

MÍRIAN PEREIRA DA SILVA

**EFEITO DO pH E TEMPERATURA NA ADESÃO E FORMAÇÃO
DE BIOFILMES DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Bacillus*
cereus EM AÇO INOXIDÁVEL**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2018

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

T

S586e
2018
Silva, Mírian Pereira da, 1993-
Efeito do pH e temperatura na adesão e formação de
biofilmes de diferentes estirpes de *Bacillus cereus* em aço
inoxidável / Mírian Pereira da Silva. – Viçosa, MG, 2018.
xi, 65 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 54-65.

1. *Bacillus cereus*. 2. Biofilmes. 3. Alimentos -
Microbiologia. 4. Microbiologia. 5. Tecnologia de alimentos.
6. Aço inoxidável. I. Universidade Federal de Viçosa.
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

MÍRIAN PEREIRA DA SILVA

**EFEITO DO pH E TEMPERATURA NA ADESÃO E FORMAÇÃO DE
BIOFILMES DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Bacillus cereus* EM AÇO
INOXIDÁVEL**

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

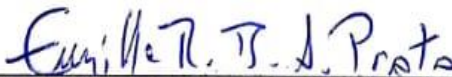
APROVADA: 1 de agosto de 2018.



Nélio José de Andrade
(Coorientador)



Patrícia Érica Fernandes
(Coorientadora)



Emille Rocha Bernardino de Almeida Prata



Wilmer Edgard Luera Peña
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por ter iluminado o meu caminho durante estes anos, me permitindo dar mais um passo nessa caminhada.

Aos meus pais pelo carinho, por estarem sempre presentes, acreditarem em mim, me amparando nos momentos difíceis e nunca medindo esforços para minha felicidade. Amor eterno.

Aos meus irmãos Paula e Duílio por toda cumplicidade, exemplo e amor.

Aos meus sobrinhos Isadora e João Lucas, principais motivos do meu sorriso diário.

Ao meu namorado Lucas por todo amor, carinho, incentivo e paciência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wilmer Edgard, por sua disposição em separar um pouco do seu escasso tempo para me transmitir sua experiência, pelo empenho, dedicação, sabedoria e paciência.

Aos coorientadores, Prof. Dr. Nélio e Dra. Patrícia, pelos ensinamentos, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas oportunidades concedidas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos do laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, pela amizade e convívio diário, especialmente Adeline, Camila, Elisângela e Roberta por compartilharem seus conhecimentos e Alexandre pela ajuda durante todo o experimento, incluindo feriados e finais de semana.

Aos amigos de sempre, por todo o incentivo, amizade, apoio e por compreenderem meus momentos ausentes.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado, essa vitória é nossa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo Geral.....	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. <i>Bacillus cereus</i>	3
3.2. Formação de biofilme na indústria de alimentos.....	6
3.3. Fatores que afetam a adesão e formação de biofilmes	9
3.3.1. pH.....	10
3.3.2. Temperatura.....	10
3.4. A microbiologia preditiva.....	11
3.4.1. Classificação dos modelos.....	12
3.4.2. Validação matemática	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Delineamento experimental	17
4.2. Microrganismo e preparo do inóculo.....	17
4.3. Determinação da adesão e formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável.....	18
4.3.1. Preparo e limpeza dos cupons.....	18
4.3.2. Adesão de <i>B. cereus</i> a cupons de aço inoxidável.....	18
4.3.3. Quantificação de células aderidas	19
4.3.4. Visualização dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura	

(MEV).....	20
4.4. Análise dos dados e modelagem matemática	20
4.4.1. Validação do Modelo.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. Avaliação da adesão e formação de biofilme de <i>Bacillus cereus</i> em aço inoxidável.....	22
5.1.1. Visualização dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura.....	31
5.2. Modelagem probabilística de regressão logística	34
5.2.1. Validação dos modelos de probabilidade de regressão logística.....	48
6. CONCLUSÃO.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura de adesão e biofilme formados por *B. cereus* em cupons de aço inoxidável em meio BHI, após 48 h de contato. (A) temperatura de 5 °C e pH 4,5. (B) temperatura de 5 °C e pH 9,0. (C) temperatura de 32 °C e pH 4,5 e (D) temperatura de 32 °C e pH 9,0.....**33**
- Figura 2.** Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura de superfícies de aço inoxidável. (A) e (B) presença de fissuras.....**34**
- Figura 3.** Probabilidades de adesão (A) e formação de biofilmes (B) da Estirpe 1, em 24 h, preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística.....**41**
- Figura 4.** Probabilidades de adesão (A) e formação de biofilmes (B) da Estirpe 2, em 24 h, preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística.....**42**
- Figura 5.** Probabilidades de adesão (A) e formação de biofilmes (B) da Estirpe 3, em 24 h, preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística.....**42**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes de <i>Bacillus cereus</i> e suas respectivas toxinas.....	18
Tabela 2. Análise de variância do logaritmo decimal do número de UFC.cm ⁻² de estirpes de <i>Bacillus cereus</i> aderidas aos cupons de aço inoxidável submetidas à diferentes temperaturas e valores de pH, no tempo 24 h.....	23
Tabela 3. Médias da adesão de estirpes de <i>B. cereus</i> nos cupons de aço inoxidável submetidas a diferentes temperaturas e valores de pH, expressas em log UFC.cm ⁻²	24
Tabela 4. Respostas de adesão das três estirpes de <i>Bacillus cereus</i> em função do tempo, temperatura e pH.....	26
Tabela 5. Respostas de formação de biofilme das três estirpes de <i>Bacillus cereus</i> em função do tempo, pH e temperatura.....	27
Tabela 6. Coeficientes do modelo probabilístico de regressão logística de adesão e formação de biofilme para a Estirpe 1.....	35
Tabela 7. Coeficientes do modelo probabilístico de regressão logística de adesão e formação de biofilme para a Estirpe 2.....	36
Tabela 8. Coeficientes do modelo probabilístico de regressão logística de adesão e formação de biofilme para a Estirpe 3.....	36
Tabela 9. Equações matemáticas geradas pelos modelos de adesão e formação de biofilme das estirpes de <i>B. cereus</i>	37
Tabela 10. Porcentagem de acertos, R ² e Teste de Hosmer e Lemeshow dos valores preditos pelos modelos probabilísticos de regressão logística, para a estirpe 1, 2 e 3, no procedimento de ajuste.....	39
Tabela 11. Temperaturas críticas de adesão (°C) das estirpes de <i>B. cereus</i> preditas pelos modelos probabilísticos de regressão logística.....	44
Tabela 12. Tempos críticos de adesão (h) das estirpes de <i>B. cereus</i> preditas pelos modelos probabilísticos de regressão logística.....	46
Tabela 13. pHs críticos de adesão das estirpes de <i>B. cereus</i> preditas pelos modelos probabilísticos de regressão logística.....	48
Tabela 14. Probabilidades de adesão e formação de biofilmes pelo modelo da Estirpe 1.....	50
Tabela 15. Probabilidades de adesão e formação de biofilmes pelo modelo da Estirpe 2.....	51

Tabela 16. Probabilidades de adesão e formação de biofilmes pelo modelo da Estirpe 3.....	52
--	-----------

RESUMO

SILVA, Mírian Pereira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2018. **Efeito do pH e temperatura na adesão e formação de biofilmes de diferentes estirpes de *Bacillus cereus* em aço inoxidável.** Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña. Coorientadores: Nélio José de Andrade e Patrícia Érica Fernandes.

Bacillus cereus é um dos microrganismos de maior preocupação na indústria de alimentos, pois possui alta capacidade de se aderir e formar biofilmes, podendo contaminar os alimentos que entram em contato com as superfícies. Estratégias de controle devem ser buscadas a fim de eliminar esta possibilidade de ocorrência desse microrganismo na cadeia alimentar. Para isso, é necessário conhecer as condições que propiciam sua adesão. Modelos matemáticos podem ser usados para descrever o comportamento microbiano sob diferentes condições ambientais. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a adesão e formação de biofilmes de diferentes estirpes de *B. cereus*, isoladas de bebida láctea, leite pasteurizado e ricota, frente a diferentes valores de pH (4,5, 6,0, 7,5 e 9,0) e temperatura (5, 15, 25 e 32 °C). A adesão e formação de biofilmes microbianos foi avaliada utilizando-se placas de 24 poços contendo cupons de aço inoxidável e caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), ajustado com HCl e NaOH 1 mol.L⁻¹ para os valores de pH citados acima e incubadas sob diferentes temperaturas, sendo realizadas contagens em placas a cada 24 h, durante 48 e 120 h de incubação para adesão e formação de biofilmes, respectivamente. Os resultados foram expressos em UFC.cm⁻². As estruturas dos biofilmes foram visualizadas por meio de microscópio eletrônico de varredura. Modelos probabilísticos de regressão logística foram construídos para descrever a probabilidade de adesão e formação de biofilmes de cada estirpe. Os modelos foram validados estatisticamente e em meio de cultura e matriz alimentícia para determinar sua confiabilidade e versatilidade. Os fatores pH e temperatura influenciaram nas respostas de adesão e formação de biofilmes, em que altas temperaturas de 25 e 32 °C e valores de pH 6,0, 7,5 e 9,0 favoreceram esses mecanismos, sendo observada uma maior capacidade de adesão em uma das 3 estirpes testadas em relação às demais, quando submetida à temperatura de 15 °C. A

combinação entre pH 4,5 e temperatura de 5 °C conseguiu impedir a adesão e formação de biofilmes durante todo o período de incubação. A visualização por microscopia eletrônica de varredura corroborou com os resultados obtidos por contagem em placas. Os modelos probabilísticos de regressão logística construídos se mostraram eficazes para descrição da região de interface de adesão/não adesão e formação de biofilme/não formação de biofilme. A validação dos modelos probabilísticos em meio de cultura e matriz alimentícia confirmou que os modelos desenvolvidos são adequados para avaliação da adesão e formação de biofilmes das estirpes de *B. cereus* estudadas. A utilização da modelagem probabilística é de grande utilidade para a indústria de alimentos que pode utilizar das informações sobre combinações de fatores que afetam a adesão e formação de biofilmes por *B. cereus* para análise de riscos, visando garantir a qualidade dos alimentos, assegurando desse modo, a saúde dos consumidores.

ABSTRACT

Silva, Mírian Pereira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2018. **Effect of pH and temperature on adhesion and formation of biofilms of different strains of *Bacillus cereus* in stainless steel.** Adviser: Wilmer Edgard Luera Peña. Co-advisers: Nélio José de Andrade and Patrícia Érica Fernandes.

Bacillus cereus is one of the microorganisms of major concern in the food industry, as it has a high capacity to adhere and form biofilms. Control strategies should be sought in order to eliminate this possibility of this microorganism occurring in the food chain. Mathematical models can be used to describe microbial behavior under different environmental conditions. The objective of this study was to evaluate the adhesion and biofilm formation of different strains of *B. cereus*, isolated from dairy products against different pH (4.5, 6.0, 7.5 and 9.0) and temperature values (5, 15, 25 and 32 ° C). The adhesion and formation of microbial biofilms was monitored using 24-wells plates containing stainless steel coupons and Brain Heart Infusion (BHI) broth. This adjusted with 1 mol.L⁻¹ HCl and NaOH at the above mentioned pH values and incubated under different temperatures. The plaque counts were performed every 24 h for 48 and 120 h incubation for adhesion and biofilm formation, respectively. The structures of the biofilms were visualized by scanning electron microscope. Probabilistic logistic regression models were constructed to describe the probability of adhesion and formation of biofilms of each strain. The models were validated statistically, in culture medium and food matrix to determine their reliability and versatility. The pH and temperature factors influenced the adhesion and biofilm formation responses, where high temperatures of 25 and 32 °C and values of pH 6.0, 7.5 and 9.0 favored these mechanisms, with a higher adhesion capacity in one of the three strains tested in relation to the others when submitted to a temperature of 15 °C. The combination between pH 4.5 and 5 ° C was able to prevent adhesion and formation of biofilms throughout the incubation period. The scanning electron microscopy confirmed the results obtained by plate. The probabilistic logistic regression models were effective for describing the adhesion / non-adhesion interface region and biofilm

formation / non-biofilm formation. The validation of the probabilistic models in culture medium and food matrix confirmed the good fit of the models. The use of probabilistic modeling is very useful for the food industry, which can utilize information on combinations of factors that affect the adhesion and formation of biofilms by *B. cereus* for risk analysis, in order to guarantee the quality of the food, thus ensuring, consumer health.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Bacillus* têm sido uma grande preocupação em produtos lácteos devido a sua capacidade de formar esporos e assim sobreviverem a tratamentos térmicos aplicados durante o processamento de alimentos e aos procedimentos de higienização. Dentre as espécies desse gênero, *Bacillus cereus* está associada à deterioração e contaminação de leite, constituindo uma grande preocupação para a segurança e qualidade microbiológica de produtos alimentícios.

B. cereus encontra-se entre os patógenos de maior preocupação na indústria de alimentos por causar as síndromes emética e diarreica. Esse microrganismo tem sido isolado de uma série de produtos *in natura* e processados, tais como arroz, temperos, massas, vegetais, leite e seus derivados, o que torna seu controle um desafio para indústria.

A presença de *B. cereus* em superfícies de equipamentos na indústria de laticínios é muito comum, uma vez que essa bactéria possui alta capacidade de se aderir e formar biofilmes. Com isso, esses microrganismos tornam-se mais resistentes à higienização e sua remoção se torna mais difícil quando comparados às células planctônicas. Como resultado, podem contaminar os alimentos que entram em contato com essas superfícies, representando dessa forma um obstáculo para conservação de leite e produtos lácteos, o que coloca em risco a saúde dos consumidores.

Embora a presença de biofilmes por *B. cereus* em superfícies de equipamentos na indústria de laticínios tenha sido objeto de diversas pesquisas, há poucos estudos em relação às diferenças entre estirpes desse microrganismo na capacidade de adesão e formação de biofilmes. A diferença entre estirpes foi verificada por Barreto (2016), que estudou a ocorrência de *B. cereus* em leite e seus derivados e observou que estirpes diferentes do mesmo microrganismo, apresentam genes produtores de diferentes enterotoxinas como, toxina não hemolítica (*nhe*), hemolisina BL (*hbl*) ou citotoxina k (*cytk*). Já Vasconcelos (2017), verificou que essa diferença intrínseca encontrada, influenciou nos parâmetros cinéticos, taxa de crescimento (μ) e tempo de lag (λ) desse microrganismo frente a diferentes

valores de pH e temperatura.

As diferentes condições de processamento de leite e falhas no procedimento de higienização propicia a adesão, multiplicação e então formação de biofilmes por *B. cereus* na superfície interna dos equipamentos. Desta maneira, é necessário conhecer, primeiramente, as condições que propiciam a sua formação para que estratégias de controle, mais eficazes e econômicas, sejam buscadas a fim de minimizar a possibilidade de ocorrência desses microrganismos na cadeia alimentar (HERRERA et al., 2007). Assim, modelos matemáticos podem ser usados para descrever o comportamento microbiano sob diferentes condições ambientais. Modelos probabilísticos baseados em regressão logística são úteis na descrição da interface da ocorrência de um determinado evento frente a diferentes fatores como temperatura, atividade de água e pH, auxiliando na tomada de decisões para um bom funcionamento industrial.

A proposta deste trabalho foi verificar se a diferença intrínseca entre as estirpes de *B. cereus* e diferentes fatores, como pH e temperatura, tem efeito na adesão e formação de biofilmes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a adesão e formação de biofilmes de três diferentes estirpes de *B. cereus* em aço inoxidável sob diferentes valores de pH e temperatura, utilizando a microbiologia preditiva.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a adesão de três estirpes de *B. cereus* em cupons de aço inoxidável em função do efeito de pH e temperatura, e modelar as respostas adesão/não adesão mediante enfoque probabilístico;
- Avaliar a formação de biofilmes de três estirpes de *B. cereus* em função do efeito de pH e temperatura e modelar as respostas de formação/não formação de biofilme mediante enfoque probabilístico;

- Avaliar por microscopia eletrônica de varredura, a adesão e formação de biofilmes de *B. cereus*;
- Validar estatisticamente os modelos probabilísticos desenvolvidos e determinar sua confiabilidade com dados não utilizados na construção do modelo e em matriz alimentícia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Bacillus cereus*

B. cereus é uma bactéria gram-positiva, em forma de bastonetes, aeróbia facultativa e formadora de esporos. Estes podem ser centrais ou subterminais (FRANCO; LANDGRAF, 2008; VALERO, 2006). O gênero *Bacillus* é formado por sete espécies que apresentam grande similaridade genética: *B. cereus* e *Bacillus anthracis* que são conhecidas como agentes patogênicos, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, e *Bacillus cytotoxicus*. Essas espécies apresentam diferenças na temperatura de crescimento e potenciais de virulência (CARLIN et al., 2010; KUMARI; SARKAR, 2014).

