de oligonucleotídeos e nucleotídeos livres, que interferem na técnica de espectrofotometria, pois absorvem luz no mesmo comprimento de onda que os ácidos nucleicos (LI et al., 2014; PSIFIDI et al., 2015).

Tabela 3- Concentração de DNA obtido das amostras de biofilme

	Dia	ng/μL^a	Banda no gel^b	PCR^c
Leite recém-ordenhado				
1^a Repetição	2 ^o dia	11,07	-	-
	4 ^o dia	8,82	-	-
	6 ^o dia	19,90	++	+
	8 ^o dia	8,92	+	+
	10 ^o dia	10,58	+	+
2^a Repetição	2 ^o dia	9,50	-	-
	4 ^o dia	10,09	-	-
	6 ^o dia	8,82	-	-
	8 ^o dia	9,21	-	-
	10 ^o dia	8,33	-	-
Leite granelizado				
1^a Repetição	2 ^o dia	11,27	-	-
	4 ^o dia	10,58	-	-
	6 ^o dia	32,64	+	+
	8 ^o dia	81,47	++	+
	10 ^o dia	69,21	++	+
2^a Repetição	2 ^o dia	8,03	-	-
	4 ^o dia	8,33	-	-
	6 ^o dia	10,98	-	-
	8 ^o dia	10,88	+	+
	10 ^o dia	15,49	+	+

^a Quantificação por espectrofotometria do DNA total expresso em ng/μL.

^b Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8 %. (-) ausência de banda; (+) bandas fracas; (++) bandas fortes.

^c Resultados da PCR. (-) não amplificou; (+) houve amplificação.

As concentrações de DNA total obtido a partir das amostras de células aderidas e do biofilme nos diferentes tempos variaram de 8,0 a 81,0 ng/μL (Tabela 3). As menores concentrações de DNA foram obtidas nos tempos iniciais da formação do biofilme e nos cupons imersos no leite recém-ordenhado, pois estas amostras foram as que apresentaram menor número de

células contaminantes. Maiores concentrações de DNA foram obtidas das amostras dos cupons imersos no leite granelizado, já que estas eram as amostras que estavam mais contaminadas. Embora tenha sido observado pela microscopia de epifluorescência a presença de células nos cupons imersos no leite recém-ordenhado, não se conseguiu a extração de DNA na segunda repetição.

Posteriormente, o DNA obtido foi submetido à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, para subsequente análise pela técnica de DGGE.

4.4- Análise da diversidade genética pela técnica de DGGE

Foi observado que o DNA das células aderidas provenientes das duas amostras de leite apresentou similaridade de 85 % (Figura 8). Este resultado indica que, embora as amostras de leite apresentam origens distintas e número de contaminantes diferentes, o leite cru recém-ordenhado e o granelizado apresentaram semelhante estrutura da comunidade microbiana aderida ao aço inoxidável. O agrupamento principal do dendograma ocorreu entre o 8º e 10º dia do biofilme, em ambas as amostras de leite, e o 6º dia apresentou similaridade de 79 % e 92 % com o agrupamento formado pelas amostras do oitavo e décimo dia do leite recém-ordenhado e granelizado, respectivamente. Estudos sobre a formação de biofilmes multiespécies a partir de amostras ambientais sem o cultivo individual dos micro-organismos é de grande importância do ponto de vista ecológico, chegando o mais próximo das condições naturais encontradas no ambiente (RODER et al., 2016). Jonghe et al. (2011) monitoraram em escala laboratorial a diversidade de *Pseudomonas* spp. em leite cru refrigerado, simulando a cadeia de processamento em laticínios. Para isso, utilizaram a técnica de DGGE, com posterior sequenciamento das bandas. Eles observaram predominantemente, a ocorrência de duas espécies, *P. fragi* e *P. lundensis*, no leite no final da simulação da cadeia láctea.

