

ANGIE DAHIANA DUQUE RODRIGUEZ

BACTÉRIAS FORMADORAS DE ESPOROS EM SOBREMESAS LÁCTEAS E QUEIJO PETIT SUISSE: OCORRÊNCIA E MODELAGEM DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Pena

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2023

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

D946b
2023

Duque Rodríguez, Angie Dahiana, 1985-
Bactérias formadoras de esporos em sobremesas lácteas e
queijo petit suisse: ocorrência e modelagem matemática da
formação de biofilmes multiespécies / Angie Dahiana Duque
Rodríguez. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (82 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2023.

Referências bibliográficas: f.75-88.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.075>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Laticínios - Produção. 2. Microbiologia dos laticínios.
3. Laticínios - Contaminação - Modelos matemáticos.
4. Bactérias esporíferas. 5. Biofilmes. 6. Enzimas. I. Luera Peña,
Wilmer Edgard, 1970-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
III. Título.

CDD 22. ed. 637.4

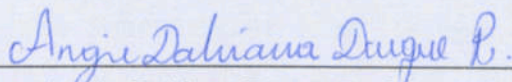
ANGIE DAHIANA DUQUE RODRIGUEZ

**BACTÉRIAS FORMADORAS DE ESPOROS EM SOBREMESAS LÁCTEAS E
QUEIJO PETIT SUISSE: OCORRÊNCIA E MODELAGEM DA FORMAÇÃO DE
BIOFILMES MULTIESPÉCIES**

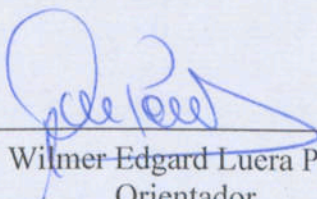
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de dezembro de 2023.

Assentimento:



Angie Dahiana Duque Rodríguez
Autora



Wilmer Edgard Luera Pena
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e Departamento de Tecnologia de Alimentos e suas colaborações pela minha formação e pelo apoio.

Ao professor Wilmer Edvard, pelos ensinamentos, orientação, paciência, oportunidades concedidas, amizade, paciência e conselho nos momentos difíceis durante a jornada acadêmica e pessoal.

Aos membros do I Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) amigos e colegas pós-graduandos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, a minhas estagiárias Andersone, Bruna e Beatriz pelo apoio, generosa colaboração, disposição, conteúdos de trabalho, discussões e momentos compartilhados.

Aos meus pais Deyanira e William por sempre serem meu porto seguro, pelo amor, carinho, apoio e compreensão, a minhas tias Edith e Betty por sempre me apoiar, pelo amor, compreensão, palavras de fôlego e apoio incondicional, a minha avó Onete pelo amor, carinho, compreensão e motivação sempre.

Aos meus amigos Cardoso, Carlos, Carolina, Débora, Erika, Diana, Heidy, Maria, Maria Alejandra, Oscar, Samanta, Ximena e Zulma pelo amor, carinho e incentivo em todo momento mesmo estando longe.

Ao Rodrigo, por todo seu amor, paciência, carinho, companheirismo, incentivo, amor, força e a sua família, pelo acolhida e carinho.

Ao apoiadora Caroleneche de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

- Conselho de Fomento de Inovação

A Deus ofereço;

Aos meus pais Deyanira e William, família e amigos dedico com todo meu amor.

E a todos que colaboraram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização desse curso.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e Departamento de Tecnologia de Alimentos e seus colaboradores pela minha formação e pelo apoio.

Ao professor Wilmer Edgard, pelos ensinamentos, orientação, incentivo, oportunidades concedidas, amizade, paciência e conselho nos momentos difíceis durante a formação acadêmica e pessoal.

Aos membros do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA), amigos e colegas pós-graduandos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. A minhas estagiárias Andressa, Estefânia e Beatriz pelo apoio, generosa colaboração, disposição, concessão de espaços, materiais e momentos compartilhados.

Aos meus pais Deyanira e William por sempre serem meu porto seguro, pelo amor, carinho, apoio e compreensão, a minhas tias Edith e Fanny por serem minhas segundas mães, pelo amor, compreensão, palavras de ânimo e apoio incondicional, a minha prima Diana pelo amor, carinho, compreensão e motivação sempre.