A faixa de pH de crescimento de *B. cereus* é de 4,9 a 9,3. A bactéria é geralmente mesófila, com temperatura ótima entre 25 e 37 °C (DROBNIEWSKI, 1993). Entretanto, existem estirpes psicrófilas que se multiplicam em temperaturas de refrigeração e estirpes que são capazes de crescer em até 48 °C. A atividade de água mínima que permite o crescimento de *B. cereus* é de 0,93. Além disso, tem o crescimento reduzido em concentrações de cloreto de sódio (NaCl) de 7,5% m/v (RAEVUORI; GENIGEORGIS, 1975; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As doenças de origem alimentar relacionadas a esse microrganismo podem ocorrer após a ingestão de alimentos nos quais o microrganismo se multiplicou e/ou produziu toxinas. Existem duas síndromes causadas por toxinas distintas produzidas por *B. cereus*: a emética e a diarreica (GRANUM; LUND, 1997; KUMARI; SARKAR, 2014). A síndrome diarreica é produzida pela multiplicação do microrganismo no intestino delgado e caracteriza-se por

provocar diarreia intensa e dores abdominais, com período de incubação que varia de 8 a 16 horas (AGATA; OHTA; YOKOYAMA, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2008; ABEE et al., 2011). Toxinas como a *nhe*, *hbl* e *cytk* provocam essa síndrome. As toxinas são termolábeis, facilmente inativadas pelo calor, baixo pH e ação das enzimas proteolíticas (ULTEE; SMID, 2001). Já a síndrome emética se dá pela ingestão de alimentos contaminados com a enterotoxina cereulide, uma toxina termoestável, resistente a degradação proteolítica, pH extremos e altas temperaturas, resistindo a 121 °C por 90 min (GRANUM; LUND, 1997; CARLIN et al., 2006). Os sintomas são vômitos e náuseas, com um período de incubação de 0,5 a 6 horas (EHLING-SCHULZ et al., 2004; ABEE et al., 2011).

A ocorrência das síndromes está muitas vezes associada a alimentos que foram tratados termicamente. Isto se deve ao fato de que alimentos que passam por tratamento térmico e são mantidos sob temperatura ambiente, permitem a germinação de esporos e multiplicação do microrganismo, sendo potenciais fontes de *B. cereus* e, conseqüentemente, de suas toxinas (MENDES; COELHO; AZEREDO, 2011).

Diferentes estirpes de *B. cereus* apresentam diferenças na capacidade de produzir enterotoxinas (KOTIRANTA; LOUNATMAA; HAAPASALO, 2000). Uma estirpe pode ser capaz de produzir uma ou mais toxinas simultaneamente. Barreto (2016), ao estudar a ocorrência desse microrganismo em produtos lácteos, isolou *B. cereus* em 69 dos 129 produtos analisados e detectou em cada estirpe a presença de genes produtores de enterotoxinas diarreicas, como, *nhe*, *hbl* ou *cytk*. As estirpes difeririam quanto a produção dessas toxinas. Foi observado que algumas produziram duas, enquanto outras apresentavam capacidade de produção de todas as toxinas simultaneamente, o que mostra uma diferença intrínseca entre estirpes de *B. cereus*. Vasconcelos (2017), ao estudar 11 dessas estirpes, diferentes quanto a presença de genes, observou diferenças entre os parâmetros cinéticos de crescimento (taxa de crescimento (μ) e tempo de lag (λ)) frente a diferentes valores de pH e temperatura.

B. cereus está amplamente distribuído na natureza, sendo o solo seu reservatório natural. Em virtude disso, está presente em diferentes tipos de alimentos processados e in natura, entre eles, vegetais (CHON et al., 2015;

KIM et al., 2016), tofu (LEE et al., 2017), condimentos (THORSEN et al., 2015), fórmulas infantis (HWANG; PARK, 2015), arroz (HAQUE; RUSSELL, 2005; ANKOLEKAR; RAHMATI; LABBÉ, 2009; JESSIM; FAKHRY; ALWASH, 2017), leite e produtos lácteos (ZHANG et al., 2016; CHAVES et al., 2017; LIN et al., 2017).

Uma grande preocupação em relação a *B. cereus* é o isolamento frequente de espécies psicotróficas em alimentos mantidos sob refrigeração, como o leite. A presença desse microrganismo em leite tem sido detectada desde 1916 (AHMED et al., 1983). É capaz de produzir lipases e proteases que causam alterações químicas e sensoriais no leite e derivados, como, coagulação doce, sabores e odores indesejáveis e geleificação em leite UHT (GRAM et al., 2002; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003). Como resultado, há uma redução na vida útil desses produtos e prejuízos econômicos para a indústria.

B. cereus sobrevivem a condições adversas, como, altas temperaturas, pH, desidratação e produtos químicos, devido a sua capacidade de formar esporos (RYU; BEUCHAT, 2005). Assim, são capazes de resistir às etapas de processamento de produtos lácteos. Devido a isso, são numerosos os estudos que detectaram a presença desse microrganismo em produtos, como, leite UHT (BARRETO, 2016; LESLEY et al., 2017), leite em pó (REIS et al., 2013; BARRETO, 2016; ZHANG et al., 2016), ricota (BARRETO, 2016; SPANU et al., 2016; FERNANDES et al., 2017) e bebida láctea (BARRETO, 2016).

A ocorrência desse microrganismo no ambiente de processamento de leite e produtos lácteos é por meio de diversas fontes durante o manuseio, produção e armazenamento, especialmente de equipamentos inadequadamente limpos e higienizados (KUMARI; SARKAR, 2016). Uma vez que os esporos de *B. cereus* sobrevivem a condições adversas e possuem propriedades hidrofóbicas, eles podem se aderir a esses equipamentos, germinar e formar biofilmes em plantas de processamento de leite e derivados (RYU; BEUCHAT, 2005).

A adesão bacteriana pode ocorrer tanto por células vegetativas, quanto por esporos (RYU; BEUCHAT, 2005). Ambos interagem com aço inoxidável e com compostos que estão presentes nas incrustações de leite

dos equipamentos mal higienizados. A formação de biofilmes de *B. cereus* nas plantas de processamento de leite e produtos lácteos é preocupante, porque as células sésseis em biofilmes são mais difíceis de remover do que as células planctônicas, já que se tornam mais resistentes aos agentes antimicrobianos e à limpeza, podendo, assim, recontaminar o alimento (KUMARI; SARKAR, 2014).

3.2. Formação de biofilme na indústria de alimentos

As bactérias existem em uma das duas formas distintas: planctônicas, na forma livre, ou sésseis, na forma de biofilme (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; FASTENBERG et al., 2016). Por muitos anos, os estudos com microrganismos eram direcionados para a forma de células planctônicas, pois acreditava-se que era sua principal forma de existência. Hoje, sabe-se que em ambientes naturais, cerca de 95% a 99% das células existem na forma de biofilmes (NIKOLAEV; PLAKUNOV; 2007; FASTENBERG et al., 2016). Esta é parte das estratégias de sobrevivência empregada por microrganismos em ambientes adversos (DUNNE, 2002; FRÖSLER et al., 2017). Em biofilmes, as bactérias são fenotipicamente diferentes das planctônicas e podem ser até 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos (BARRA et al., 2015; PHILLIPS, 2016).

A adesão bacteriana a uma superfície consiste no primeiro passo para a formação de um biofilme (HORI; MATSUMOTO, 2010; RENNER; WEIBEL, 2011). A formação deste é indesejável em diferentes campos, como instalações médicas, sistemas de tratamento de água, indústrias de papel, usinas de energia nuclear e indústrias de alimentos (ABDALLAH et al., 2014).

A contaminação de alimentos por microrganismos alteradores ou patogênicos aderidos a uma superfície é uma preocupação para a indústria de alimentos, pois pode acarretar em problemas econômicos e de saúde (BRIDIER et al., 2015). Quando em condições favoráveis, como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (SIMÕES et al., 2010), os microrganismos se depositam, aderem, interagem com a superfície e, iniciam a multiplicação celular. Dessa forma, originam-se colônias e, quando em massa celular suficiente, nutrientes e resíduos, outros microrganismos se agregam aos já

aderidos e assim, o biofilme está formado (ANDRADE, 2008).

Segundo Vert et al. (2012), biofilmes são "agregados de microrganismos nos quais as células são frequentemente incorporadas numa matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que são aderentes entre si e/ou à uma superfície". O modelo atual para formação de biofilmes envolve uma sequência de etapas complexas: a) adesão reversível; b) adesão irreversível; c) desenvolvimento inicial; d) maturação do biofilme; e e) dispersão (SREY; JAHID; HA, 2013; JANISSEN et al., 2015). A primeira é a fase de adesão reversível, onde há uma interação fraca entre o microrganismo e a superfície. Isso envolve forças de Van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas, e desta forma, as bactérias são facilmente removidas através de forças mínimas (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; OLIVEIRA et al., 2010).

Após essa fase, inicia-se a adesão irreversível, pois ocorre a interação física da célula com a superfície por meio da produção de EPS pelos microrganismos e/ou pela presença de apêndices (pili, flagelo, fímbrias) na superfície celular, fortalecendo as ligações entre microrganismo e superfície. Esta etapa envolve interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas (DUNNE; 2002; OLIVEIRA et al., 2010). Estudos sugerem que o tempo de adesão irreversível das células é de 20 min de contato até no máximo 4 h a 4-20 °C (HOOD; ZOTTOLA, 1995; SMOOT; PIERSON, 1998; VATANYOOPAISARN et al., 2000). Como a remoção de células aderidas irreversivelmente é difícil, necessita-se de ação mecânica ou química pela aplicação de detergentes, surfactantes, sanitizantes (SINDE; CARBALO, 2000), enzimas, biossurfactantes, água eletrolizada (SADEKUZZAMAN et al., 2015) ou calor.

O desenvolvimento inicial consiste na formação de microcolônias pela multiplicação de microrganismos e está associada à produção aumentada de EPS que atua fortalecendo a interação célula-substrato (HARDING et al., 2009; HILL; LIZ-MARZÁN, 2017). Na etapa de maturação, há um aumento das microcolônias, formando assim, macrocolônias com espessura de até 100 µm, resultantes do aumento da densidade populacional. Nesta fase, mais EPS é produzido, o que resulta em maior proteção do biofilme na superfície (GUPTA et al., 2016; PERCIVAL, 2017). Normalmente, o biofilme atinge a

maturidade entre 3 e 6 dias após adesão inicial, mas pode chegar a 10 dias (SAUER et al., 2002; YONEZAWA et al., 2009; PIN-NGOEN et al., 2016).

Uma vez estabelecido o biofilme maduro, na última etapa ocorre a dispersão de células do biofilme devido a limitação de nutrientes e acúmulo de ácidos e resíduos. Além disso, enzimas são produzidas pelos microrganismos presentes no biofilme, atuando na degradação de EPS, com consequente desprendimento das células para colonização de novas superfícies ou contaminação do alimento em contato com a superfície (GUPTA et al., 2016). A dispersão dos microrganismos ocorre de 9 a 12 dias após colonização inicial (SAUER et al., 2002).

As vantagens das células em biofilmes são numerosas devido à organização em comunidade que surge da formação da matriz EPS. A matriz é composta principalmente de água (cerca de 97%), além de polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular e lipídeos (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A produção de EPS propicia aos microrganismos a transferência horizontal de genes, resistência a antimicrobianos, tolerância à desidratação, captura de nutrientes do substrato, proteção contra oxidação, antibióticos, radiação ultravioleta e retenção de enzimas extracelulares (FLEMMING; WINGENDER, 2010; FLEMMING et al., 2016).

Os biofilmes são a principal fonte de contaminação de produtos alimentícios. Superfícies normalmente utilizadas na indústria de alimentos, como aço inoxidável, vidro, polietileno, polipropileno, mármore, teflon, entre outros permitem o crescimento microbiano, o que pode resultar em processos de adesão e formação de biofilmes (ANDRADE et al., 2008).

O aço inoxidável é o material mais comumente utilizado na indústria de alimentos. É resistente à corrosão, detergentes, sanitizantes, estável a diferentes temperaturas e é de fácil higienização. Entretanto, a microtopografia é composta por rachaduras e fendas, que permitem proteção das células microbianas (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Diversas espécies de bactérias, dentre elas *B. cereus* são capazes de aderir e formar biofilmes em superfícies de processamento de alimentos (BRIDIER et al., 2015). As condições encontradas, como o tipo de superfície, umidade, pH, e a disponibilidade de nutrientes combinadas com a higienização inadequada dos equipamentos, propiciam a adesão de

microrganismos (ABDALLAH et al., 2014). Além disso, a presença de ranhuras, fendas e rugosidades em tubulações e equipamentos facilitam o desenvolvimento de biofilmes microbianos por dificultar procedimentos de higienização.

B. cereus representa 12,4% das bactérias presentes em biofilmes de plantas comerciais de laticínios (SHARMA; ANAND, 2002). Os biofilmes formados por essa bactéria são considerados uma das principais fontes de contaminação de leite e derivados. Foram isoladas de máquinas de enchimento, pasteurizadores, tanques de silo e de superfícies de pós-pasteurização de unidade de processamento de laticínios (ENEROTH et al., 2001; SVENSSON et al., 2004; SALUSTIANO et al., 2009).

A formação de biofilmes é responsável por causar sérios problemas na indústria de laticínios, como redução da eficácia de transferência de calor em trocadores de calor, diminuição do fluxo em tubulações e corrosão em superfícies metálicas (CHERIF-ANTAR et al., 2016). Além disso, é fonte potencial de contaminação bacteriana por microrganismos deterioradores ou patogênicos, o que resulta em perdas econômicas, comprometimento da segurança alimentar e aumento do risco de problemas de saúde pública (ABDALLAH et al., 2014).

3.3. Fatores que afetam a adesão e formação de biofilmes

A adesão e formação de biofilmes são influenciadas por muitos fatores, incluindo as características do microrganismo, propriedades da superfície e o meio onde ele se encontra (ABDALLAH et al., 2014; IBARRECHE; CASTELLANO; VIGNOLO, 2014). A capacidade de aderir e formar biofilmes varia entre gêneros, espécies e estirpes. (ANDRADE, 2008; SREY; JAHID; HÁ; 2013). Quanto as propriedades da superfície, a rugosidade (HSU et al., 2013), carga da superfície, hidrofobicidade (DESROUSSEAU et al., 2013) afetam o processo de adesão. Já em relação ao meio, fatores ambientais como pH, temperatura, nível de nutrientes desempenham papel importante nesse processo (ABDALLAH et al., 2014).

3.3.1. pH

Mudanças nos valores de pH podem influenciar significativamente no crescimento microbiano. Para formação do gradiente eletroquímico ou força próton motora, as bactérias possuem bombas de prótons ligadas à sua membrana que expulsam prótons do citoplasma. Em resposta à força próton motora, pode ocorrer um influxo de prótons, se tornando um problema para células que tentam regular o pH citoplasmático. Desse modo, variações extremas no pH, podem desregular esses mecanismos e assim ter um efeito letal sobre bactérias, afetando também o desenvolvimento do biofilme. Como resposta a mudanças nos valores de pH, os microrganismos podem sintetizar proteínas que impedem sua inativação. Entretanto, mecanismos celulares como a produção de EPS, não se adaptam com facilidade a variações de pH. O pH ótimo para produção de EPS pelas bactérias é normalmente em torno de pH 7,0 (GARRETT, BHAKOO, ZHANG, 2008).

Destaca-se que biofilmes podem ser formados em condições de estresses subletais, como forma de adaptação pelos microrganismos. Nesse contexto, algumas estirpes podem adquirir maior resistência a valores extremos de pH. Entretanto, outras estirpes em condições de pH ácido, diminuem a capacidade de adesão à superfícies. Isto se deve ao fato de que essas condições podem afetar a composição da matriz EPS e algumas propriedades físico-químicas da superfície, como a hidrofobicidade e carga elétrica, o que altera a repulsão eletrostática entre superfície e microrganismo, afetando desse modo a adesão microbiana.