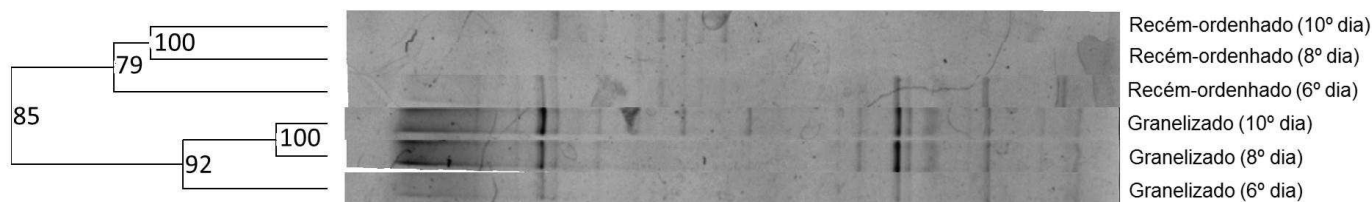


Figura 9- Perfil eletroforético de sequências do gene rRNA 16S da microbiota do biofilme obtido por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). Os números presentes no dendograma indicam o nível de similaridade.

O biofilme formado na presença do leite recém-ordenhado apresentou diminuição no índice de diversidade Shannon-Wiener entre o sexto e décimo dia, de 2,63 para 1,94, enquanto no biofilme formado neste mesmo período na presença do leite granelizado houve um aumento da diversidade, de 1,94 para 2,70. A riqueza dos biofilmes acompanhou o mesmo resultado da diversidade, observando-se diminuição de espécies ao longo da formação do biofilme na presença do leite recém-ordenhado e aumento durante a formação do biofilme na presença do leite granelizado. O resultado observado pode ser em razão da maior contaminação de células planctônicas na amostra do leite granelizado, visto que este é proveniente de vários produtores rurais, que resulta em maior manipulação do produto, entretanto pode ter levado a uma maior competição entre as espécies no início da formação do biofilme. Com o passar do tempo as espécies menos competidoras e menos formadoras de biofilme podem se agregar à matriz e conseguem se estabelecer, aumentando sua abundância (BROOKS e FLINT, 2008; JAGMANN et al., 2015). Na formação do biofilme na presença do leite recém-ordenhado, por se tratar de um leite menos contaminado, no início muitas espécies conseguem se aderir e permanecer, provavelmente devido à pouca competição. Assim há um aumento das populações estabelecidas nos biofilmes e as espécies menos competidoras podem ser eliminadas, consequentemente, diminuindo a diversidade microbiana.

5- CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

A microbiota contaminante presente no leite cru refrigerado pode se aderir nas superfícies de aço inoxidável e formar biofilmes multiespécies. A amostra de leite com maior contaminação (10^6 UFC/mL) apresentou um biofilme mais denso e em menor tempo em comparação com o leite menos contaminado (10^4 UFC/mL), demonstrando que a contaminação do leite influencia na formação desses biofilmes.

Muitos dos micro-organismos psicrotóxicos proteolíticos são capazes de se aderir nas superfícies de aço inoxidável e formar biofilmes, podendo comprometer a matéria prima ou os produtos lácteos.

Conhecer e entender os micro-organismos, muitos deles não cultiváveis, e a estrutura desses biofilmes é fundamental para traçar estratégias de prevenção e controle eficazes para eliminação dos mesmos nas indústrias laticínias.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. M., BARACH, J. T., SPECK, M. L. Heat Resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 6, p. 828-834, 1975.

AL-ADAWI, A. S., GAYLARDE, C. C., SUNNER, J., BEECH, I. B. Transfer of bacteria between stainless steel and chicken meat: a CLSM and DGGE study of biofilms. **AIMS Microbiology**, v. 2, p. 340-358, 2016.

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, n. 7, p. 833-838, 1998.

ARCURI, E.F., SILVA, P., BRITO, M., BRITO, J.R.F., LANGE, C.C., MAGALHÃES, M. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural** v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

BAI, A. J., RAI, V. R. Bacterial quorum sensing and food industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 183-193, 2011.

BAUR, C., KREWINKEL, M., KRANZ, B., VON NEUBECK, M., WENNING, M., SCHERER, S., STOECKELC, M., HINRICHS J., FISCHER, L. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 23-29, 2015.

BEN-BELHASSEN, B. Food Outlook: Biannual Report on Global Food Markets. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. ISSN: 1560-8182, junho de 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-l5703E.pdf>>. Acessado em 03 de novembro de 2017.

BENTO, C. B. P., AZEVEDO, A. C., DETMANN, E., MANTOVANI, H. C. Biochemical and genetic diversity of carbohydrate-fermenting and obligate amino acid-fermenting hyper-ammonia-producing bacteria from Nelore steers fed tropical forages and supplemented with casein. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 28, 2015.