Aos meus amigos Cardozo, Carlos, Carolina, Débora, Erika, Ginna, Heidy, María, María Alejandra, Oscar, Samanta, Ximena e Zulma pelo amor, carinho e incentivo em todo momento mesmo estando longe.

Ao Rodrigo, por todo seu amor, paciência, carinho, companheirismo, incentivo nesta etapa e a sua família, pela acolhida e carinho.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

E a todos que colaboraram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

RESUMO

RODRIGUEZ, Angie Dahiana Duque, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2023. **Bactérias formadoras de esporos em sobremesas lácteas e queijo petit suisse: ocorrência e modelagem da formação de biofilmes multi-espécies.** Orientador: Wilmer Edgard Luera Pena.

As sobremesas lácteas são produtos refrigerados e, amplamente comercializados e consumidos devido às suas características nutricionais, praticidade e apelo sensorial. A sua deterioração está relacionada a alterações na textura, odor e produção de sabores indesejáveis causados por bactérias formadoras de esporos e outras bactérias termodúricas que produzem enzimas termoestáveis causadoras de deterioração. Por outro lado, a capacidade de formação de biofilmes por bactérias formadoras de esporos e termodúricas, nas superfícies dos equipamentos durante as etapas de processamento dos produtos lácteos, pode provocar contaminação cruzada, deterioração dos produtos finais em curto tempo ou antes de atingir sua vida útil. Além disso, as falhas nos procedimentos de limpeza e sanitização dos equipamentos podem favorecer o desenvolvimento de biofilmes. Portanto, evitar sua formação e garantir sua eliminação têm se tornado um desafio constante na indústria de laticínios e de alimentos em geral. Deste modo, esta pesquisa teve como objetivos determinar a ocorrência de bactérias formadoras de esporos em dois tipos de sobremesas lácteas e queijos petit suisse, que foram submetidos a altas temperaturas para induzir a germinação de esporos bacterianos. Também foram avaliadas a capacidade de crescimento de células vegetativas em diferentes condições, bem como a síntese de enzimas proteolíticas e suas taxas de multiplicação. Por fim, foram determinados os tempos nos quais as principais bactérias isoladas foram capazes de formar biofilmes multi-espécies em cupons de aço inoxidável, quando incubados a 6, 15, 25 e 32 °C durante 24, 48, 72, 96 e 120 h. Os resultados indicaram uma maior ocorrência de bactérias mesófilas aeróbias com maior atividade proteolítica e lipolítica, além de uma maior taxa de crescimento. Doze isolados apresentaram alta capacidade de síntese de enzimas e taxa de crescimento. Esses isolados foram identificados geneticamente como *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. tequilensis*, *Bacillus* spp. e *B. parabrevis*. Por outro lado, em relação à capacidade de formação de biofilmes multi-espécies pelas espécies supracitadas, foram consideradas como biofilmes quando as contagens foram maiores que 5,0 log UFC.cm⁻² e os dados foram transformados para forma binária e utilizados para desenvolvimento de modelos probabilísticos de regressão logística. O programa estatístico Minitab v.12.1, foi utilizado. O

desempenho de cada modelo foi avaliado pelo índice estatístico de Nagelkerke R^2 , pela porcentagem (%) de dados corretos e pelo índice estatístico de Hosmer-Lemeshow. Destaca-se que os biofilmes formados na temperatura de incubação de 32 °C foram mais robustos, seguidos pelos biofilmes formados à temperatura de 25 °C, ao contrário do que foi observado à temperatura de 6 °C. Também foi evidenciado que o mix bacteriano 2 (formado por *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *Bacillus* spp. isolados de sobremesa láctea Queijo Petit Suisse com Preparado de Frutas) teve maior probabilidade de formação de biofilme em menor tempo. Além disso, foi demonstrado que superfícies de aço inoxidável permitem a adesão bacteriana e, conseqüentemente, a formação de biofilmes multiespécies. Esses resultados reforçam a necessidade de medidas de controle contra bactérias aeróbias mesófilas formadoras de esporos ou termodúricas, para garantir a qualidade microbiológica durante toda a cadeia de produção, diminuição das perdas de produção, controle da vida útil estabelecida, evitar danos à reputação da marca e perdas de vendas. Os resultados permitiram determinar fatores fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de controle de biofilmes multiespécies e o estabelecimento de protocolos de sanitização mais eficientes.