3.3.2. Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes no crescimento dos microrganismos. Em temperaturas entre 30 e 40 °C, consideradas ótimas para a maioria das bactérias, há uma diminuição no tempo de lag (λ) e aumento na taxa de multiplicação (μ). Comportamentos contrários são observados em baixas temperaturas.

Diversos estudos demonstraram a influência deste fator na adesão bacteriana. Santos (2007), constatou que em temperatura de 38 °C, houve um

favorecimento no metabolismo de *Salmonella* Thyphimurium devido à alta absorção de nutrientes. Conseqüentemente, foi observada uma maior adesão dessa bactéria em comparação com baixas temperaturas, em que houve maior tempo de lag, bem como menor adesão.

A temperatura influencia também nas propriedades da superfície, como hidrofobicidade e em fatores de fixação, como a presença de apêndices. Com o aumento da temperatura, há um aumento no nível de hidrofobicidade (DI BONAVENTURA et al., 2008). Assim, a taxa de formação de biofilmes aumenta com a temperatura elevada. Por outro lado, baixas temperaturas afetam negativamente a produção de EPS. Segundo Morton et al (1998), o processo de adesão e formação de biofilme ocorre na intensidade máxima, em temperaturas ótimas de crescimento ou próximas da ideal, independente da espécie ou superfície.

3.4. A microbiologia preditiva

Microrganismos deterioradores e patogênicos estão constantemente presentes nos alimentos, prejudicando a qualidade e segurança desses. Nesse contexto, torna-se extremamente importante conhecer o modo de crescimento/ inativação desses microrganismos para controlar a qualidade e prevenir surtos de doenças causadas por patógenos em alimentos, a fim de garantir a segurança microbiológica dos alimentos (HUANG, 2017).

A microbiologia preditiva é parte essencial da microbiologia de alimentos moderna. Na microbiologia preditiva, são aplicados modelos matemáticos que preveem respostas de crescimento, sobrevivência e inativação de microrganismos patogênicos ou deterioradores frente a diferentes condições, como pH, temperatura e atividade de água durante o processamento, transporte e armazenamento de alimentos (WALLS; SCOTT, 1997; HUANG, 2014). Desse modo, são ferramentas essenciais para o desenvolvimento de novos produtos e processos, avaliação de riscos, vida de prateleira, identificação dos pontos críticos de controle dos processos de produção e distribuição e, conseqüentemente, implementação de medidas de controle para garantir a qualidade e segurança microbiológica dos alimentos (ROSS; MCMEEKIN, 1994; FAKRUDDIN; MAZUMDER; MANNAN et al.,

2011). Além disso, os modelos podem ser usados para favorecer o crescimento de microrganismos desejáveis (ARROYO-LÓPEZ et al., 2010).

O primeiro relato da utilização de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos foi em 1922, quando Esty e Meyer descreveram a morte térmica de esporos de *Clostridium botulinum* tipo A, através de um modelo log-linear. Este ainda é usado para estimar o tratamento térmico necessário em alimentos em conserva, com baixa acidez (FAKRUDDIN; MAZUMDER; MANNAN, 2011). Entretanto, somente na década de 80, houve um aumento no interesse pela microbiologia preditiva, particularmente nos Estados Unidos, Reino Unido, Austrália e Nova Zelândia devido a frequentes surtos de intoxicação alimentar por *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Esses países passaram a priorizar as pesquisas sobre segurança alimentar com o uso de modelos matemáticos (MCMEEKIN et al., 2002).

Uma outra vantagem que estimulou o interesse pela microbiologia preditiva é o fato de ser uma alternativa efetiva e rápida às técnicas microbiológicas tradicionais utilizadas na quantificação de microrganismos dos alimentos. Essas técnicas consideradas padrão, requerem um tempo longo de análise, o que dificulta na tomada de medidas preventivas de contaminação (HUANG et al., 2017). No entanto, ressalta-se que o uso da microbiologia preditiva é uma ferramenta adicional na busca de qualidade e segurança alimentar, sendo assim, os métodos microbiológicos não podem ser substituídos (OLIVEIRA et al., 2013).

Os modelos matemáticos são desenvolvidos por meio de experimentos realizados em meios laboratoriais e os modelos são extrapolados para alimentos, o que torna possível prever o comportamento microbiano em condições ambientais semelhantes (FAKRUDDIN, MAZUMDER, MANNAN, 2011).

3.4.1. Classificação dos modelos

Dependendo do seu propósito, os modelos matemáticos podem ser classificados como mecanísticos ou determinísticos e empíricos. Os modelos mecanísticos descrevem a resposta microbiana com base teórica e fornecem a interpretação da resposta observada em termos de fenômenos e processos

conhecidos, enquanto os empíricos descrevem um conjunto de dados observados por meio de equações matemáticas (MCMEEKIN et al., 2002; SEMENOV; FRANZ; VAN BRUGGEN, 2010; FAKRUDDIN; MAZUMDER; MANNAN, 2011). Os empíricos são ainda classificados em cinéticos ou probabilísticos. Os cinéticos descrevem o comportamento microbiano, como crescimento ou inativação dos microrganismos. Já os probabilísticos preveem a probabilidade de ocorrência de um certo evento, como a produção de uma enzima ou formação de biofilme em um determinado período de tempo (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000).

Os modelos matemáticos, dependendo do seus objetivos específicos, ainda podem ser classificados em três níveis: primário, secundário ou terciário.

3.4.1.1. Nível primário

Os modelos primários descrevem as respostas microbianas, como a taxa máxima de crescimento específico, duração da fase lag, ou taxa de mortalidade em função do tempo em condições ambientais constantes (MCMEEKIN et al., 2002; GARRE et al., 2017). As respostas podem ser expressas em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) por meio de contagem em placa, níveis de substratos, formação de toxinas e produtos metabólicos que são medidas diretas ou por meio de medidas indiretas, como densidade óptica (GIL et al., 2017).

Modelo de Gompertz, modelo logístico (GIBSON et al., 1987), modelo de Gompertz modificado (ZWIETERING, et al., 1990), modelo Monod (MONOD, 1949) e modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI; ROBERTS, 1994) são exemplos de modelos primários importantes na microbiologia preditiva.

Zwitering et al. (1990) propuseram uma modificação no modelo de Gombertz, com inclusão de parâmetros com significado biológico, como $\mu_{m\acute{a}x}$, λ e A , o que resultou no modelo de Gompertz modificado (Equação 1):

$$Y(t) = A \exp \left(- \exp \left(\frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot e}{A} [\lambda - t] + 1 \right) \right) \quad (1)$$

Em que:

$Y(t)$ é a razão logarítmica entre a contagem microbiana no tempo t e a contagem inicial;

$\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima específica de crescimento;

λ é a duração da fase lag;

A é a amplitude da curva sigmoidal.

Este modelo descreve de forma satisfatória as fases de crescimento de um microrganismo, desde a fase lag até a estacionária, o que o torna uma ferramenta de importante utilização para descrição do comportamento microbiano em diferentes alimentos e meios.

3.4.1.2. Nível secundário

Os modelos secundários descrevem as respostas obtidas com os modelos primários perante variações nas condições ambientais, tais como temperatura, A_w e pH (BALSA-CANTO; ALONSO; BANGA, 2008).

Modelo de raiz quadrada, superfície de resposta, Arrhenius e de probabilidade de regressão logística são exemplos de modelos secundários. O modelo de probabilidade de regressão logística, comumente utilizado na microbiologia preditiva é classificado como empírico e probabilístico. Este modelo descreve a probabilidade de ocorrência de um determinado evento Y , condicionado a um vetor x . Esse evento Y pode ser de sucesso ($Y=1$) ou de falha, ($Y=0$). A Equação 2 representa esse modelo.

$$P(x) = \frac{e^{\beta_0 + \sum \beta_i x_i}}{1 + e^{\beta_0 + \sum \beta_i x_i}} \quad (2)$$

Em que:

$P(x)$ é a probabilidade de ocorrer ou não determinado evento;

β_0 e β_i são os coeficientes do modelo;

x_i são as variáveis independentes

A transformação logit de $P(x)$ está representada na Equação 3. Esta transformação é necessária pois $g(x)$ possui propriedades desejáveis de um modelo de regressão linear.

$$\text{Logit}(P) = g(x) = \text{Ln} \left(\frac{p(x)}{1-p(x)} \right) = \sum \beta_i x_i \quad (3)$$

Em que:

$g(x)$ é a transformação logit;

β_0 e β_i são os coeficientes do modelo;

x_i são as variáveis independentes.

Esse modelo é efetivo no fornecimento de informações mais realistas sobre riscos de segurança alimentar e, desse modo, é de grande utilidade no desenvolvimento de processos que garantam a segurança dos alimentos (KOUTSOUMANIS; SOFOS, 2005). Nesse sentido, o modelo de regressão logística pode ser explorado quanto a seu potencial para descrever o efeito de parâmetros ambientais na probabilidade de adesão/não adesão e formação/não formação de biofilme de diferentes estirpes de *B. cereus*.

3.4.1.3. Nível terciário

Os modelos terciários combinam os modelos primários e secundários com softwares que calculam o comportamento microbiano nas condições especificadas (HUANG, 2014; GARRE, 2017). Uns dos programas mais utilizados para modelagem preditiva são *comBase Predictor*, *Pathogen Modeling Program (PMP)*, *Growth Predictor* e *DMFit*. Esses softwares auxiliam na tomada de decisões em tempo curto, e desse modo, permitem que as práticas sejam realizadas em tempo real (KOUTSOUMANIS; LIANOU; GOUGOULI, 2016).

3.4.2. Validação matemática

Uma vez que os dados experimentais estão ajustados ao modelo, parte-se para etapa de validação, a fim de verificar se os modelos descrevem bem os dados experimentais.

Dois etapas podem ser realizadas para validação de um modelo. A primeira é a validação interna, onde novos dados e combinações de variáveis são testados a fim de verificar se o modelo descreve os dados experimentais de forma suficiente. A segunda forma é a validação externa, em que se

comparam dados obtidos do comportamento de microrganismos nos alimentos com os valores previstos no modelo ajustado (FAKRUDDIN; MAZUMDER; MANNAN, 2011). Índices de validação são utilizados para validação dos modelos como, teste de Hosmer e Lemeshow e coeficiente de determinação (R^2).

3.4.2.1. Teste de Hosmer e Lemeshow

O teste Hosmer e Lemeshow testa a validade preditiva do modelo de Regressão Logística, comparando os dados observados e os preditos. É baseado na visão real da variável dependente (HOSMER; LEMESHOW, 1989).

A finalidade desse teste é verificar se existem diferenças significativas entre as classificações realizadas pelo modelo e a realidade observada. Quanto menor é o valor da diferença, mais os valores previstos se aproximam dos reais e, portanto, melhor desempenho preditivo tem o modelo. Assim, esse teste tem como hipótese de nulidade (H_0) que não existe diferença significativa entre os valores observados e o valores previstos e como hipótese alternativa (H_1) que há diferenças significativas entre os valores observados e preditos. Desta forma, aceitar a hipótese de nulidade equivale a dizer que o modelo tem bom poder de ajuste.

3.4.2.2. R^2

O coeficiente de determinação ou regressão é comumente utilizado como medida geral das previsões dos modelos matemáticos (TE GIFFEL; ZWIETERING; 1999). Mede a fração de variação em torno da média. Quanto mais próximo de 1 for o valor de R^2 , significa que melhor é a predição realizada pelo modelo (GONÇALVES; PICCOLI; PERES, 2017).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa

(UFV), Minas Gerais.

4.1. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido segundo esquema fatorial completo com dois fatores (4x2), sendo quatro níveis de pH (4,5, 6,0, 7,5, 9,0) e quatro níveis de temperatura (5 °C, 15 °C, 25 °C e 32 °C), em delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi realizado em três repetições com triplicatas. O meio de cultura utilizado foi o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck®, EUA), preparado conforme instruções do fabricante. Para ajustes do pH, foram utilizadas soluções de ácido clorídrico (HCl) (Isofar®, Brasil) e hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec®, Brasil), na concentração de 1 mol·L⁻¹, mantidas sob refrigeração. Cupons de aço inoxidável com dimensões 1 cm x 1 cm x 0,1 cm foram utilizados como superfícies para avaliar a adesão bacteriana e formação de biofilmes de células de *B. cereus* submetidas a diferentes temperaturas e valores de pH.

4.2. Microrganismo e preparo do inóculo

Para a condução do experimento, foram utilizadas três estirpes diferentes de células vegetativas de *B. cereus*, isoladas de amostras de leite pasteurizado, bebida láctea e queijo ricota na microrregião de Viçosa, Minas Gerais, por Barreto (2016). Cada estirpe apresenta genes produtores de enterotoxinas diarreicas, como, *nhe*, *hbl* ou *cytk* (Tabela 1).

Os isolados foram ativados duas vezes consecutivas em caldo BHI e incubados a 32 °C por 24 h. Para a padronização do inóculo foi realizada leitura da D.O em espectrofotômetro (Kazuaki IL-227), no comprimento de onda de 625 nm, onde a absorbância foi ajustada para 0,100, equivalente a, aproximadamente, 1,0 x 10⁸ UFC·mL⁻¹. Após ajuste, realizaram-se diluições em solução salina 0,85% (v/v), de modo a obter um inóculo com, aproximadamente 1 x 10³ UFC·mL⁻¹ nos ensaios de adesão e formação de biofilme. Este valor foi selecionado levando-se em consideração a concentração destes microrganismos nos produtos lácteos no momento do isolamento.

Tabela 1. Estirpes de *Bacillus cereus* e suas respectivas toxinas.

Produto lácteo	Estirpe	nhe	hbl	cytk
Bebida láctea	1	+	-	+
Leite pasteurizado	2	-	+	+
Ricota	3	+	+	+

4.3. Determinação da adesão e formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável

4.3.1. Preparo e limpeza dos cupons

Os cupons de aço inoxidável foram inicialmente lavados com detergente líquido neutro e enxaguados em água destilada. Após a lavagem, foram imersos em álcool 70% (v/v) durante 30 min com vistas a remover resíduos de gordura na superfície e, por fim, foram imersos em solução de NaOH 1% (m/v) por 60 min. Com o auxílio de uma pinça os cupons foram retirados da solução de NaOH 1% (m/v) e enxaguados novamente em água destilada. Após a completa secagem ao ar, os cupons foram embalados e esterilizados a 121 °C por 15 min.

4.3.2. Adesão de *B. cereus* a cupons de aço inoxidável

Após o ajuste do pH com as soluções de HCl e NaOH citadas acima, o meio de cultura foi transferido para tubos de ensaio, que posteriormente foram esterilizados a 121 °C por 15 min. Em seguida, foram inoculados aproximadamente $1,0 \times 10^4$ UFC·mL⁻¹ de *B. cereus* aos tubos de ensaio, contendo 9 mL do meio de cultura, para a obtenção da concentração inicial de $1,0 \times 10^3$ UFC·mL⁻¹. Para avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilmes, foi realizada a montagem das placas de 24 poços de 2,0 mL de capacidade cada um. Foram adicionados aos poços 1,0 mL do meio BHI com o pH ajustado, contendo $1,0 \times 10^3$ UFC·mL⁻¹ de *B. cereus*. Posteriormente, os cupons de aço inoxidável foram inseridos nos poços das microplacas e estas

foram incubadas a diferentes temperaturas (5, 15, 25 e 32 °C) por 48 h para avaliação da adesão e 120 h para formação de biofilmes com troca de meio nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 h. Os valores testados estão na faixa de condições nas quais *B. cereus* podem ser expostos durante processamento de leite e produtos lácteos e/ ou higienização dos equipamentos.

Para análise do efeito dos fatores pH e temperatura e comparação entre as estirpes estudadas após 24 h de adesão, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) e teste de médias (Tukey) a 5% de probabilidade, utilizando o *software* SAS 9.0.

4.3.3. Quantificação de células aderidas

Os cupons foram transferidos, com o auxílio de uma pinça esterilizada, de um poço para outro contendo 1,0 mL de solução salina 0,85% (m/v) e mantidos nessa solução por 1,0 min para remoção das células planctônicas. Em seguida, esses foram imersos em novos tubos contendo 10 mL da mesma solução diluente e submetidos ao ultrassom durante 10 min para remoção das células sésseis. Por fim, as suspensões foram homogeneizadas em vórtex e alíquotas de 0,1 mL foram diluídas em 0,9 mL de solução salina (diluição seriada), plaqueadas em Ágar Padrão para Contagem (PCA) (Kasvi®, Itália) pela técnica de microgotas e incubadas a 32 °C por 15 h. As colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC·cm⁻², conforme a Equação 6 a seguir:

$$UFC \cdot cm^{-2} = \frac{N \cdot D \left(\frac{V}{P}\right)}{A} \quad (6)$$

Em que:

N = média da contagem de colônia após o tempo de incubação;

D = inverso da diluição decimal;

V = volume de solução salina para a retirada de células aderidas;

P = alíquota plaqueada;

A = área da superfície do cupom.