BIANCHINI, V., BORELLA, L., BENEDETTI, V., PARISI, A., MICCOLUPO, A., SANTORO, E., RECORDATI C., LUINI, M. Prevalence in bulk tank milk and epidemiology of *Campylobacter jejuni* in dairy herds in Northern Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1832-1837, 2014.

BJARNSHOLT, T., JENSEN, P. O., FIANDACA, M. J., PEDERSEN, J., HANSEN, C. R., ANDERSEN, C. B., HOIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatric Pulmonology**, v. 44, n. 6, p. 547-558, 2009.

BOARI, C. A., ALVES, M. P., TEBALDI, V. M. R., SAVIAN, T. V., PICCOLI, R. H. Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel using milk and different conditions of cultivation. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de Leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. p. 8–13, 2002.

BRASIL. 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. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. p. 6–37, 2011.

BROOKS, J. D.; FLINT, S. H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 12, p. 2163-2176, 2008.

BRYERS, J. D., RATNER, B. D. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News-American Society for Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 232-232, 2004.

BURMOLLE, M., WEBB, J. S., RAO, D., HANSEN, L. H., SORENSEN, S. J., KJELLEBERG, S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3916-3923, 2006.

CARPENTIER, B., CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 499-511, 1993.

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

CHAMPAGNE, C. P., LAING, R. R., ROY, D., MAFU, A. A., GRIFFITHS, M. W., WHITE, C. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 1-30, 1994.

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

CHERIF-ANTAR, A., MOUSSA-BOUDJEMÂA, B., DIDOUH, N., MEDJAHDI, K., MAYO, B., FLÓREZ, A. B. Diversity and biofilm-forming capability of

bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 1, p. 27-38, 2016.

CLETO, S., MATOS, S., KLUSKENS, L., & VIEIRA, M. J. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e40189, 2012.

COSTERTON, W., VEEH, R., SHIRTLIFF, M., PASMORE, M., POST, C., EHRLICH, G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 10, p. 1466-1477, 2003.

DATTA, N., DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk—a review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 79, n. 4, p. 197-210, 2001.

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.

EARLY, R. Contamination of Raw Milk: Sources and Routes Up to the Farm Gate. Em: Microbial Toxins in Dairy Products. **John Wiley & Sons Ltd**, 1 ed, p. 132-153, 2017.

EMBREE, M., LIU, J. K., AL-BASSAM, M. M., ZENGLER, K. Networks of energetic and metabolic interactions define dynamics in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 50, p. 15450-15455, 2015.

ERCOLINI, D., RUSSO, F., FERROCINO, I., VILLANI, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 228-231, 2009.

FILOCHE, S. K., ZHU, M., WU, C. D. *In situ* biofilm formation by multi-species oral bacteria under flowing and anaerobic conditions. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 10, p. 802-806, 2004.

FLINT, S. H., BREMER, P. J., BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, v. 11, n. 1, p. 81-97, 1997.

GIAOURIS, E., CHORIANOPOULOS, N., NYCHAS, G. J. 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.

GIAOURIS, E., HEIR, E., HÉBRAUD, M., CHORIANOPOULOS, N., LANGSRUD, S., MORETRO, T., HABIMANAB, O., DESVAUXC, M., RENIE, S., NYCHAS, G. J. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat

processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, v. 97, n. 3, p. 298-309, 2014.

GIBSON, H., TAYLOR, J. H., HALL, K. E., HOLAH, J. T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 41-48, 1999.

HABIMANA, O., MORETTO, T., LANGSRUD, S., VESTBY, L. K., NESSE, L. L., HEIR, E. Micro ecosystems from feed industry surfaces: a survival and biofilm study of *Salmonella* versus host resident flora strains. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 1, p. 48, 2010.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HANTSIS-ZACHAROV, E., HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7162-7168, 2007.

HASSAN, L., MOHAMMED, H. O., MCDONOUGH, P. L., GONZALEZ, R. N. A cross-sectional study on the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in New York dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 11, p. 2441-2447, 2000.

HAYES, M. C., RALYEA, R. D., MURPHY, S. C., CAREY, N. R., SCARLETT, J. M., BOOR, K. J. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 1, p. 292-298, 2001.

HERRERA, J. J. R., CABO, M. L., GONZÁLEZ, A., PAZOS, I., PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, p. 585-591, 2007.