Palavras-chave: Derivados lácteos, Bactérias deteriorantes, Atividade enzimática, Biofilmes multiespécies, Microbiologia preditiva.

ABSTRACT

RODRIGUEZ, Angie Dahiana Duque, D.Sc., Federal University of Viçosa, December 2023. **Spore-forming bacteria in dairy desserts and petit suisse cheese: occurrence and modeling of multispecies biofilm formation.** Advisor: Wilmer Edgard Luera Pena.

Dairy desserts are refrigerated products sold commercially and widely consumed due to their nutritional characteristics, convenience, and sensory appeal. Their deterioration is related to changes in texture, odor, and the production of undesirable flavors caused by spore-forming bacteria and other thermotolerant bacteria that produce heat-stable spoilage enzymes. Additionally, the ability of spore-forming and thermotolerant bacteria to form multispecies biofilms on equipment surfaces during milk processing and/or dairy derivatives production can lead to cross-contamination, rapid product deterioration, and spoilage before reaching their expiration date. Moreover, the presence of biofilms can compromise cleaning and sanitization procedures. Therefore, preventing biofilm formation and achieving their elimination have become ongoing challenges in the dairy and food industry. Thus, this research aimed to determine the presence of spore-forming bacteria in two types of dairy desserts and queijos petit suisse, which were subjected to thermal shock to induce bacterial spore germination. The study also evaluated the growth capacity of vegetative cells under different conditions, as well as the synthesis of proteolytic enzymes and their multiplication rates. Finally, the study determined the time intervals in which the main isolated bacteria were capable of forming multispecies biofilms on stainless steel coupons when incubated at 6, 15, 25, and 32 °C for 24, 48, 72, 96, and 120 h. The results indicated a higher occurrence of mesophilic aerobic bacteria with increased proteolytic and lipolytic activity, along with a higher growth rate. Twelve isolates, demonstrating superior enzyme synthesis capacity and growth rate. These isolates were genetically identified as *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. tequilensis*, *Bacillus* spp., *B. parabrevis*, *S. marcescens*, *E. xiangfangensis*, and *Enterobacter* spp. Regarding the formation capacity of multispecies biofilms by the aforementioned species, bacterial counts were considered as microbial biofilms when exceeding 5.0 log CFU.cm⁻², and the data were transformed into binary form for the development of logistic regression models. The models were adjusted to the data from the three co-cultures using the statistical software Minitab v.12.1. Subsequently, the performance of each model was evaluated based on the Nagelkerke R² statistic, percentage (%) of correct data, and the Hosmer-Lemeshow statistic. It is noteworthy

that biofilms formed at an incubation temperature of 32 °C were more robust, followed by the temperature of 25 °C, in contrast to the observations at 6 °C. It was also evident that bacterial mix 2 (formed by *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. cereus* and *Bacillus* spp. isolated from dairy dessert Petit Suisse Cheese with Fruit Preparation) had a higher probability of forming biofilms in a shorter time. Additionally, it was demonstrated that stainless steel is a type of surface that favors bacterial adhesion and, consequently, the formation of multispecies biofilms. These results reinforce the need for control measures against mesophilic aerobic spore-forming or thermotolerant bacteria to ensure microbiological quality throughout the production chain, reduce production losses, control established shelf life, prevent damage to brand reputation, and minimize sales losses. These challenges continue to be faced by the Brazilian dairy industry. The results allowed for the determination of fundamental factors for the development of strategies to control multispecies biofilms and the establishment of more efficient sanitization protocols in terms of time.

Key words: Dairy derivatives, Spoilage bacteria, Thermotolerant bacteria, Proteolytic activity, Lipolytic activity, Thermostable enzymes, Bacterial biofilms, Predict microbiology.