4.3.4. Visualização dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os cupons de aço inoxidável foram removidos dos meios de cultivo após 48 h e enxaguados com solução salina 0,85% (m/v) por 1 min. Em seguida foram fixados por 2 h a 25 °C com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,05 M. Posteriormente, foram lavados com tampão fosfato de sódio 0,05 M por seis vezes por períodos de tempo de 10 min em cada etapa de lavagem. Seguiu-se para a etapa de desidratação com etanol 30%, 50%, 70%, 80%, 95% por 10 min cada e 100% por 15 min, por três vezes. Em seguida, foi feita a secagem ao ponto crítico no Bal-Tec CPD 30, onde foram mantidos em CO₂ líquido por um período de tempo pré-determinado, para retirada de qualquer vestígio de umidade remanescente. Os cupons foram montados nos suportes apropriados e devidamente identificados para observação e partiu-se para metalização em Sputter Coater SCD 010 (Balzers). Por fim, as preparações foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo VP 1430) e fotografadas.

4.4. Análise dos dados e modelagem matemática

As matrizes geradas pelas combinações dos fatores estudados (pH, temperatura e tempo) e respostas de adesão e formação de biofilmes, obtidas por contagem em placas (UFC·cm⁻²) (codificadas em 0 e 1), foram ajustadas ao modelo secundário probabilístico de regressão logística (Equação 7), por meio do *software* SPSS *Statistics* 25.0.

Para cada estirpe foi gerado um modelo, em que pH, temperatura e tempo representam variáveis independentes, e a probabilidade de adesão bacteriana ou formação de biofilme como variável dependente. Dessa forma as respostas foram classificadas como: adesão (1), não adesão (0), formação de biofilme (1) e não formação de biofilme (0).

Foi considerado biofilme, quando a contagem de células sésseis estava acima de 10⁵ UFC·cm⁻² com formação de EPS nos cupons, observados em microscópio eletrônico de varredura.

De acordo com a Equação 3, o modelo logit necessário para

linearização do modelo utilizado está representado pela Equação 7.

$$g(x) = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 pH + \beta_3 T + \beta_4 Tt + \beta_5 pH T + \beta_6 pH t + \beta_7 t^2 + \beta_8 pH^2 + \beta_9 T^2 \quad (7)$$

Em que:

$\beta_0 - \beta_9$ = coeficientes do modelo que serão estimados pelo ajuste dos dados experimentais;

t = tempo (h);

T = temperatura (°C).

O desempenho de cada modelo obtido foi avaliado por meio do R^2 , teste de Hosmer-Lemeshow e porcentagem de concordância.

Após o ajuste dos dados ao modelo de regressão logística, foram realizadas previsões de temperatura, tempo e pH críticos de adesão das estirpes de *B. cereus*, com probabilidades de 0,5, 0,1 e 0,05, através da substituição do valor de $P(x)$ no modelo da Equação 2, sendo calculados, mantendo as demais variáveis independentes fixas. As probabilidades de adesão e formação de biofilmes da bactéria para as condições estudadas também foram calculadas, utilizando a mesma equação e fixando o tempo de 24 h.

4.4.1. Validação do Modelo

Os modelos foram validados quanto a seu desempenho de predição frente a combinações diferentes não testadas na construção dos modelos.

Cada modelo de probabilidade de regressão logística (um para cada estirpe estudada) foi validado em meio de cultura e em matriz alimentícia.

Para a validação em matriz alimentícia foi utilizado leite UHT integral, com valor de pH dentro da faixa estudada.

Os experimentos foram realizados em uma repetição com triplicatas.

Para análise dos dados, valores de probabilidade preditos acima de 0,5 foram classificados como adesão ou formação de biofilme (1) e abaixo de 0,5 foram classificados como não adesão ou não formação de biofilme (0).

4.4.1.1. Validação em meio de cultura

Foram empregadas quatro combinações não testadas, durante a coleta de dados para desenvolvimento do modelo (pH = 5,0, T = 10; pH = 5,0, T = 20; pH = 6,5, T = 10; pH = 6,5, T = 20).

A metodologia utilizada foi conforme a descrita no item 4.3.2, sendo modificados apenas os valores de pH e os valores de temperatura.

4.4.1.2. Validação em leite

Foram inoculados aproximadamente, $1,0 \times 10^4$ UFC·mL⁻¹ de *B. cereus* em tubos de ensaio, previamente esterilizados, contendo 9 mL de leite UHT integral, de forma asséptica, para a obtenção da concentração inicial em torno de $1,0 \times 10^3$ UFC·mL⁻¹. Em seguida, 1,0 mL do leite contendo $1,0 \times 10^3$ UFC·mL⁻¹ de *B. cereus* foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas a 10 °C, 20 °C e 30 °C. Para cada condição estudada (pH do leite, 6,6 e temperatura), nos tempos 24 h e 48 h/ 24 h, 48 h e 72 h para verificar a adesão/ formação de biofilme do microrganismo, respectivamente, foi realizado o plaqueamento em meio PCA (Merck®), conforme descrito no item 4.3.2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da adesão e formação de biofilme de *Bacillus cereus* em aço inoxidável

Ao avaliar o efeito do pH e temperatura na adesão das estirpes, foi possível constatar que a combinação destes fatores influenciaram significativamente nas respostas. A análise de variância está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Análise de variância do logaritmo decimal do número de UFC-cm⁻² de estirpes de *Bacillus cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável submetidas à diferentes temperaturas e valores de pH, no tempo 24 h.

Estirpes	Fonte de variação	GL	QM	P(F)
Estirpe 1	Temperatura	3	91,68	<0,0001 *
	pH	3	0.65	0.0230 *
	Temperatura X pH	9	0.57	0.0078 *
	Resíduo	32	0.18	
Estirpe 2	Temperatura	3	100.24	<0,0001 *
	pH	3	0.13	0.3097 ^{ns}
	Temperatura X pH	9	0.28	0.0211 *
	Resíduo	32	0.11	
Estirpe 3	Temperatura	3	69.49	<0,0001 *
	pH	3	3.57	<0,0001 *
	Temperatura X pH	9	1.05	<0,0001 *
	Resíduo	32	0.15	

*Diferença significativa pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. ^{ns} diferença não significativa pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados relativos às contagens de diferentes estirpes de *B. cereus* aderidas a cupons de aço inoxidável, submetidas a diferentes temperaturas e valores de pH após 24 h, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Médias da adesão de estirpes de *Bacillus cereus* nos cupons de aço inoxidável submetidas a diferentes temperaturas e valores de pH após 24 h, expressas em log UFC·cm⁻².

Estirpes de <i>B. cereus</i>	pH	Temperaturas (°C)			
		5	15	25	32
Estirpe 1	4,5	<1,00 Ba	<1,00 Bc	4,57 Ac	5,73 Ab
	6,0	<1,00 Ba	<1,00 Bc	5,60 Ab	5,90 Ab
	7,5	<1,00 Ba	<1,00 Bc	6,67 Aa	5,87 Ab
	9,0	<1,00 Ba	<1,00 Bc	5,97 Aab	5,87 Ab
Estirpe 2	4,5	<1,00 Ba	<1,00 Bc	5,97 Aab	5,97 Ab
	6,0	<1,00 Ba	<1,00 Bc	6,30 Aab	5,80 Ab
	7,5	<1,00 Ba	<1,00 Bc	6,20 Aab	6,67 Aa
	9,0	<1,00 Ba	<1,00 Bc	5,73 Ab	6,10 Ab
Estirpe 3	4,5	<1,00 Ba	<1,00 Bc	5,17 Ac	5,50 Ab
	6,0	<1,00 Ba	3,47 Bb	5,93 Aab	6,00 Ab
	7,5	<1,00 Ba	3,43 Bb	6,23 Aab	6,00 Ab
	9,0	<1,00 Ba	4,10 Ba	6,37 Aab	6,17 Ab

Os valores apresentados correspondem à média de três repetições da adesão bacteriana. Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste de Tukey.

Verificou-se que a adesão foi significativamente afetada pela temperatura. Com o aumento da temperatura de 5 °C para 32 °C, observou-se um aumento de mais de 4 ciclos log na adesão das bactérias, indicando a importância da temperatura nesse processo (Tabela 3).

A adesão não foi afetada significativamente pelo pH na temperatura de 5 °C e 15 °C, com exceção da estirpe 3 que nos valores de pH 6,0, 7,5 e 9,0 à 15 °C, apresentou maior adesão comparado aos demais valores de pH e às outras estirpes, sendo observado uma menor adesão no pH de 4,5, podendo inferir desse modo, que esta estirpe apresenta maior capacidade de adesão em relação às estirpes 1 e 2 em meios submetidos a temperatura de 15 °C. Entretanto, nas temperaturas de 25 °C e 32 °C, o pH afetou de forma significativa nas respostas de adesão das estirpes analisadas. Assim, para as estirpes 1 e 3 na temperatura de 25 °C, houve menor adesão no pH 4,5. Já na temperatura de 32 °C, o pH 7,5 aumentou a capacidade de adesão da estirpe 2, mas não afetou de forma significativa a adesão das estirpes 1 e 3.

A variação no comportamento entre diferentes estirpes da mesma espécie também foi reportada por Bonsaglia et al. (2014), Hussain; Oh (2017) e Moraes et al. (2018).

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentadas as respostas de adesão e formação de biofilmes de diferentes estirpes de *B. cereus*, obtidas durante 48 h e 120 h, respectivamente, em função do tempo, temperatura e pH. As respostas estão representadas por adesão (1) ou não adesão (0) e formação de biofilme (1) ou não formação de biofilme (0) para construção do modelo probabilístico de regressão logística, que necessita de variáveis binárias.

Tabela 4. Respostas de adesão das três estirpes de *Bacillus cereus* em função do tempo, temperatura e pH.

Tempo	pH	Temperatura	Estirpe 1			Estirpe 2			Estirpe 3		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
24	4,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	7,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	4,5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	6	15	0	0	0	0	0	0	1	0	1
24	7,5	15	0	0	0	0	0	0	1	1	1
24	9	15	0	0	0	0	0	0	1	1	1
24	4,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	6	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	7,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	9	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	4,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	6	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	7,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	9	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	4,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	6	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0
48	7,5	5	0	0	1	0	0	0	1	1	1
48	9	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	4,5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	6	15	0	1	1	1	1	1	1	1	1
48	7,5	15	1	1	1	1	0	0	1	1	1
48	9	15	0	1	1	1	1	1	1	1	1
48	4,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	6	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	7,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	9	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	4,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	6	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	7,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	9	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1

R1 = adesão (1)/não adesão (0) de *Bacillus cereus* na primeira repetição; R2 = adesão (1)/não adesão (0) de *Bacillus cereus* na segunda repetição; R3 = adesão (1)/não adesão (0) de *Bacillus cereus* na terceira repetição.

Tabela 5. Respostas de formação de biofilme das três estirpes de *Bacillus cereus* em função do tempo, temperatura e pH. (continua)

Tempo	pH	Temperatura	Estirpe 1			Estirpe 2			Estirpe 3		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
24	4,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	7,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	4,5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	6	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	7,5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	9	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	4,5	25	0	0	0	1	1	1	1	1	1
24	6	25	1	0	1	1	1	1	1	1	1
24	7,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	9	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	4,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	6	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	7,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	9	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	4,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	7,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	4,5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	6	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	7,5	15	0	0	0	0	0	0	1	0	0
48	9	15	0	0	0	1	0	0	1	1	1
48	4,5	25	1	1	1	1	1	0	1	1	1
48	6	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	7,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	9	25	1	1	1	1	1	0	1	1	1
48	4,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	6	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	7,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	9	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
72	4,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	7,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	4,5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	6	15	0	1	0	0	0	1	0	0	0
72	7,5	15	0	1	1	1	0	0	1	1	1
72	9	15	0	0	1	1	1	1	1	1	1
72	4,5	25	1	1	1	1	1	0	1	1	1
72	6	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabela 5. Respostas de formação de biofilme das três estirpes de *Bacillus cereus* em função do tempo, temperatura e pH. (conclusão)

Tempo	pH	Temperatura	Estirpe 1			Estirpe 2			Estirpe 3		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
72	7,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
72	9	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
72	4,5	32	1	1	1	1	1	0	1	1	1
72	6	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
72	7,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
72	9	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
96	4,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	7,5	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0
96	9	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0
96	4,5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	6	15	1	1	1	0	0	1	1	1	1
96	7,5	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1
96	9	15	1	0	0	1	1	1	1	1	1
96	4,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
96	6	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
96	7,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
96	9	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
96	4,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
96	6	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
96	7,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
96	9	32	1	1	0	1	1	1	1	1	1
120	4,5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	6	5	0	0	0	0	1	1	0	0	0
120	7,5	5	1	0	0	0	0	1	1	0	0
120	9	5	1	1	0	1	1	1	1	1	1
120	4,5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	6	15	1	1	0	1	1	1	1	1	1
120	7,5	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	9	15	1	1	0	1	1	1	1	1	1
120	4,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	6	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	7,5	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	9	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	4,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	6	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	7,5	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	9	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1

R1 = formação (1)/não formação de biofilme (0) de *Bacillus cereus* na primeira repetição; R2 = formação (1)/não formação de biofilme (0) de *Bacillus cereus* na segunda repetição; R3 = formação (1)/não formação de biofilme (0) de *Bacillus cereus* na terceira repetição.

Como pode ser visto na Tabela 4, as estirpes de *B. cereus* apresentaram diferenças na capacidade de adesão. Durante as primeiras 24 h, as estirpes 1 e 2 não foram capazes de se aderir e formar biofilme quando submetidas à temperatura de 5 °C e 15 °C combinadas com toda a faixa de pH estudada. Comportamento diferente foi observado na estirpe 3, que foi capaz de se aderir na temperatura de 15 °C. Estes resultados indicam que a capacidade de adesão e formação de biofilme de *B. cereus* é afetada por características específicas da estirpe. Vasconcellos (2017), ao estudar o comportamento cinético das mesmas estirpes do presente estudo, observou que houve diferença entre estas quanto à taxa máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e o tempo de lag (λ), quando submetidas a diferentes temperaturas e valores de pH, ocorrendo maiores diferenças em temperaturas mais baixas, fato que pode explicar essa variação na capacidade de adesão entre as estirpes estudadas. Di Ciccio et al. (2015), ao avaliarem o efeito da temperatura e hidrofobicidade na capacidade de formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*, também observaram uma variação na adesão de diferentes estirpes dessa bactéria, onde apenas uma das 67 avaliadas, foi capaz de aderir a temperatura de 12 °C.

As diferenças entre as estirpes indicam que a adesão e formação de biofilme são estirpes-dependentes e as características intrínsecas das estirpes podem determinar o potencial para formação destas estruturas, evidenciando a importância em estudar as bactérias encontradas no ambiente de isolamento destas sem generalização de gênero e espécie bacteriana, para assim determinar o procedimento adequado de higienização.

Nota-se que a combinação do menor valor de pH (4,5) e baixas temperaturas (5 °C e 15 °C) conseguiu impedir a adesão e formação de biofilme das diferentes estirpes durante todo o período de estocagem das amostras, fato não observado com temperaturas de 25 °C e 32 °C. Esse evento pode estar relacionado à baixa taxa de multiplicação e ao longo período de permanência na fase de lag dessas estirpes em baixas temperaturas (VASCONCELLOS, 2017). A dependência da temperatura na formação do biofilme de *B. cereus* foi relatada anteriormente por Bernardes et al. (2013), Peña et al. (2014) e Kwon; Hussain; Oh (2017).

A temperatura é, portanto, um dos fatores mais importantes no

desenvolvimento dos microrganismos, sendo sua influência sobre a adesão de células vegetativas, explicada, dentre outros fatores, pela cinética de crescimento da bactéria. Assim, para *B. cereus*, em temperatura de 32 °C, foi observado um favorecimento no desenvolvimento desta bactéria, com um aumento de quase dois ciclos logarítmicos na adesão em comparação a 10 °C. Nesta temperatura, a multiplicação foi menor, com maior tempo de permanência na fase lag (SÁ, 2013).