HHS/PHS/FDA. Grade A pasteurized milk ordinance. **US Department of Health and Human Services/Public Health Services/Food and Drug Administration**. p. 423, 2001.

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

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, n. 2, p. 145-153, 1997.

JAGMANN, N., HENKE, S. F., PHILIPP, B. Cells of *Escherichia coli* are protected against severe chemical stress by co-habiting cell aggregates formed

by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 8285-8294, 2015.

JANK, M. S., GALAN, V. B. Competitividade do sistema agroindustrial do leite. **IPEA/PENSA/USP**, 1998.

JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Artmed Editora S.A., Porto Alegre, 711 p., 2005.

JAYARAO, B. M., HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 10, p. 2157-2162, 2001.

JAYARAO, B. M., WOLFGANG, D. R. Bulk-tank milk analysis – A useful tool for improving milk quality and herd udder health. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 75-92, 2003.

JAYARAO, B. M., PILLAI, S. R., SAWANT, A. A., WOLFGANG, D. R., HEGDE, N. V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3561-3573, 2004.

JAYARAO, B. M., DONALDSON, S. C., STRALEY, B. A., SAWANT, A. A., HEGDE, N. V., BROWN, J. L. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2451-2458, 2006.

JESSEN, B., LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 265-269, 2003.

JONGHE, V., COOREVITS, A., VAN HOORDE, K., MESSENS, W., VAN LANDSCHOOT, A., DE VOS, P., HEYNDRICKX, M. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 460-470, 2011.

JOSEPH, B., OTTA, S. K., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 367-372, 2001.

KARNS, J. S., VAN KESSEL, J. S., MCCLUSKY, B. J., PERDUE, M. L. Incidence of *Escherichia coli* O157: H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3212-3219, 2007.

KOUTZAYIOTIS, C. Bacterial biofilms in milk pipelines. **South African Journal of Dairy Science**, v. 24, p. 19-22, 1992.

LAFARGE, V., OGIER, J. C., GIRARD, V., MALADEN, V., LEVEAU, J. Y., GRUSS, A., DELACROIX-BUCHET, A. Raw cow milk bacterial population shifts

attributable to refrigeration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5644-5650, 2004.

LATORRE, A. A., VAN KESSEL, J. S., KARNS, J. S., ZURAKOWSKI, M. J., PRADHAN, A. K., BOOR, K. J., JAYARAO, B. M., HOUSER, B. A., DAUGHERTY, C. S., SCHUKKEN, Y. H. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2792-2802, 2010.

LAW, B. A., ANDREWS, A. T., SHARPE, M. E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, v. 44, n. 01, p. 145-148, 1977.

LI, X., WU, Y., ZHANG, L., CAO, Y., LI, Y., LI, J., WU, G. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. **Analytical Biochemistry**, v. 451, p. 18-24, 2014.

LI, X., LU, N., BRADY, H. R., e PACKMAN, A. I. Biomineralization strongly modulates the formation of *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 12, p. 189, 2016.

LIU, W., RODER, H. L., MADSEN, J. S., BJARNSHOLT, T., SORENSEN, S. J., e BURMOLLE, M. Interspecific bacterial interactions are reflected in multispecies biofilm spatial organization. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

LINDSAY, D., BRÖZEL, V. S., MOSTERT, J. F., VON HOLY, A. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 352-361, 2002.

MACHADO, S. G., DA SILVA, F. L., BAZZOLLI, D., HEYNDRIKX, M., COSTA, P. M. D. A., VANETTI, M. C. D. *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. M1842-M1849, 2015.

MACHADO, S. G., BAGLINIÈRE, F., MARCHAND, S., COILLIE, E. V., VANETTI, M. C. D., BLOCK, J., HEYNDRIKX, M. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 302, p.1-22, 2017.

MARCHAND, S., VANDRIESCHE, G., COOREVITS, A., COUDIJZER, K., DE JONGHE, V., DEWETTINCK, K., DE BLOCK, J. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1, p. 68-77, 2009.

MARCHAND, S., DE BLOCK, J., DE JONGHE, V., COOREVITS, A., HEYNDRIKX, M., HERMAN, L. Biofilm formation in milk production and

processing environments; influence on milk quality and safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 133-147, 2012.

MARQUES, S. C., REZENDE, J. G. O. S., ALVEZ, 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.