CAPÍTULO I	37
OCCURRENCE OF SPORE-FORMING BACTERIAL IN BRAZILIAN DAIRY DESSERTS	37
Artigo aceite para publicação pelo Journal Cuiabano Pedagógico em 21 de novembro de 2021	37
Abstract	37
1. Introduction	38
2. Methods	39
2.1 Selection of dairy desserts	39
2.2 Detection of spore-forming bacteria in dairy desserts	40
2.2.1 Enrichment of samples	40
2.2.2 Inoculation	41
2.2.3 Selection of isolates	41
2.3 Evaluation of proteolytic activity	41
2.4 Determination of the multiplication rate	42
2.5 Evaluation of lipolytic and catalase activity	42
2.6 Genetic identification of isolates	43
3. Results and discussion	43

SUMÁRIO

3.1 The pH and Aw of the samples	43
3.2 Evaluation of the occurrence of spore-forming bacteria in dairy desserts	44
3.3 Proteolytic activity	47
3.4 Growth kinetics and genetic identification	48
INTRODUÇÃO GERAL	13
1. REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 O mercado do leite e produtos lácteos no Brasil	15
1.2 Contaminação em leite e produtos lácteos	16
1.3 Bactérias formadoras de esporos	17
1.4 <i>Bacillus cereus</i> em produtos lácteos	19
1.5 Importância do controle de bactérias formadoras de esporos	21
1.6 Biofilmes na indústria de produtos lácteos	21
1.7 Microbiologia Preditiva	23
Referências	24
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo geral	36
2.2. Objetivos específicos	36
CAPÍTULO I	37
OCCURRENCE OF SPORE-FORMING BACTERIAL IN BRAZILIAN DAIRY DESSERTS	37
<i>Artigo aceito para publicação pelo Journal Caderno Pedagógico em 21 de novembro de 2023</i>	37
Abstract	37
1. Introduction	38
2. Methods	39
2.1 Selection of dairy desserts	39
2.2 Detection of spore-forming bacteria in dairy desserts	40
2.2.1 Enrichment of samples	40
2.2.2 Isolation	41
2.2.3 Selection of isolates	41
2.3 Evaluation of proteolytic activity	41
2.4. Determination of the multiplication rate	42
2.5 Evaluation of lipolytic and catalase activity	42
2.6 Genetic identification of isolates	43
3. Results and discussion	43

3.1 The pH and Aw of the samples	43
3.2 Evaluation of the occurrence of spore-forming bacteria in dairy desserts	44
3.3 Proteolytic activity	47
3.4 Growth kinetics and genetic identification	48
4. Conclusions	52
Acknowledgments:	53
Conflicts of interest/Competing interests:	53
References	53
CAPÍTULO II	57
MODELAGEM DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES POR BACTÉRIAS FORMADORAS DE ESPOROS	57
Resumo	57
1. Introdução	58
2. Metodologia	59
2.1 Avaliação da formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável	60
2.1.1 Preparo e padronização dos microrganismos	60
2.1.2 Preparo dos inóculos formados por múltiplas espécies	60
2.1.3 Preparo e limpeza dos cupons de aço inoxidável	61
2.2 Determinação da formação de biofilmes multiespécies	61
2.3 Desenvolvimento de modelos para prever a formação de biofilmes multiespécies	62
2.4 Análises experimentais do desempenho dos modelos preditivos desenvolvidos	63
3. Resultados e discussão	63
3.1. Formação de biofilme multiespécies	63
3.2 Modelos probabilísticos de regressão logística	69
3.2.1 Desenvolvimento da modelagem probabilística	70
3.3 Validação dos modelos desenvolvidos	74
4. Conclusões	75
5. Referências	76
CONCLUSÃO GERAL	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Samples that presented microbial growth under different incubation conditions following heat shock and enrichment stage.....	44
Table 2. Isolates obtained from different types of dairy desserts evaluated according to their growth conditions.	46
Table 3. Characterization of the proteolytic activity of isolates from the three types of dairy desserts according to their growth conditions.	47
Table 4. General characterization and taxonomic affiliation of isolates from dairy desserts obtained by comparative analysis of 16S rRNA gene sequences.....	49