Variações na temperatura podem afetar as estruturas da superfície celular, como fímbrias, flagelos e pili, responsáveis por favorecer a adesão dos microrganismos na superfície. Hood e Zottola (1995) observaram uma maior adesão de *Yersinia enterocolitica* em temperatura de 21 °C quando comparada a 10 e 35 °C e atribuíram este resultado ao fato de que esta bactéria não produz flagelo a 35 °C.

Ressalta-se que a hidrofobicidade da superfície celular, aumenta com a temperatura. Conseqüentemente, há um aumento na taxa de adesão e formação de biofilme das bactérias. Di Ciccio et al. (2015) comprovaram este fato ao estudarem o efeito da temperatura e hidrofobicidade de estirpes de *S. aureus*, onde encontrou uma diferença significativa entre a hidrofobicidade a 37 °C e a 12 °C.

De acordo com a Tabela 5, pode-se observar que a partir do tempo 96 h, as estirpes condicionadas à temperatura de 15 °C e pHs de 6,0, 7,5 e 9,0, formaram biofilmes, comportamento não observado nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Esse evento reforça a importância da temperatura na cinética de multiplicação dos microrganismos, mostrando que em temperaturas baixas, maior é o tempo de adaptação da bactéria, e portanto, maior é o tempo necessário para haver a formação de biofilme.

É importante destacar que, em combinações envolvendo valores de pH maiores que 4,5, e todas as temperaturas estudadas, houve adesão da bactéria, e que, combinações de valores de pH e temperaturas elevados, favoreceram a formação de biofilme, podendo inferir que o pH influencia nesses mecanismos, sendo o pH 4,5 um fator relevante na inibição da interação entre bactéria e superfície. Diferentes valores de pH, também influenciaram na formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Vibrio cholerae*, em que foi constatado que, com o

aumento do pH, havia uma maior produção de biofilmes (HOŠTACKÁ; ČIŽNÁR; ŠTEFKOVIČOVÁ, 2010).

Sabe-se que a adesão bacteriana é de grande importância para a indústria de alimentos. Uma vez que as células estão aderidas às superfícies, pode ocorrer a formação de biofilmes ao longo do tempo. Além disso, a capacidade mostrada neste estudo de *B. cereus* colonizar superfícies à baixas temperaturas utilizadas na indústria alimentícia pode contribuir para a persistência da bactéria em ambientes de processamento de alimentos, conseqüentemente aumentando os riscos de contaminação cruzada. Diante disto, torna-se indispensável o controle da adesão desse microrganismo, para garantir a eficiência da higienização das superfícies utilizadas na indústria.

5.1.1. Visualização dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura

A observação dos cupons de aço inoxidável submetidos ao ensaio de adesão, permitiu aprofundar os conhecimentos em relação à influência dos fatores temperatura e pH no processo de adesão e formação de biofilme de *B. cereus*.

Wirtanen; Husmark; Mattila-Sandholm (1996) e Andrade et al. (1998), consideram biofilme, uma população de células de 10^5 e 10^7 UFC·cm⁻², respectivamente. Para Andrade (2008), contagens acima de 10^5 UFC·cm⁻² caracterizam o desenvolvimento de biofilmes, desde que ocorra a produção de exopolissacarídeos pelos microrganismos. Assim, ao visualizar as células aderidas à cupons correspondentes a uma contagem de cerca de 10^5 UFC·cm⁻², foi observado a presença de EPS. Devido a isso, nesse trabalho contagens acima de 10^5 UFC·cm⁻² foram consideradas biofilmes.

Pode ser visto nas Figuras 1A, 1B, 1C e 1D células de *B. cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável, após crescimento em BHI a 5 °C com pH de 4,5 e 9,0 e a 32 °C com pH 4,5 e 9,0 respectivamente, por 48 h de incubação, observadas pela MEV. É possível notar que não houve adesão da bactéria em condições extremas de 5 °C e pH 4,5, diferente do observado quando as células foram submetidas a mesma temperatura a um pH 9,0, confirmando os dados obtidos por contagens em placas. Nota-se ainda que

não houve a produção da matriz de EPS nessas condições, podendo inferir desse modo, que as células estavam aderidas, mas não haviam formado biofilme.

Em condições envolvendo temperatura de 32 °C, pH 9,0 e 4,5, pôde-se observar a presença de EPS, indicando a formação de biofilme. Em alguns casos, houve a formação de aglomerados, envoltos por uma matriz protetora, características típicas de células em biofilmes (Figura 1D). Di Bonaventura et al. (2008) estudando a influência da temperatura na formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* em superfícies de contato com alimento, observaram comportamentos semelhantes dessa bactéria em superfícies de aço inoxidável. Em temperaturas de 22 °C e 37 °C, foi observado a formação de biofilmes complexos, com uma grande quantidade de EPS produzido, enquanto em baixas temperaturas, de 4 °C e 12 °C, as superfícies eram compostas apenas de pequenos aglomerados de células, com pouca produção de EPS. Esses autores acreditam que este comportamento ocorreu provavelmente devido a um estado de crescimento menos avançado das bactérias a baixas temperaturas.

Embora tenha sido possível observar a diferença na adesão em diferentes valores de temperaturas e pH estudados, em algumas situações havia um pequeno número de células aderidas, não condizentes com as contagens em placas (Figura 1C). O protocolo de preparação das amostras para a MEV, envolve etapas que podem alterar negativamente a adesão das células aos cupons e, conseqüentemente, a visualização das bactérias na superfície por esta técnica. Na etapa de desidratação, podem ocorrer reduções expressivas no volume de alguns componentes hidratados da matriz de EPS (SURMAN et al., 1996). Posteriormente, na etapa de secagem ao ponto crítico, a amostra é submetida a alta pressão e a consecutivas trocas de solventes, que podem criar artefatos, contribuindo para a alteração na arquitetura do biofilme, o que pode explicar a diferença encontrada na visualização de alguns cupons em relação às contagens em placas.

Nas Figuras 2A e 2B, pode-se observar a presença de fissuras com algumas células aderidas. Imperfeições encontradas nas superfícies são de grande importância na indústria de alimentos, já que podem diminuir a eficiência dos procedimentos de higienização e ainda facilitar a penetração de

resíduos de alimentos e estes serão utilizados como substrato para a adesão bacteriana, crescimento e, conseqüentemente, formação de biofilme (CARELI, 2005).

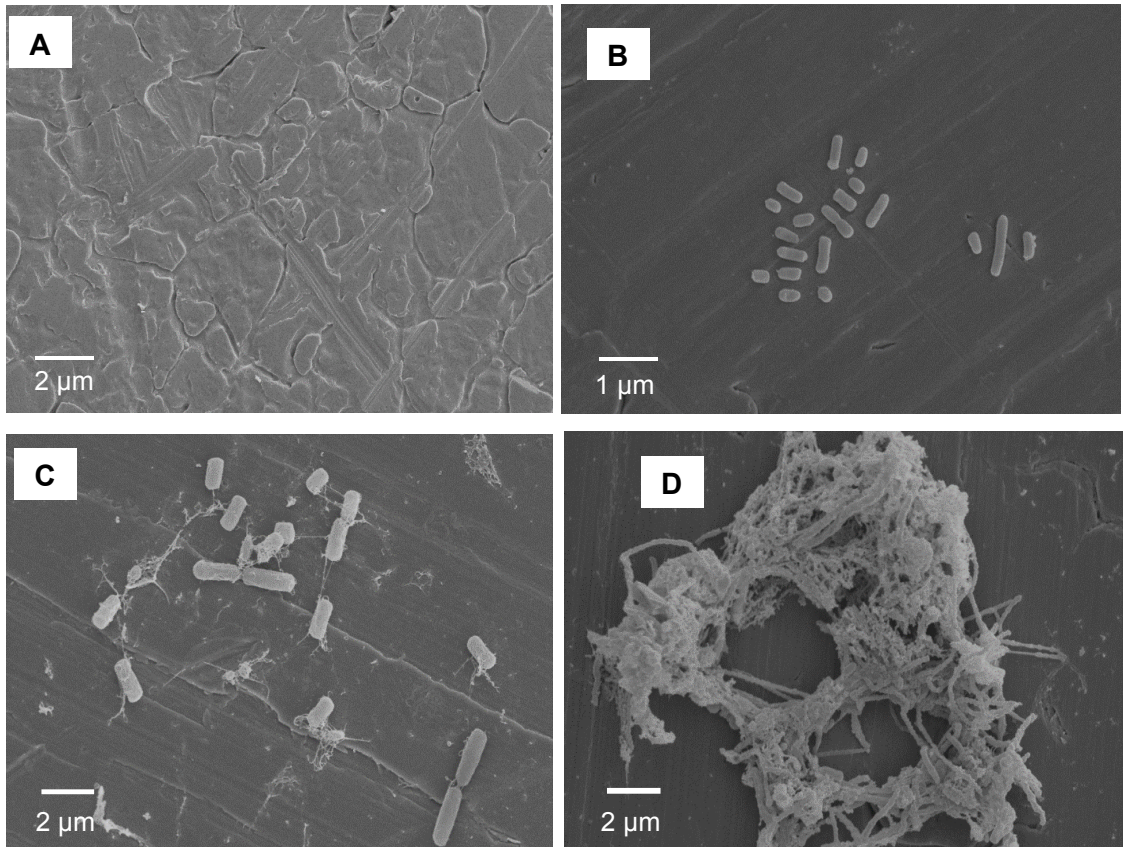


Figura 1. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de adesão e biofilme formados por *Bacillus cereus* em cupons de aço inoxidável, após 48 h de contato. (A) temperatura de 5 °C e pH 4,5. (B) temperatura de 5 °C e pH 9,0. (C) temperatura de 32 °C e pH 4,5 e (D) temperatura de 32 °C e pH 9,0.

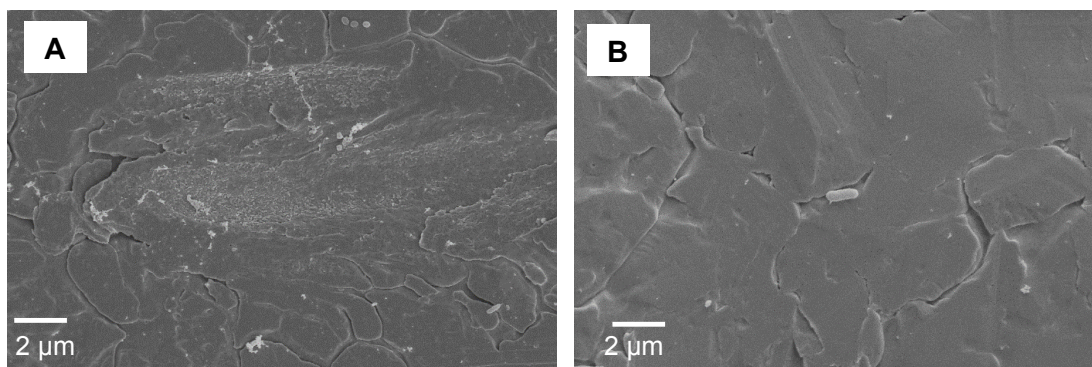


Figura 2. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de superfícies de aço inoxidável. (A) e (B) presença de fissuras.

5.2. Modelagem probabilística de regressão logística

A partir das respostas de adesão/não adesão e formação de biofilme/não formação de biofilme descritas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente, foram construídos modelos probabilísticos de regressão logística, com o objetivo de descrever a probabilidade de adesão ou formação de biofilme das três estirpes como resposta à influência dos fatores tempo, pH e temperatura. A utilização desse modelo para descrever a interface de crescimento/não crescimento dos microrganismos foi reportado por muitos autores (LOPEZ-MALO; PALOU, 2000; PEÑA, 2005; DAELMAN et al., 2013; HABERBECK et al., 2015; KHANIPOUR et al., 2016; HUANG; LI; HWANG, 2018), mostrando grande flexibilidade, sendo possível introduzir dentro do modelo, outros modelos, como, o de raiz quadrada e o modelo polinomial. No entanto, este modelo ainda tem sido pouco utilizado para descrever os efeitos de fatores ambientais na formação de biofilmes.

Nas Tabelas 6, 7 e 8 estão apresentadas as estimativas dos coeficientes dos modelos, para as estirpes 1, 2 e 3, respectivamente. O p-valor foi utilizado para avaliar a significância dos coeficientes de regressão, sendo o nível de significância de 0,05. Pode-se observar que todos os coeficientes lineares dos modelos foram significativos ($p < 0,05$), ou seja, todos influenciaram nas respostas. Em relação aos coeficientes quadráticos, para o modelo de formação de biofilme, todos se mostraram significativos, exceto pelo efeito do pH ($p > 0,44$) do modelo proposto para a estirpe 2. Para os modelos de adesão, os coeficientes quadráticos não foram significativos

($p > 0,05$). Já para as interações, apenas as combinações entre pH e temperatura foram significativas para os modelos de adesão e todas foram significativas para os modelos de biofilme, com exceção da interação tempo e pH.

Tabela 6. Coeficientes do modelo probabilístico de regressão logística de adesão e formação de biofilme para a Estirpe 1.

Coeficiente	Variável	Estimativa	Desvio Padrão	p-valor
Adesão				
β_0	Constante	-47,992	13,137	0,000
β_1	t	0,346	0,086	0,000
β_2	pH	3,540	1,153	0,002
β_3	T	1,547	0,458	0,001
β_4	pH*T	-0,129	0,047	0,006
Biofilme				
β_0	Constante	-55,225	10,566	0,000
β_1	t	0,328	0,072	0,000
β_2	pH	6,329	1,859	0,001
β_3	T	1,679	0,401	0,000
β_4	T*t	-0,005	0,002	0,002
β_5	pH*T	-0,054	0,021	0,011
β_6	t ²	-0,001	0,000	0,000
β_7	pH ²	-0,348	0,123	0,004
β_8	T ²	-0,014	0,006	0,014

Tabela 7. Coeficientes do modelo probabilístico de regressão logística de adesão e formação de biofilme para a Estirpe 2.

Coeficiente	Variável	Estimativa	Desvio Padrão	p-valor
Adesão				
β_0	Constante	-35,528	9,524	0,000
β_1	t	0,282	0,064	0,000
β_2	pH	2,400	0,837	0,004
β_3	T	1,115	0,335	0,001
β_4	pH*T	-0,085	0,034	0,013
Biofilme				
β_0	Constante	-51,843	9,942	0,000
β_1	t	0,311	0,060	0,000
β_2	pH	2,649	0,639	0,000
β_3	T	2,418	0,528	0,000
β_4	T*t	-0,006	0,001	0,000
β_5	pH*T	-0,082	0,023	0,000
β_6	t ²	-0,001	0,000	0,000
β_7	T ²	-0,026	0,007	0,000

Tabela 8. Coeficientes do modelo probabilístico de regressão logística de adesão e formação de biofilme para a Estirpe 3.

Coeficiente	Variável	Estimativa	Desvio Padrão	p-valor
Adesão				
β_0	Constante	-37,436	9,191	0,000
β_1	t	0,283	0,062	0,000
β_2	pH	3,293	0,893	0,000
β_3	T	1,121	0,301	0,000
β_4	pH*T	-0,103	0,032	0,001
Biofilme				
β_0	Constante	-72,068	15,165	0,000
β_1	t	0,326	0,083	0,000
β_2	pH	7,811	2,434	0,001
β_3	T	2,566	0,648	0,000
β_4	T*t	-0,004	0,002	0,032
β_5	pH*T	-0,120	0,032	0,000
β_6	t ²	-0,001	0,000	0,001
β_7	pH ²	-0,291	0,147	0,049
β_8	T ²	-0,024	0,009	0,005

Na Tabela 9 estão apresentadas as equações matemáticas geradas a partir desses modelos para explicar a adesão e formação de biofilme das estirpes de *B. cereus* em superfícies de aço inoxidável em função do tempo, pH e temperatura. Os termos não significativos ($p > 0,05$) foram eliminados dos modelos. Pode-se substituir os valores de $g(x)$ das equações abaixo, afim de prever probabilidades para ocorrer adesão ou formação de biofilmes, além de ser possível encontrar o tempo, temperatura e pH mínimos para adesão ou formação de biofilme.

Tabela 9. Equações matemáticas geradas pelos modelos de adesão e formação de biofilme das estirpes de *Bacillus cereus*.