MCEWEN, S. A., FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. S93-S106, 2002.

MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 10, p. 2760-2764, 1998.

MOLLER, S., STERNBERG, C., ANDERSEN, J. B., CHRISTENSEN, B. B., RAMOS, J. L., GIVSKOV, M., MOLIN, S. *In situ* gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 721-732, 1998.

MUIR, D.D. The shelf life of dairy products: I. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n. 1, p. 24-32, 1996a.

MUIR, D.D. The shelf life of dairy products: II. Raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n. 1, p. 44-48, 1996b.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P., ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 334-346, 2006.

MURAOKA, W., GAY, C., KNOWLES, D., BORUCKI, M. Prevalence of *Listeria monocytogenes* subtypes in bulk milk of the Pacific Northwest. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 8, p. 1413-1419, 2003.

NADELL, C. D., XAVIER, J. B., FOSTER, K. R. The sociobiology of biofilms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 206-224, 2009.

NICODÈME, M., GRILL, J. P., HUMBERT, G., GAILLARD, J. L. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 641-648, 2005.

NÖRNBERG, M. F., FRIEDRICH, R. S., WEISS, R. D., TONDO, E. C., BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2010.

NÖRNBERG, M. D. F. B. L., MENTGES, M. L., SILVEIRA, S. T., TONDO, E. C., BRANDELLI, A. A psychrotrophic *Burkholderia cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk showing proteolytic activity and adhesion to stainless steel. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 03, p. 257-262, 2011.

OLIVER, S. P., JAYARAO, B. M., & ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens & Disease**, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005.

OLIVER, S. P., BOOR, K. J., MURPHY, S. C., MURINDA, S. E. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 7, p. 793-806, 2009.

OULAHAL-LAGSIR, N., MARTIAL-GROS, A., BONNEAU, M., BLUM, L. J. "Escherichia coli-milk" biofilm removal from stainless steel surfaces: Synergism between ultrasonic waves and enzymes. **Biofueling**, v. 19, n. 3, p. 159-168, 2003.

PALMER, R. J., KAZMERZAK, K., HANSEN, M. C., KOLENBRANDER, P. E. Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5794-5804, 2001.

PARSEK, M. R., FUQUA, C. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 4427-4440, 2004.

PINTO, C. L. DE O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PINTO, C. L. DE O., MACHADO, S. G., MARTINS, M. L., VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 105-116, 2015.

POIMENIDOU, S., BELESSI, C. A., GIAOURIS, E. D., GOUNADAKI, A. S., NYCHAS, G. J. E., e SKANDAMIS, P. N. *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 22, p. 7182-7188, 2009.

PONCE, A. R., MARTINS, M. L., ARAUJO, E. F., MANTOVANI, H. C., VANETTI, M. C. D. AiiA quorum-sensing quenching controls proteolytic activity and biofilm formation by *Enterobacter cloacae*. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 758-763, 2012.

POUTREL, B., VIALARD, J., GROUD, K., GRAIN, F., LAVERGNE, F. S. Sources of contamination of bovine milk and raw milk cheese by *Staphylococcus aureus* using variable number of tandem repeat analysis. **Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 6, n. 5, 2015.

PSIFIDI, A., DOVAS, C. I., BRAMIS, G., LAZOU, T., RUSSEL, C. L., ARSENOS, G., BANOS, G. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. **PLoS One**, v. 10, n., 1, 2015.

QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., STANTON, C., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013.

RAATS, D., OFFEK, M., MINZ, D., HALPERN, M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 465-471, 2011.

RAO, D., WEBB, J. S., KJELLEBERG, S. Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5547-5555, 2006.

RASOLOFO, E. A., ST-GELAIS, D., LaPOINTE, G., ROY, D. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1, p. 108-118, 2010.

RICKARD, A. H., MCBAIN, A. J., LEDDER, R. G., HANDLEY, P. S., GILBERT, P. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, n. 1, p. 133-140, 2003.

RODER, H. L., SORENSEN, S. J., BURMOLLE, M. Studying bacterial multispecies biofilms: Where to start? **Trends in microbiology**, v. 24, n. 6, p. 503-513, 2016.

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

ROHRBACH, B. W., DRAUGHON, F. A., DAVIDSON, P. M., OLIVER, S. P. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 2, p. 93-97, 1992.