CAPÍTULO II

Tabela 1. Resposta de formação de biofilme das três co-culturas de avaliadas em função do tempo e temperatura.	69
Tabela 2. Coeficientes dos modelos probabilísticos para as três co-culturas bacterianas estudadas.....	70
Tabela 3. Parâmetros estatísticos para os modelos implementados.	71

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Biofilme multiespécie formado por *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. parabrevis* em co-cultura incubada a 30 °C durante 24 h (A) e durante 46 h a diferentes aumentos 2,0 e 10,0 K X, respectivamente (B e C). 66
- Figura 2:** Biofilme multiespécie formado por *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, e *Bacillus sp.* em co-cultura incubada a 30 °C durante 24 h (A) e durante 46 h a diferentes aumentos 2,0 e 10,0 K X, respectivamente (B e C)..... 66
- Figura 3.** Biofilme multiespécie formado por *B. tequilensis*, *B. subtilis* e *Bacillus sp.* em co-cultura incubada a 30 °C durante 24 h (A) e durante 46 h a diferentes aumentos 2,0 e 10,0 K X, respectivamente (B e C). 67
- Figura 4.** Probabilidades de formação de biofilmes pelas co-cultura 1, 2 e 3 em 120 h, preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística gerado pelas Equações 3, 4 e 5, respetivamente. **CC1:** Co-cultura 1. **CC2:** Co-cultura 2. **CC3:** Co-cultura 3. 72

Sub-cultura perspicua a deterioração das sementes lacteos está relacionada a alterações na textura, sabor e odor causadas pelo desenvolvimento de lezírias formadoras de esporos, microorganismos que estão amplamente distribuídos na natureza, em diferentes tipos de alimentos, em ambientes e linhas de processamento. No entanto, outras bactérias são esporulantes, como as fermentadoras, também podem causar a deterioração dos ingredientes ou mesmo do produto processado, produzindo enzimas proteolíticas e lipolíticas resistentes ao calor que afetam a qualidade do produto final (ANDRÉ et al., 2017; MACHADO et al., 2017).

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, *Clostridium*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* são os principais microorganismos formadores de esporos presentes em produtos lácteos. Uma vez que, podem sobreviver em ambientes adversos por longo período de tempo, pois são resistentes a tratamentos térmicos ou não térmicos como ultrassom, produtos químicos e condições de refrigeração (ANDRÉ et al., 2017; ORTUZAR et al., 2019; DULA et al., 2021). Em condições favoráveis ou após receberem algum estímulo externo, os esporos produzem células vegetativas capazes de se multiplicar e sintetizar enzimas proteolíticas e lipolíticas resistentes (ANDRÉ et al., 2017; ORTUZAR et al., 2019). Além disso, tanto os esporos como as células vegetativas são capazes de formar biofilmes.

INTRODUÇÃO GERAL

As sobremesas lácteas compreendem um amplo grupo de produtos que, de acordo com o *Codex Alimentarius* e a legislação brasileira, estão compostas por ingredientes de origem láctea, fontes naturais de cálcio, potássio, vitamina A e manganês, bem como ingredientes não lácteos como sacarose, frutas, polpa de frutas, geleias, cacau em pó, baunilha, agentes gelificantes, espessantes, conservantes, entre outros. Conformam um conjunto diversificado de produtos prontos para consumo, que podem ser apresentados como sobremesas cremosas e gelificadas, cremes e, ou pudins, sobremesas carbonatadas (mousses), cheesecakes, flans, entre outros e, que são comercializados refrigerados, congelados e enlatados (NIKAEDO et al., 2004; SAUNDERS, 2016, MAPA 2020). Destacam-se por ser produtos amplamente conhecidos e consumidos em todo o mundo devido às suas características nutricionais, praticidade e apelo sensorial. Segundo o relatório de pesquisa sobre o mercado de sobremesas lácteas, estima-se um crescimento anual de 4,30 % de 2022 a 2030, alcançando um aumento de US\$ 1,7 bilhão em vendas até o final de 2030 (MARKET RESEARCH FUTURE DAIRY DESSERTS MARKET, 2022).