Modelos ajustados	
Estirpe 1	
Adesão	$g(x) = -47,992 + 0,346 * t + 3,540 * pH + 1,547 * T - 0,129 * pH * T$
Biofilme	$g(x) = -55,225 + 0,328 * t + 6,329 * pH + 1,679 * T - 0,005 * T * t - 0,054 * pH * T - 0,001 * t^2 - 0,348 * pH^2 - 0,014 * T^2$
Estirpe 2	
Adesão	$g(x) = -35,528 + 0,282 * t + 2,400 * pH + 1,115 * T - 0,085 * pH * T$
Biofilme	$g(x) = -51,843 + 0,311 * t + 2,649 * pH + 2,418 * T - 0,006 * T * t - 0,082 * pH * T - 0,001 * t^2 - 0,026 * T^2$
Estirpe 3	
Adesão	$g(x) = -37,436 + 0,283 * t + 3,293 * pH + 1,121 * T - 0,103 * pH * T$
Biofilme	$g(x) = -72,068 + 0,326 * t + 7,811 * pH + 2,556 * T - 0,004 * T * t - 0,120 * pH * T - 0,001 * t^2 - 0,291 * pH^2 - 0,024 * T^2$

Ressalta-se ser necessário identificar se os modelos explicam os dados de forma adequada. Assim, o R^2 , teste de adequação de Hosmer-Lemeshow e porcentagem de concordância foram usados como indicativos de bom ajuste dos modelos. Os resultados encontrados a partir destes testes encontram-se na Tabela 10. Todos os modelos probabilísticos de regressão logística construídos, se mostraram eficazes para prever as respostas de adesão e formação de biofilme frente aos fatores estudados. Assim, é possível afirmar que estes podem ser utilizados para prever eventos de adesão/não adesão e formação de biofilme/não formação de biofilme de diferentes estirpes de *B. cereus*.

As porcentagens de acertos globais para a adesão e formação de biofilme foram de 97,9 e 93,8, para os modelos da estirpe 1, 97,9 e 93,1 para a estirpe 2 e 94,4 e 96,2 para a estirpe 3, respectivamente (Tabela 10). Desses valores, o modelo para a estirpe 1, acertou em 97,6% da não adesão dessa estirpe e 98,3% da adesão, em 93,4% da não formação de biofilme e 94,1% da formação de biofilme, enquanto o modelo da estirpe 2, acertou em 97,6% da não adesão, em 98,3% da adesão, 92,5% da não formação de biofilme e 93,7% da formação de biofilme. Já para os modelos da estirpe 3, as determinações de concordância mostraram que 95,9% das predições de não adesão e 93% da adesão foram concordantes com os dados, enquanto para a formação de biofilme, esses valores foram de 95,7% e 96,6%, respectivamente.

Os falsos positivos e negativos indicam o número de falhas do modelo estimado. Quando o modelo classifica como sucesso (1) as observações originalmente classificadas como insucesso (0), originam-se os falsos positivos. Desse modo, o modelo está predizendo do lado seguro. Já a porcentagem de observações originalmente classificadas na classe sucesso (1), mas que o modelo classifica na classe insucesso (0) é denominado por falsos negativos. Assim, os falsos positivos para o modelo da estirpe 1 representaram 2,4% e os falsos negativos 1,7% para a adesão; 6,6% falsos positivos e 5,9% falsos negativos para a formação de biofilme. Para a estirpe 2, os falsos positivos foram de 2,4% e os negativos 1,7% para o modelo de adesão e para o de biofilme os falsos positivos representaram 7,5%, enquanto 6,3% foram falsos negativos. Já para a estirpe 3, os falsos positivos foram de 4,1% e os falsos negativos de 7,0% para a adesão, enquanto para o modelo de formação de biofilme, estes valores foram de 4,3% e 3,4%, respectivamente.

Tabela 10. Porcentagem de acertos, R2 e Teste de Hosmer-Lemeshow dos valores preditos pelos modelos probabilísticos de regressão logística, para a estirpe 1, 2 e 3, no procedimento de ajuste.

	Porcentagem de acertos	R2	Teste de Hosmer e Lemeshow
Estirpe 1			
Adesão	97,9	0,90	0,025
Biofilme	93,8	0,85	0,867
Estirpe 2			
Adesão	97,9	0,88	0,143
Biofilme	93,1	0,84	0,376
Estirpe 3			
Adesão	94,4	0,88	0,996
Biofilme	96,2	0,89	0,945

Analisando os R² calculados para os modelos construídos, observa-se que estes apresentaram valores acima de 0,84. Sabe-se que valores de R² quanto mais próximos de 1, melhor é a predição do modelo.

O teste de Hosmer-Lemeshow é realizado com intuito de medir a proximidade dos valores previstos e observados. Visto que o teste tem como hipótese nula que os valores previstos pelo modelo são iguais aos valores observados e como hipótese alternativa que os valores previstos não correspondem aos observados, um $p > 0,05$, significa que o modelo prevê os dados de forma adequada. Desse modo, os valores de p encontrados para este teste foram acima de 0,05, o que reforça o bom ajuste do modelo aos dados, com exceção do modelo construído para a adesão da estirpe 1.

Moraes et al., (2018), desenvolveram modelos para predição dos limites de adesão e formação de biofilme de diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* em função do pH, temperatura e concentrações de NaCl e encontraram valores de R² acima de 0,80. Os valores da estatística de Hosmer-Lemeshow foram maiores que 0,05, enquanto a porcentagem de acertos se encontraram entre 85% e 96%. O modelo probabilístico desenvolvido por DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLU; LIANOU; KOUTSOUMANIS (2016), para formação de biofilme de *Samonella enterica*

ser. Newport, teve um grau de concordância entre as probabilidades previstas e as observações de 99,8% e um valor de estatística de Hosmer-Lemeshow maior que 0,05, resultados concordantes com os encontrados no presente estudo.

As Figuras 3, 4 e 5 correspondem às probabilidades de adesão e formação de biofilmes por *B. cereus* preditas pelos modelos de regressão logística, desenvolvidos para as estirpes 1, 2 e 3, respectivamente. Para cálculo dessas probabilidades, a equação 2 foi utilizada com substituição dos valores de $g(x)$ para cada estirpe, conforme as equações representadas na tabela 8. Foi fixado o tempo de 24 h para o cálculo das probabilidades em diferentes combinações de temperatura e pH, artifício utilizado por diversos autores (PEÑA et al., 2011; COSTA, 2016; KOSEGARTEN et al., 2017; MORAES et al., 2018).

Pode-se observar a partir dessas Figuras que, quanto maior a temperatura, maior a probabilidade das bactérias se aderirem e formarem biofilmes. Houve inibição da adesão das estirpes apenas em baixas temperaturas, exceto para a estirpe 3, que mesmo à 5 °C o modelo prediz adesão à pH 9,0 com $p=0,51$, sendo que experimentalmente esse comportamento não foi observado. Isto é importante, pois mostra que assim, o modelo está predizendo para o lado seguro.

Por outro lado, para os modelos de formação de biofilmes das estirpes estudadas, só a partir de 25 °C e pH 6,0 houve maior probabilidade das estirpes formarem biofilmes, não sendo observado essas respostas quando o pH era 4,5, evidenciando a influência de baixos valores de pH. Segundo GARRETT et al. (2008) e MORAES et al. (2018), com a diminuição do pH, há um aumento da atividade das bombas de prótons ligadas às membranas para excluir H⁺ do citoplasma. Desse modo, a energia celular é utilizada para evitar uma acidificação interna das células e com isso, há uma redução nos mecanismos envolvidos na adesão e formação de biofilme.

Quando a variabilidade de adesão entre as estirpes foi estudada, a Estirpe 3 apresentou maior probabilidade de adesão a baixas temperaturas (5 °C e 15 °C), enquanto que, para a formação de biofilmes, as células não apresentaram diferenças entre si. Portanto, estes resultados mostram que a redução da temperatura retarda, mas não impede a adesão e formação de

biofilmes por todas as estirpes, sendo relevante para a indústria de laticínios, visto que produtos como o leite são armazenados a baixas temperaturas.

Nota-se que ao comparar a adesão e a formação de biofilme, a probabilidade de formação de biofilme é mais afetada pelos fatores temperatura e pH estudados do que a adesão. Por exemplo, em valores de pH de 4,5 e temperatura de 25°C as bactérias se aderem com probabilidades maiores que 0,58. Já para formarem biofilmes, mesmo com aumento do pH para 6,0, estas estirpes apresentam probabilidades menores que 0,58.

Conhecer as combinações de fatores que podem afetar as probabilidades de adesão e formação de biofilmes durante o processamento de alimentos é de grande importância para a indústria de alimentos, que pode utilizar desse artifício para garantir a qualidade dos alimentos, assegurando a saúde dos consumidores.

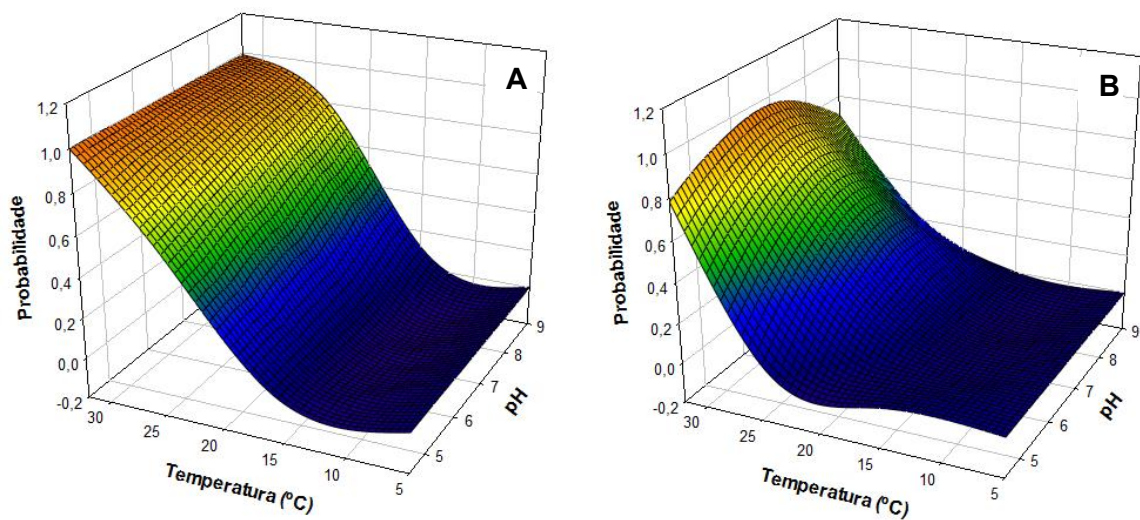


Figura 3. Probabilidades de adesão (A) e formação de biofilmes (B) da Estirpe 1, em 24 h, preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística.

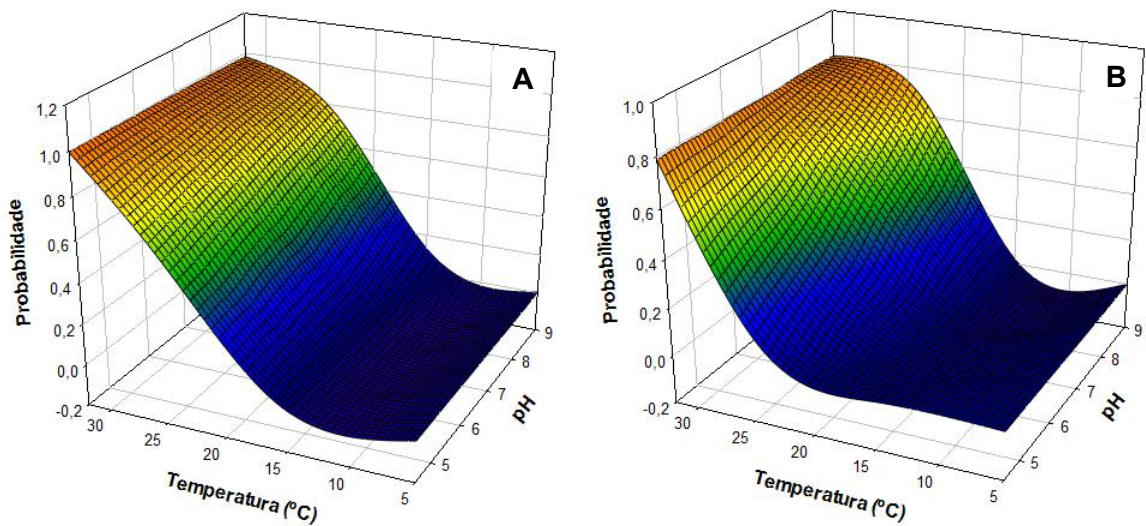


Figura 4. Probabilidades de adesão (A) e formação de biofilmes (B) da Estirpe 2, em 24 h, previstas pelo modelo probabilístico de regressão logística.

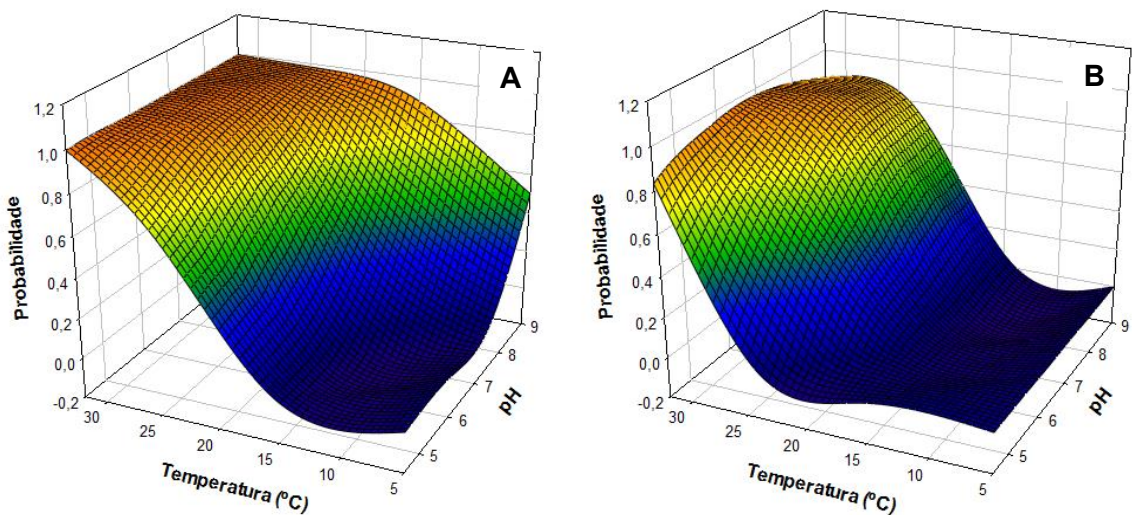


Figura 5. Probabilidades de adesão (A) e formação de biofilmes (B) da Estirpe 3, em 24 h, previstas pelo modelo probabilístico de regressão logística.

Na tabela 11 estão descritas as temperaturas críticas onde ocorrem a adesão das estirpes de *B. cereus*, previstas pelos modelos probabilísticos de regressão logística construídos, com probabilidades 0,05, 0,1 e 0,5 de ocorrência desses eventos (ou probabilidades de 0,95, 0,80 e 0,5 de não ocorrer adesão).

As previsões para todos os modelos demonstraram que para evitar a adesão bacteriana, temperaturas baixas são necessárias. É possível observar também que, quanto menor o valor de pH, maior a temperatura crítica, ou seja, maior será a temperatura mínima para ocorrer a adesão por *B. cereus*, reforçando a importância de baixos valores de pH na inibição da adesão

bacteriana.

As temperaturas críticas foram menores para a estirpe 3. Nota-se que para valores de pH 6,0 e 6,6, a temperatura está entre 14 °C e 22 °C. Estes resultados são de grande representatividade para indústria de alimentos, uma vez que muitos dos produtos alimentícios, como por exemplo o leite (pH=6,6) encontram-se nesta faixa de pH. Desta forma, abusos de temperatura podem contribuir para a adesão de bactérias nestas situações.

Tabela 11. Temperaturas críticas de adesão (°C) das estirpes de *Bacillus cereus* preditas pelos modelos probabilísticos de regressão logística.

pH	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)
		P = 0,05	P = 0,1	P = 0,50
Estirpe 1				
4,5	24	22	22	25
5,0	24	21	22	24
5,5	24	21	22	24
6,0	24	20	21	24
6,6	24	19	20	23
7,0	24	19	20	23
7,5	24	18	19	23
9,0	24	13	15	20
Estirpe 2				
4,5	24	21	22	25
5,0	24	20	21	24
5,5	24	19	21	24
6,0	24	19	20	24
6,6	24	18	19	23
7,0	24	17	19	23
7,5	24	16	18	23
9,0	24	12	14	20
Estirpe 3				
4,5	24	20	21	24
5,0	24	19	20	23
5,5	24	17	19	23
6,0	24	16	17	22
6,6	24	14	15	20
7,0	24	12	13	29
7,5	24	9	11	17
9,0	24	<1	<1	5

Na Tabela 12 são demonstrados os tempos críticos para adesão das estirpes de *B. cereus*, preditos pelos modelos probabilísticos de regressão logística, com probabilidades 0,05, 0,1 e 0,5 de ocorrência desses eventos.