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

SALTA, M., WHARTON, J. A., DENNINGTON, S. P., STOODLEY, P., STOKES, K. R. Anti-biofilm performance of three natural products against initial bacterial attachment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 21757-21780, 2013.

SÃO JOSÉ, J. F. B., VANETTI, M. C. D. Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, v. 24, n. 1, p. 95-99, 2012.

SAUER, K., RICKARD, A. H., DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe-American Society for Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 347, 2007.

SHARMA, M., ANAND, S. K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 627-636, 2002.

SIMÕES, M., SIMÕES, L. C., VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SKANDAMIS, P. N., STOPFORTH, J. D., ASHTON, L. V., GEORNARAS, I., KENDALL, P. A., SOFOS, J. N. *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 112-119, 2009.

SKANDAMIS, P. N., NYCHAS, G. J. E. Quorum sensing in the context of food microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5473-5482, 2012.

SOBRINHO, F. F., COUTINHO, G. H., COURA, J. D. Coleta de leite a granel. 1995. Monografia - Belo Horizonte: Fundação João Pinheiro.

SREY, S., JAHID, I. K., HA, S. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.

STEPANOVIĆ, S., ĆIRKOVIĆ, I., MIJAČ, V., ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 339-343, 2003.

TANG, L., PILLAI, S., REVSBECH, N. P., SCHRAMM, A., BISCHOFF, C., MEYER, R. L. Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. **Biofouling**, v. 27, n. 1, p. 111-121, 2011.

TEH, K. H., FLINT, S., PALMER, J., ANDREWES, P., BREMER, P., LINDSAY, D. Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 28-34, 2012.

TEH, K. H., LINDSAY, D., PALMER, J., ANDREWES, P., BREMER, P., FLINT, S. Proteolysis in ultra-heat-treated skim milk after exposure to multispecies biofilms under conditions modelling a milk tanker. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 2, p. 176-181, 2014.

TERNSTRÖM, A., LINDBERG, A. M., MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 1, p. 25-34, 1993.

TOLKER-NIELSEN, T., MOLIN, S. Spatial organization of microbial biofilm communities. **Microbial Ecology**, v. 40, n. 2, p. 75-84, 2000.

TOUCH, V., DEETH, H. C. Microbiology of raw and market milks. In: Milk processing and quality management. **John Wiley & Sons**, 1 ed, p. 48, 2009.

TREMONTE, P., TIPALDI, L., SUCCI, M., PANNELLA, G., FALASCA, L., CAPILONGO, V., SORRENTINO, E. Raw milk from vending machines: Effects of boiling, microwave treatment, and refrigeration on microbiological quality. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3314-3320, 2014.

VAN KESSEL, J. S., KARNS, J. S., GORSKI, L., MCCLUSKEY, B. J., PERDUE, M. L. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2822-2830, 2004.

VIANA, E. S., CAMPOS, M. E. M., PONCE, A. R., MANTOVANI, H. C., VANETTI, M. C. D. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk. **Biological Research**, v. 42, n. 4, p. 427-436, 2009.

VISSERS, M. M. M., DRIEHUIS, F. On-farm hygienic milk production. In: Milk processing and quality management. **John Wiley & Sons**, 1 ed, p. 1-22., 2008.

VLKOVÁ, H., BABÁK, V., SEYDLOVÁ, R., PAVLIK, I., SCHLEGELOVA, J. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms-a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 5, p. 309-323, 2008.

WANG, R., NEOH, K.G., SHI, Z., KANG, E.T., TAMBYAH, P. A., CHIONG, E. Inhibition of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 336-345, 2012.

WHITCHURCH, C. B., TOLKER-NIELSEN, T., RAGAS, P. C., MATTICK, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v. 295, n. 5559, p. 1487-1487, 2002.

WINGENDER, J., STRATHMANN, M., RODE, A., LEIS, A., FLEMMING, H. C. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances

from *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods in Enzymology**, v. 336, p. 302-314, 2001.

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.

ZADOKS, R. N., GONZALEZ, R. N., BOOR, K. J., SCHUKKEN, Y. H. Mastitis-causing streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2644-2650, 2004.

ZELEZNIAK, A., ANDREJEV, S., PONOMAROVA, O., MENDE, D. R., BORK, P., PATIL, K. R. Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 20, p. 6449-6454, 2015.

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, n. 2, p. 125-148, 1994.