Sob outra perspectiva, a deterioração das sobremesas lácteas está relacionada a alterações na textura, sabor e odor causadas pelo desenvolvimento de bactérias formadoras de esporos, microrganismos que estão amplamente distribuídos na natureza, em diferentes tipos de alimentos, em ambientes e linhas de processamento. No entanto, outras bactérias não esporulantes, como as termodúricas, também podem causar a deterioração dos ingredientes ou mesmo do produto processado, produzindo enzimas proteolíticas e lipolíticas resistentes ao calor que afetam a qualidade do produto final (ANDRÉ et al., 2017; MACHADO et al., 2017).

As espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Anoxybacillus* e *Paenibacillus* são os principais microrganismos formadores de esporos presentes em produtos lácteos. Uma vez que, podem sobreviver em ambientes adversos por longos períodos de tempo, pois são resistentes a tratamentos térmicos ou não térmicos como ultrassom, produtos químicos e condições de refrigeração (ANDRÉ et al., 2017; ORTUZAR et al., 2018; DULA et al., 2021). Em condições favoráveis ou após receberem algum estímulo extrínseco, os esporos produzem células vegetativas capazes de se multiplicar e sintetizar enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis (ANDRÉ et al., 2017; ORTUZAR et al., 2018). Além disso, tanto os esporos como as células vegetativas são capazes de formar biofilmes,

populações ou comunidades celulares que lhes conferem maior resistência a diferentes fatores ambientais, físicos e químicos (POSTOLLEC et al., 2010; DULA et al., 2021).

Entre os microrganismos que podem formar biofilmes, encontram-se bactérias psicrofílicas, mesófilas, termófilas, psicrotróficas e termodúricas com a capacidade de formar esporos (DE OLIVEIRA et al., 2013; COUGHLAN et al., 2016; WANG et al., 2021), pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus* e *Enterobacter* e, que como supracitado anteriormente, tem a capacidade de causar deterioração devido sua capacidade de sintetizar enzimas termoestáveis e reduzir a vida de prateleira (*shelf-life*) matérias-primas e produtos finais.

A contaminação de diferentes produtos lácteos (leite pasteurizado, leite UHT, leite desnatado, leites saborizados, leite em pó, queijos, requeijão, entre outros) por bactérias formadoras de esporos e termodúricas está bem documentado na literatura (ALONSO et al., 2021; ANDRÉ et al., 2017; LUCKING et al., 2013; MACHADO et al., 2017; MOSCHONAS et al., 2021; PENA et al., 2014; QUIGLEY et al., 2013; SADIQ et al., 2016; SADIQ et al., 2018; WANG et al., 2021), mas o estudo dos microrganismos formadores de esporos e, ou termodúricos isolados de sobremesas lácteas e, a formação de biofilmes multiespécies ainda não é bem compreendido, como é demonstrado pelos estudos de André et al., (2017), Ortuzar et al., (2018) e Techer et al., (2020), assim como, a implementação de modelos preditivos que descrevam a capacidade de formação de biofilmes multiespécies por estas bactérias.

Igualmente, é importante ressaltar que tanto a presença de bactérias formadoras de esporos em sobremesas lácteas, ou em outros tipos de produtos lácteos, pode representar um risco para a saúde por diferentes motivos, pois, várias bactérias patogênicas, como *B. cereus*, têm sido implicadas em doenças relacionadas a produtos lácteos. Embora tenha havido relativamente poucos surtos ligados a sobremesas lácteas em todo o mundo, o risco de contaminação não deve ser subestimado (DAIRYSAFE, 2019). De acordo com um estudo de 2019 realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (MS & ANVISA), no Brasil, duas em cada cinco amostras de sobremesas lácteas analisadas não atenderam aos padrões microbiológicos estabelecidos.