De acordo com Lopez-malo; Palou (2000), tempos críticos mais longos

são previstos em probabilidades de 0,50. Em contrapartida, probabilidades mais baixas, de 0,1 e 0,05, preveem menores tempos críticos uma vez que se tem uma maior margem de segurança. Como pode ser observado, este fato foi constatado no presente estudo.

A combinação de baixos valores de pH e baixas temperaturas demonstrou efetividade no retardo do tempo de adesão. No entanto, mesmo sob baixos valores de pH, o aumento da temperatura para 25 °C, ocasionou um avanço de até 56 h no tempo de adesão das estirpes. Morton et al. (1998) afirmam que o processo de adesão ocorre na intensidade máxima quando as bactérias são mantidas próximas ou em sua temperatura ótima de crescimento, independentemente da superfície testada. Visto que a temperatura ideal para crescimento de *B. cereus* encontra-se na faixa de 25 a 37 °C, essa afirmação pode explicar esses resultados.

Outro fato a ser observado é que a estirpe 3 apresenta um menor tempo crítico para adesão em relação as estirpes 1 e 2, podendo ser destacado um tempo mínimo de 6 h para pH 6,6 e temperatura de 25 °C. Sugere-se desse modo, que essa estirpe demonstra maior capacidade de adesão em relação as demais estirpes frente as condições avaliadas.

Tabela 12. Tempos críticos de adesão (h) das estirpes de *Bacillus cereus* preditas pelos modelos probabilísticos de regressão logística.

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Tempo (h)	Tempo (h)
		P = 0,05	P = 0,1	P = 0,50
Estirpe 1				
4,5	5	70	72	79
4,5	10	56	58	65
4,5	15	42	44	51
4,5	20	28	30	37
4,5	25	14	16	23
6,6	5	53	55	61
6,6	10	43	45	51
6,6	15	33	35	41
6,6	20	22	25	31
6,6	25	12	15	21
Estirpe 2				
4,5	5	64	67	75
4,5	10	51	54	62
4,5	15	38	41	49
4,5	20	25	28	36
4,5	25	12	15	23
6,6	5	50	52	60
6,6	10	40	42	50
6,6	15	30	33	40
6,6	20	20	23	31
6,6	25	10	13	21
Estirpe 3				
4,5	5	58	61	68
4,5	10	46	49	57
4,5	15	35	37	45
4,5	20	23	26	33
4,5	25	11	14	22
6,6	5	37	40	48
6,6	10	30	32	40
6,6	15	22	24	32
6,6	20	14	17	24
6,6	25	6	9	17

Os valores mínimos de pH preditos pelos modelos probabilísticos de regressão logística para adesão das estirpes de *B. cereus* frente a diferentes combinações de tempo e temperatura, com probabilidades de 0,05, 0,1 e 0,5, encontram-se na Tabela 13.

Os valores de pH críticos calculados para todas as estirpes analisadas, são inversamente proporcionais ao aumento de temperatura. A medida que aumenta a temperatura, o pH mínimo necessário para iniciar o processo de adesão bacteriana diminui.

Como anteriormente mencionado, o processo de adesão bacteriana é impulsionado em meios com temperaturas próximas da ideal para crescimento microbiano. Assim, pode-se observar que para garantir a inibição da adesão pelas bactérias a 25 °C, necessita-se reduzir os valores de pH.

A utilização dos modelos matemáticos construídos para prever valores críticos de temperatura, tempo e pH para ocorrência de eventos de adesão por diferentes estirpes de *B. cereus* é de extrema importância, uma vez que com esses dados pode-se buscar combinações de fatores que inibem a adesão bacteriana, evitando desse modo a formação de biofilme e conseqüentemente, possíveis contaminações cruzadas dentro da indústria de alimentos.

Destaca-se que outros valores de pH, tempo e temperaturas podem ser calculados utilizando outras combinações dos fatores. No entanto, os resultados são válidos apenas dentro dos intervalos das condições analisadas.

Encontrar valores críticos para adesão bacteriana a partir dos modelos gerados, demonstra a importância destes para preservação da qualidade e segurança dos produtos alimentícios.

Tabela 13. Valores de pHs críticos de adesão das estirpes de *Bacillus cereus* preditas pelos modelos probabilísticos de regressão logística.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	pH	pH	pH
		P = 0,05	P = 0,1	P = 0,50
Estirpe 1				
24	5	10	10	11
24	10	9,5	9,8	10,8
24	15	8,4	8,9	10,3
24	20	6	6,8	9,1
24	25	<1	<1	3,2
Estirpe 2				
24	5	10,3	10,6	11,7
24	10	9,5	9,9	11,4
24	15	8,1	8,7	10,7
24	20	5	6,1	9,3
24	25	<1	<1	3,2
Estirpe 3				
24	5	8	8,2	9
24	10	7,3	7,6	8,6
24	15	6,2	6,7	7,9
24	20	4,3	4,9	6,7
24	25	<1	<1	3,6

5.2.1. Validação dos modelos de probabilidade de regressão logística

Os modelos probabilísticos de regressão logística desenvolvidos para predição de adesão e formação de biofilmes pelas três estirpes de *B. cereus* foram validados em meio de cultura, no qual foi usado BHI e em matriz alimentícia, por utilização de leite UHT integral. Os resultados correspondentes à validação encontram-se nas tabelas 14, 15 e 16, para as estirpes 1, 2 e 3, respectivamente.

Os valores preditos pelos modelos desenvolvidos apresentaram boa concordância com os resultados nos ensaios de validação experimental. Para os ensaios de adesão, a porcentagem de concordância foi de 57% para as

estirpes 1 e 2 e 86% para a estirpe 3, sendo todos os erros obtidos, falsos negativos. Os modelos construídos para formação de biofilme acertaram em 71%, 68% e 89% dos casos para as estirpes 1, 2 e 3, respectivamente. Todos os erros obtidos pelos modelos das estirpes 1 e 2 foram falsos negativos, diferentemente da estirpe 3, em que 7,5% foram falsos negativos (crescimento observado, mas sem crescimento previsto) e 3,5% falsos positivos (nenhum crescimento observado, mas crescimento previsto). O fato dos valores preditos na validação experimental apresentarem maiores taxas de falsos negativos pode ser devido à falta de repetição.

Embora as precisões tenham sido inferiores quando comparadas com as previsões para os dados de desenvolvimento do modelo, as previsões para os dados de validação foram suficientemente precisas. Desse modo, todos os modelos apresentados podem ser considerados adequados para avaliação da adesão e formação de biofilmes das estirpes de *B. cereus* estudadas.

Carrasco et al. (2012) enfatizam a importância da validação para demonstrar a robustez do modelo e sua aplicabilidade a situações reais. A utilização desse recurso em matrizes alimentícias confirma a aplicação de modelos na previsão da adesão e formação de biofilmes por *B. cereus* em superfícies de contato com alimentos, desde que os fatores estejam dentro da faixa estudada.

Tabela 14. Probabilidades de adesão e formação de biofilmes pelo modelo da Estirpe 1.

Ensaio			Adesão		Biofilme	
Tempo	pH	Temperatura	Predições	Observações	Predições	Observações
BHI						
0	5,5	10	0,00	0	0,00	0
0	6,5	10	0,00	0	0,00	0
0	5,5	20	0,00	0	0,00	0
0	6,5	20	0,00	0	0,00	0
24	5,5	10	0,00	1	0,00	0
24	6,5	10	0,00	1	0,00	0
24	5,5	20	0,03	1	0,02	0
24	6,5	20	0,08	1	0,05	1
48	5,5	10	0,03	1	0,00	0
48	6,5	10	0,22	1	0,00	1
48	5,5	20	0,99	1	0,43	1
48	6,5	20	1,00	1	0,69	1
72	5,5	10			0,02	1
72	6,5	10			0,11	1
72	5,5	20			0,91	1
72	6,5	20			0,97	1
Leite						
0	6,6	10	0,00	0	0,00	0
0	6,6	20	0,00	0	0,00	0
0	6,6	30	0,02	0	0,18	0
24	6,6	10	0,00	1	0,00	0
24	6,6	20	0,08	1	0,05	1
24	6,6	30	0,99	1	0,90	1
48	6,6	10	0,26	1	0,00	1
48	6,6	20	1,00	1	0,71	1
48	6,6	30	1,00	1	0,99	1
72	6,6	10			0,12	1
72	6,6	20			0,97	1
72	6,6	30			1,00	1

Tabela 15. Probabilidades de adesão e formação de biofilmes pelo modelo da Estirpe 2.

Ensaio			Adesão		Biofilme	
Tempo	pH	Temperatura	Predições	Observações	Predições	Observações
BHI						
0	5,5	10	0,00	0	0,00	0
0	6,5	10	0,00	0	0,00	0
0	5,5	20	0,00	0	0,00	0
0	6,5	20	0,00	0	0,00	0
24	5,5	10	0,00	1	0,00	0
24	6,5	10	0,00	1	0,00	0
24	5,5	20	0,07	1	0,01	1
24	6,5	20	0,13	1	0,04	1
48	5,5	10	0,09	1	0,00	0
48	6,5	10	0,32	1	0,00	0
48	5,5	20	0,98	1	0,19	1
48	6,5	20	0,99	1	0,39	1
72	5,5	10			0,00	0
72	6,5	10			0,00	1
72	5,5	20			0,56	1
72	6,5	20			0,78	1
Leite						
0	6,6	10	0,00	0	0,00	0
0	6,6	20	0,00	0	0,00	0
0	6,6	30	0,04	0	0,19	0
24	6,6	10	0,00	1	0,00	0
24	6,6	20	0,14	1	0,04	1
24	6,6	30	0,98	1	0,75	1
48	6,6	10	0,35	1	0,00	0
48	6,6	20	0,99	1	0,41	1
48	6,6	30	0,99	1	0,93	1
72	6,6	10			0,00	1
72	6,6	20			0,79	1
72	6,6	30			0,94	1

Tabela 16. Probabilidades de adesão e formação de biofilmes pelo modelo da Estirpe 3.

Ensaio			Adesão		Biofilme	
Tempo	pH	Temperatura	Predições	Observações	Predições	Observações
BHI						
0	5,5	10	0,00	0	0,00	0
0	6,5	10	0,00	0	0,00	0
0	5,5	20	0,00	0	0,00	0
0	6,5	20	0,00	0	0,00	0
24	5,5	10	0,00	0	0,00	0
24	6,5	10	0,01	0	0,00	0
24	5,5	20	0,21	1	0,02	0
24	6,5	20	0,48	1	0,10	0
48	5,5	10	0,46	1	0,00	0
48	6,5	10	0,89	1	0,00	0
48	5,5	20	1,00	1	0,53	1
48	6,5	20	1,00	1	0,88	0
72	5,5	10			0,00	0
72	6,5	10			0,06	1
72	5,5	20			0,96	1
72	6,5	20			0,00	1
Leite						
0	6,6	10	0,00	0	0,00	0
0	6,6	20	0,00	0	0,00	0
0	6,6	30	0,09	0	0,17	0
24	6,6	10	0,01	0	0,00	0
24	6,6	20	0,51	1	0,12	0
24	6,6	30	0,99	1	0,94	1
48	6,6	10	0,91	1	0,00	0
48	6,6	20	1,00	1	0,90	1
48	6,6	30	1,00	1	1,00	1
72	6,6	10			0,08	1
72	6,6	20			0,99	1
72	6,6	30			1,00	1

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que os fatores pH, tempo e temperatura afetaram a adesão e formação de biofilmes pelas diferentes estirpes de *B. cereus*.

Combinações entre baixas temperaturas e baixos valores de pH foram eficazes na inibição da adesão bacteriana e consequente formação de biofilmes.

Dentre as estirpes avaliadas, a estirpe 3 mostrou maior capacidade de adesão a 15 °C.

As estirpes submetidas a temperaturas de 15 °C e valores de pH 6,0, 7,5 e 9,0 só foram capazes de formar biofilme a partir de 96 h, mostrando a importância do tempo e da temperatura nesse processo.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar as células aderidas e os biofilmes formados, reforçando os resultados obtidos pelo método tradicional de contagem.

Os modelos probabilísticos de regressão logística foram eficazes para descrever a adesão e formação de biofilme das três estirpes de *B. cereus*, mostrando se ajustar bem aos dados experimentais. Estes modelos são essenciais para definir as combinações dos fatores tempo, pH e temperatura que podem afetar a adesão e formação de biofilmes durante o processamento de alimentos e é de grande importância para a indústria, que pode utilizar desse artifício para análise de riscos, visando garantir a qualidade dos alimentos, assegurando desse modo, a saúde dos consumidores.

A validação dos modelos probabilísticos de regressão logística em meio de cultura e matriz alimentícia confirmaram a eficácia dos modelos para descrever probabilidades de adesão e formação de biofilme frente aos fatores estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; DRIDER, D.; DHULSTER P.; CHIHIB N. E. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives microbiology**, v. 196, p. 453–472, 2014.

ABEE, T.; GROOT, M. N.; TEMPELAARS, M.; ZWIETERING, M.; MOEZELAAR, R.; VAN DER VOORT, M. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. **Food microbiology**, v. 28, n. 2, p. 199-208, 2011.

AGATA, N.; OHTA, M.; YOKOYAMA, K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. **International journal of food microbiology**, v. 73, n. 1, p. 23-27, 2002.

AHMED, A. A. H.; MOUSTAFA, M. K.; MARTH, E. H. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. **Journal of Food Protection**, v. 46, n. 2, p. 126-128, 1983.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 412p, 2008.

ANKOLEKAR, C.; RAHMATI, T.; LABBÉ, R. G. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in US rice. **International journal of food microbiology**, v. 128, n. 3, p. 460-466, 2009.

ARROYO-LÓPEZ, F. N.; BAUTISTA-GALLEGO, J.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. Predictive microbiology and table olives. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, p. 1452-1461, 2010.

BALSA-CANTO, E.; ALONSO, A. A.; BANGA, J. R. Computing optimal dynamic experiments for model calibration in predictive microbiology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 31, n. 2, p. 186-206, 2008.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International journal of food microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 277-294, 1994.

BARRA, F. R.; E., SORIANO, A. A.; VOLLARO, A.; POSTIGLIONE, I.; PIERANTONI, G. M.; CATANIA, M. R. Photodynamic and antibiotic therapy in combination to fight biofilms and resistant surface bacterial infections. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 9, p. 20417-20430, 2015.

BARRETO, J. M. O. **Ocorrência de *Bacillus cereus* em produtos lácteos comercializados na microrregião de Viçosa, Minas Gerais, determinação de genes de virulência e produção de toxina.** 2016. 44 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG, 2016.

BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J. D., PENÃ, W. E. L., MINIM, L. A., SÁ, J. P. N., FERNANDES, P. E., & COLOMBARI, D. D. S. Modeling of the adhesion of *Bacillus cereus* isolated from a dairy plant as a function of time and temperature. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 2, p. 187-191, 2013.

BONSAGLIA, E. C. R.; SILVA, N. C. C.; JÚNIOR, A. F.; JÚNIOR, J. A. TSUNEMI, M. H.; RALL, V. L. M. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food control**, v. 35, n. 1, p. 386-391, 2014.

BRIDIER A.; S. V. P.; GUILBAUD M.; PIARD J. C.; NAÏTALI M.; BRIANDET R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**. V. 45, p. 167–178, 2015.

CARELI, R. T. **Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies utilizadas na indústria de alimentos.** 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG, 2005.

CARLIN, F.; BRILLARD, J.; BROUSSOLLE, V.; CLAVEL, T.; DUPORT, C.; JOBIN, M.; NGUYEN-THÉ, C. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1885-1894, 2010.

CARLIN, F.; FRICKER, M.; PIELAAT, A.; HEISTERKAMP, S.; SHAHEEN, R.; SALONEN, M. S.; EHLING-SCHULZ, M. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. **International journal of food microbiology**, v. 109, n. 1, p. 132-138, 2006.

CARRASCO, E.; DEL ROSAL, S.; RACERO, J. C.; GARCÍA-GIMENO, R. M. A review on growth/no growth *Salmonella* models. **Food research international**, v. 47, n. 1, p. 90-99, 2012.