Dessa forma, os objetivos deste estudo foram avaliar a ocorrência de bactérias formadoras de esporos em dois tipos diferentes de sobremesas lácteas e queijos petit suisse produzidos no Brasil, avaliar a sínteses de enzimas lipolíticas e proteolíticas responsáveis por causar deterioração. Assim como, determinar a capacidade de formar biofilmes multiespécies entres as principais espécies identificadas e, finalmente realizar o desenvolvimento de modelos

probabilísticos que possam fornecer informações relevantes que contribuam na implementação de estratégias de controle eficazes na ocorrência destes microrganismos na indústria de produtos lácteos e indústria de alimentos em geral.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O mercado do leite e produtos lácteos no Brasil

Em muitos países, a obtenção de leite e a fabricação de produtos lácteos é um dos setores mais importantes da indústria de alimentos. Em geral, sua importância pode ser observada no âmbito produtivo e econômico nos países considerados em desenvolvimento, já que aproximadamente 150 milhões de pequenos produtores em todo o mundo estão envolvidos e segundo a *Food and Agriculture Organization – FAO* (2018), nas últimas três décadas, a produção mundial de leite aumentou mais de 50 %, chegando a 769 milhões de toneladas em 2013. Internacionalmente, o Brasil se caracteriza por ser um produtor de leite em grande escala, sendo uma de suas principais atividades econômicas. Durante os últimos anos tem ocupado os primeiros lugares no ranking mundial de produção de leite, sendo atualmente o terceiro maior produtor mundial de leite, com mais de 34 bilhões de litros por ano (MAPA, 2023). No 2022, foram produzidos mais de 36,600 bilhões de litros de leite (IBGE, 2023), contribuindo assim desde o ano 2013 com mais de 5,3 % da produção mundial de leite (FAO, 2013).

O Brasil exportou no ano 2021 aproximadamente 142 milhões de litros de leite (EMBRAPA, 2022) e aproximadamente 98 milhões de dólares em produtos lácteos, valor que aumento no ano de 2022 a 102 milhões de dólares. Os principais produtos exportados foram queijos, leite em pó integral, leite condensado, creme de leite, manteiga, leite modificado e leite fluido (ETENE, 2023). De acordo com a Aliança Láctea Sul Brasileira, nos próximos anos o Brasil deve passar a exportar 5 % do volume de seus produtos lácteos, mas para melhorar sua competitividade em nível internacional é necessário se credenciar por meio da implementação de um programa de qualidade que tenha validade internacional (MILKPOINT, 2018), e assim obter o registro dos produtos em entidades de controle e regulação internacional como a FDA (*Food and Drug Administration*), USDA (*United States Department of Agriculture*) e APHIS (*The Animal and Plant Health Inspection Service*). Segundo os padrões impostos pelas entidades de normatização internacional, atingir os níveis exigidos de qualidade e inocuidade microbiológica é o principal desafio a ser superado pela indústria de laticínios brasileira, e assim

assegurar uma maior inserção no mercado internacional (MILKPOINT, 2015; EMBRAPA, 2022). Esse desafio só pode ser superado por meio do trabalho conjunto da indústria, governo e instituições de desenvolvimento científico.

1.2 Contaminação em leite e produtos lácteos

O leite é constituído por água, proteínas, açúcares, lipídios, vitaminas e sais minerais (PEREIRA, 2014) e sua composição pode variar de acordo com fatores como espécie e raça do animal, sistema de alimentação, estágio de lactação, frequência da ordenha, sistema de ordenha e sanidade (LINDMARK-MÅNSSON et al., 2003; KALAČ e SAMKOVÁ, 2010). Por ser um alimento rico em nutrientes, é suscetível a microrganismos deterioradores e patogênicos, os quais provocam sua degradação desde o momento de sua obtenção. Por conseguinte, a obtenção do leite e de derivados lácteos de alta qualidade microbiológica depende das boas práticas de fabricação implementadas em todas as etapas da cadeia produtiva (MENEZES et al., 2014). A contaminação microbiana do leite, especificamente por microrganismos formadores de esporos, pode ter origem no local de ordenha, já que os esporos podem ser encontrados em diferentes ambientes, incluindo solo, água, sedimentos, silagem, materiais de cama ou fezes de animais infectados (LINDSTRÖM et al., 2010; VACHEYROU et al., 2011; DRIEHUIS, 2013).