CHAVES, J. Q.; DE PAIVA, E. P.; RABINOVITCH, L.; VIVONI, A. M. Molecular Characterization and Risk Assessment of *Bacillus cereus* Sensus Lato Isolated from Ultrahigh-Temperature and Pasteurized Milk Marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 7, p. 1060-1065, 2017.

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.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 2, n. 1, p. 22-32, 2003.

CHON, J. W.; YIM, J. H.; KIM, H. S.; KIM, D. H.; KIM, H.; OH, D. H.; SEO, K. H. Quantitative prevalence and toxin gene profile of *Bacillus cereus* from ready-to-eat vegetables in South Korea. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. 9, p. 795-799, 2015.

DA COSTA, D. S. **Modelagem probabilística do crescimento de *Listeria monocytogenes* em função do efeito de pH, temperatura e tempo de estocagem**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa –UFV, Viçosa – MG, 2016.

DAELMAN, J.; VERMEULEN, A.; WILLEMYNS, T.; ONGENAERT, R.; JACXSENS, L.; UYTENDAELE, M.; DEVLIEGHERE, F. Growth/no growth models for heat-treated psychrotrophic *Bacillus cereus* spores under cold storage. **International journal of food microbiology**, v. 161, n. 1, p. 7-15, 2013.

SÁ, J. P. N. **Influência genotípica de estirpes de *Bacillus cereus* na adesão e na resistência a sanitizantes químicos**. 2013. 67 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa –UFV, Viçosa – MG, 2013.

DESROUSSEAUX, C.; SAUTOU, V.; DESCAMPS, S.; TRAORÉ, O. Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. **Journal of hospital Infection**, v. 85, n. 2, p. 87-93, 2013.

DI BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; IANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1552-1561, 2008.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A. R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930-936, 2015.

DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLU, D.; LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Modelling biofilm formation of *Salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity. **Food microbiology**, v. 53, p. 76-81, 2016.

DROBNIEWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, 1993.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular nutrition & food research**, v. 48, n. 7, p. 479-487, 2004.

ENEROTH, Å.; SVENSSON, B.; MOLIN, G.; CHRISTIANSSON, A. Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. **Journal of dairy research**, v. 68, n. 2, p. 189-196, 2001.

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDER, R. M.; MANNAN, K. S. B. Predictive microbiology: modeling microbial responses in food. **Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)**, v. 40, n. 2, p. 121-131, 2011.

FASTENBERG, J. H.; HSUEH, W. D.; MUSTAFA, A.; AKBAR, N. A.; ABUZEID, W. M. Biofilms in chronic rhinosinusitis: Pathophysiology and therapeutic strategies. **World Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 2, n. 4, p. 219-229, 2016.

FERNANDES, M. S.; ALVARES, A. C. C.; MANOEL, J. G. M.; ESPER, L. M. R.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. Formation of multi-species biofilms by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing and effectiveness of chemical sanitation procedures. **International Dairy Journal**, v. 72, p. 23-28, 2017.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623, 2010.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1º ed. São Paulo: Atheneu, 182p, 2008.

FRÖSLER, J.; PANITZ, C.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C.; RETTBERG, P. Survival of *Deinococcus geothermalis* in Biofilms under Desiccation and Simulated Space and Martian Conditions. **Astrobiology**, v. 17, n. 5, p. 431-447, 2017.

GARRE, A.; FERNÁNDEZ, P. S.; LINDQVIST, R.; EGEEA, J. A. Bioinactivation: Software for modelling dynamic microbial inactivation. **Food Research International**, v. 93, p. 66-74, 2017.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, 2008.

GIBSON, A.M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal Applied Bacteriology**, v.62, n. 6, p.479-490, 1987.

GIL, M. M.; MILLER, F. A.; BRANDÃO, T. R.; SILVA, C. L. Mathematical Models for Prediction of Temperature Effects on Kinetic Parameters of Microorganisms' Inactivation: Tools for Model Comparison and Adequacy in Data Fitting. **Food and Bioprocess Technology**, v. 93, p. 1-18, 2017.

GONÇALVES, L. D. A.; PICCOLI, R. H.; PERES, A. D. P. Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 352-358, 2017.

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J. B.; CHRISTENSEN, A. B.; GIVSKOV, M. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 78, n. 1, p. 79-97, 2002.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS microbiology letters**, v. 157, n. 2, p. 223-228, 1997.

GUPTA, P.; SARKAR, S.; DAS, B.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. **Archives of microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1-15, 2016.

HABERBECK, L. U.; OLIVEIRA, R. C.; VIVIJS, B.; WENSELEERS, T.; AERTSEN, A.; MICHIELS, C.; GEERAERD, A. H. Variability in growth/no growth boundaries of 188 different *Escherichia coli* strains reveals that approximately 75% have a higher growth probability under low pH conditions than *E. coli* O157: H7 strain ATCC 43888. **Food microbiology**, v. 45, p. 222-230, 2015.

HAQUE, A.; RUSSELL, N. J. Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Bacillus cereus* de arroz de Bangladesh. **Revista internacional de microbiologia alimentar**, v. 98, n. 1, p. 23-34, 2005.

HARDING, M. W.; MARQUES, L. L.; HOWARD, R. J.; OLSON, M. E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

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, n. 6, p. 585-591, 2007.

HILL, E. H.; LIZ-MARZÁN, L. M. Toward Plasmonic Monitoring of Surface Effects on Bacterial Quorum-Sensing. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 32, p. 1-10, 2017.

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

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: from mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 424-434, 2010.

HOSMER D. W.; LEMESHOW S. Applied Logistic Regression. New York: **Johns Wiley & Sons**, p. 14–15, 1989.

HOŠTACKÁ, A.; ČIŽNÁR, I.; ŠTEFKOVIČOVÁ, M. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. **Folia microbiologica**, v. 55, n. 1, p. 75-78, 2010.

HSU, L. C.; FANG, J.; BORCA-TASCIUC, D. A.; WOROBO, R. W.; MORARU, C. I. Effect of micro-and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2703-2712, 2013.

HUANG, L. Dynamic identification of growth and survival kinetic parameters of microorganisms in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 85-92, 2017.

HUANG, L. IPMP 2013—a comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. **International journal of food microbiology**, v. 171, p. 100-107, 2014.

HUANG, L.; LI, C.; HWANG, C.A. Growth/no growth boundary of *Clostridium perfringens* from spores in cooked meat: A logistic analysis. **International journal of food microbiology**, v. 266, p. 257-266, 2018.

HUSSAIN, M. S.; OH, D. H.. Substratum attachment location and biofilm formation by *Bacillus cereus* strains isolated from different sources: Effect on total biomass production and sporulation in different growth conditions. **Food Control**, v. 77, p. 270-280, 2017.

HWANG, J. Y.; PARK, J.H. Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 3, p. 1652-1660, 2015.

IBARRECHE, M. P.; CASTELLANO, P.; VIGNOLO, G. Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. **Meat science**, v. 96, n. 1, p. 295-303, 2014.

JANISSEN, R.; MURILLO, D. M.; NIZA, B.; SAHOO, P. K; NOBREGA, M. M.; CESAR, C. L.; COTTA, M. A. Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. **Scientific reports**, v. 5, p. 9856, 2015.

JESSIM, A. I.; FAKHRY, S. S.; ALWASH, S. J. Detection and Determination

of *Bacillus cereus* in Cooked Rice and Some Types of Spices with Ribosomal 16SrRNA gene Selected from Iraqi Public Restaurants. **International Journal of Bio-Resource & Stress Management**, v. 8, n. 3, p. 382-387, 2017.

KHANIPOUR, E.; FLINT, S. H.; MCCARTHY, O. J.; GOLDING, M.; PALMER, J.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T.; TAMPLIN, M. Modelling the combined effects of salt, sorbic acid and nisin on the probability of growth of *Clostridium sporogenes* in a controlled environment (nutrient broth). **Food Control**, v. 62, p. 32-43, 2016.

KIM, Y. J.; KIM, H. S.; KIM, K. Y.; CHON, J. W.; KIM, D. H.; SEO, K. H. High Occurrence Rate and Contamination Level of *Bacillus cereus* in Organic Vegetables on Sale in Retail Markets. **Foodborne pathogens and disease**, v. 13, n. 12, p. 656-660, 2016.

KOSEGARTEN, C. E.; RAMÍREZ-CORONA, N.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models. **International journal of food microbiology**, v. 240, p. 115-123, 2017

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and infection**, v. 2, n. 2, p. 189-198, 2000.

KOUTSOUMANIS, K. P.; LIANOU, A.; GOUGOULI, M. Latest developments in foodborne pathogens modeling. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 89-98, 2016.

KOUTSOUMANIS, K. P.; SOFOS, J. N. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a_w limits for growth of *Listeria monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, v. 104, n. 1, p. 83-91, 2005.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, v. 69, p. 20-29, 2016.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 153-158, 2014.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* group from various marketed dairy products in India. **Dairy science & technology**, v. 94, n. 5, p. 483-497, 2014.

KWON, M.; HUSSAIN, M. S.; OH, D. H. Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 1103-1111, 2017.

LEE, Y.; KWON, K. H.; CHAI, C.; OH, S. W. Microbial contamination of tofu in Korea and growth characteristics of *Bacillus cereus* isolates in Tofu. **LWT-Food Science and Technology**, v. 78, p. 63-69, 2017.

LESLEY, M. B.; ERNIE, S. R.; KASING, A.; SON, R. Detection of *Bacillus cereus* in formula milk and ultra high temperature (UHT) treated milk products. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 3, p. 985-989. 2017.

LIN, Y.; REN, F.; ZHAO, L.; GUO, H. Genotypes and the persistence survival phenotypes of *Bacillus cereus* isolated from UHT milk processing lines. **Food Control**, v. 82, p. 48-56, 2017.

LOPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Modeling the growth/no growth interface of *Zygosaccharomyces bailii* in mango puree. **Journal of food science**, v. 65, n. 3, p. 516–520, 2000.

MCMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. **International journal of food microbiology**, v. 73, n. 2, p. 395-407, 2002.

MENDES, R. A.; COELHO, A. Í. M.; AZEREDO, R. M. C. Contamination by *Bacillus cereus* on equipment and utensil surfaces in a food and nutrition service unit. **Ciencia & saude coletiva**, v. 16, n. 9, p. 3933-3938, 2011.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 371–394, 1949.

MORAES, J. O. .; CRUZ, E. A.; SOUZA, E. G.; OLIVEIRA, T. C.; ALVARENGA, V. O.; PEÑA, W. E.; SANT'ANA, A. S.; MAGNANI, M. Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. **International journal of food microbiology**, v. 281, p. 90-100, 2018.

MORTON, L. H. G; GREENWAY, D. L. A.; GAYLARDE, C. C.; SURMAN, S. B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, n. 3-4, p. 247-259, 1998.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: aspectos básicos da microbiologia preditiva. **Brazilian Journal of food technology**, v. 3, n. 33, p. 41-51, 2000.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm—“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 125-138, 2007.

OLIVEIRA, A. P.; REZENDE, C. S. M.; SOLA, M. C.; FEISTEL, J. C.; OLIVEIRA, J. J. D. Microbiologia Preditiva. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 9, n. 17; p. 1909, 2013.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNETRA, D. F.; PICCOLI, R. H. Microbial biofilms in the food industry: a review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.

PEÑA, W. E. L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã. 2005.** 385 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP, 2005.

PEÑA, W. E. L.; DE MASSAGUER, P. R.; ZUNIGA, A. D. G.; SARAIVA, S. H. Modeling the growth limit of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 in apple juice: effect of pH, Brix, temperature and nisin concentration. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 35, n. 4, p. 509-517, 2011.

PEÑA, W. E. L.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F.; ALVARENGA, V. O.; JUNIOR, S. R.; GRANATO, D.; ZUNIGA, A. D. G.; SANT'ANA, A. S. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 1, p. 153-158, 2014.

PERCIVAL, S. L. Importance of biofilm formation in surgical infection. **British Journal of Surgery**, v. 104, n. 2, p. 85-94, 2017.

PHILLIPS, C. A. Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 8, p. 1731-1743, 2016.

PIN-NGOEN, K. L.; KOSITCHAIYONG, A.; PRAPAGDEE, B.; SOMBATSOMPOP, N. Formation of *Escherichia coli* biofilm on LLDPE sheets by incorporation of 2-hydroxypropyl-3-piperazinyl-quinoline carboxylic acid methacrylate or silver-substituted zeolite. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 211-222, 2016.

RAEVUORI, M.; GENIGEORGIS, C. Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. **Applied microbiology**, v. 29, n. 1, p. 68-73, 1975.

REIS, A. L. S.; MONTANHINI, M.; BITTENCOURT, J. V.; DESTRO, M. T.; BERSOT, L. S. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1195-1198, 2013.

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS bulletin**, v. 36, n. 5, p. 347-355, 2011.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of applied microbiology**, v. 81, n. 5, p. 501-508, 1996.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International journal of food microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 241-264, 1994.

RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. **Journal of food protection**, v. 68, n. 12, p. 2614-2622, 2005.

SADEKUZZAMAN, M.; YANG, S.; MIZAN, M. F. R.; HA, S. D. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 491-509, 2015.

SALUSTIANO, V. C.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. F.; LIMA, J. C.; BERNARDES, P. C.; LUIZ, L. M. P.; FERNANDES, P. E. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 439-442, 2009.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1140-1154, 2002.

SEMENOV, AI. V.; FRANZ, E.; VAN BRUGGEN, A. H. C. COLIWAVE a simulation model for survival of *E. coli* O157: H7 in dairy manure and manure-amended soil. **Ecological Modelling**, v. 221, n. 4, p. 599-609, 2010.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry—a case. **Food control**, v. 13, n. 6, p. 469-477, 2002.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C; VIEIRA, M. J. A review of current emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**. v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439-447, 2000.

SMOOT, L. M.; PIERSON, M. D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. **Journal of food protection**, v. 61, n. 10, p. 1293-1298, 1998.

SPANU, C.; SCARANO, C.; SPANU, V.; PALA, C.; CASTI, D.; LAMON, S.; DE SANTIS, E. P. Occurrence and behavior of *Bacillus cereus* in naturally contaminated ricotta salata cheese during refrigerated storage. **Food microbiology**, v. 58, p. 135-138, 2016.

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

SURMAN, S. B.; WALKER, J. T.; GODDARD, D. T.; MORTON, L. H. G.; KEEVIL, C. W.; WEAVER, W.; SKINNER, A.; HANSON, K.; CALDWELL, D.; KURTZ, J. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, n. 1, p. 57-70, 1996.

SVENSSON, B.; EKELUND, K.; OGURA, H.; CHRISTIANSSON, A. Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 1, p. 17-27, 2004.

TE GIFFEL, M. C.; ZWIETERING, M. H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, v. 46, n. 2, p. 135-149, 1999.

THORSEN, L.; KANDO, C. K.; SAWADOGO, H.; LARSEN, N.; DIAWARA, B.; OUÉDRAOGO, G. A.; JESPERSEN, L. Characteristics and phylogeny of *Bacillus cereus* strains isolated from Maari, a traditional West African food condiment. **International journal of food microbiology**, v. 196, p. 70-78, 2015.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influência de carvacrol no crescimento e na produção de toxinas por *Bacillus cereus*. **Revista internacional de microbiologia alimentar**, v. 64, n. 3, p. 373-378, 2001.

VALERO, M.; SARRÍAS, J. A.; ALVAREZ, D.; SALMERÓN, M. C. Modeling the influence of electron beam irradiation on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **Food microbiology**, v. 23, n. 4, p. 367-371, 2006.

VASCONCELOS, A. C. M. **Modelagem determinística do crescimento de *Bacillus cereus* em função do pH e temperatura**. 2017. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG, 2017.

VATANYOOPAISARN, S.; NAZLI, A., DODD, C. E.; REES, C. E.; WAITES, W. M. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 860-863, 2000.

VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K. H.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M.; SCHUÉ, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377-410, 2012.

WALLS, I.; SCOTT, Virginia N. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, n. 2-3, p. 97-102, 1997.

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.

YONEZAWA, H.; OSAKI, T.; KURATA, S.; FUKUDA, M.; KAWAKAMI, H.; OCHIAI, K.; KAMIYA, S. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 197, 2009.

ZHANG, Z.; FENG, L.; XU, H.; LIU, C.; SHAH, N. P.; WEI, H. Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 2, p. 1047-1055, 2016.

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.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.