A fonte primária de esporos no ambiente da fazenda é o solo, e estes podem ser transferidos para o leite por diferentes vias que podem ser diretas e, ou indiretas. Uma via direta de contaminação é a partir do úbere contaminado de animais lactantes durante a ordenha. Entre as vias indiretas podem estar: i) uso de plantas contaminadas com solo para a produção de silagem e alimentação animal; ii) os esporos ingeridos na silagem sobrevivem à passagem pelo trato gastrointestinal de animais leiteiros e são eliminados nas fezes; iii) os esporos eliminados nas fezes contaminam os materiais de cama onde os animais são alojados; iv) os esporos presentes nos materiais de cama podem aderir-se ao úbere e às tetas dos animais e contaminar o leite durante o processo de ordenha (HEYNDRICKX, 2011; DRIEHUIS, 2013). Da mesma forma, processos deficientes de higienização do úbere de animais em lactação expõem o leite à contaminação por esporos, já que estes não seriam completamente removidos da pele com a implementação de qualquer rotina de limpeza das tetas (MAGNUSSON et al., 2006). Do mesmo modo, a sanitização ineficiente dos equipamentos de ordenha representa outra via possível de contaminação, pois tem sido demonstrado que esses microrganismos são capazes de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável (MICHEL et al., 2001; VERDIER-METZ

et al; 2009; SIMÕES et al., 2010; MALLET et al., 2012). Analogamente, o leite residual remanescente no sistema de armazenamento e tubulação do equipamento de ordenha pode favorecer a formação de biofilme, estrutura que protege as bactérias da temperatura e do processo de sanitização, tornando-as mais resistentes aos agentes de limpeza e outras substâncias antimicrobianas (PENG et al., 2001), além de permitir sua posterior liberação no leite (WIJMAN et al., 2007). A contaminação microbiana dos derivados lácteos pode ocorrer durante as diferentes etapas do processamento e ocorre por meio de manipulação inadequada da matéria-prima, processos deficientes de higienização e, ou sanitização das áreas de processamento e, ou equipamentos e condições inapropriadas de armazenamento e, ou transporte (QUIGLEY et al., 2013; VITHANAGE et al., 2016). Portanto, na indústria de laticínios, como em outros tipos de indústrias de alimentos, existem diferentes desafios para manter a qualidade tanto da matéria prima como a manutenção da qualidade do produto final, desde a produção até a aquisição pelo consumidor, já que as fontes de contaminação são múltiplas e o alimento pode ser contaminado com uma ampla gama de agentes biológicos (microrganismos patogênicos e, ou deterioradores), físicos e, ou químicos.

1.3 Bactérias formadoras de esporos

As bactérias formadoras de esporos são Gram positivas, com baixo conteúdo de guanina e citosina e pertencentes ao filo Firmicutes. Elas podem ser subdivididas em diferentes grupos com base nas suas capacidades metabólicas (podem ou não utilizar oxigênio como um aceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, de acordo com a fonte de carbono e fonte de energia que utilizam) e, ou por crescer em diferentes temperaturas (DOYLE et al., 2015). Os esporos são células dormentes, e altamente resistentes e consistem de uma estratégia de sobrevivência adotada pelas bactérias quando se encontram em um ambiente hostil ou submetidas a condições ambientais adversas como a restrição de nutrientes, alta pressão osmótica, variações extremas de temperatura, desidratação, radiação ultravioleta e presença de agentes químicos (NICHOLSON et al., 2000). Quando as condições ambientais voltam a ser favoráveis para restabelecer o crescimento, os esporos germinam, restaurando o crescimento vegetativo, ainda que tenham transcorrido longos períodos de tempo, já que podem manter um estado metabólico inativo mesmo durante séculos (RUSSEL, 1990). A capacidade de algumas espécies bacterianas para formar esporos é uma preocupação para a indústria de alimentos, já que estão presentes em diferentes estágios ao longo da cadeia de produção de laticínios

(SPANU, 2016). A alta resistência térmica das bactérias formadoras de esporos representa uma preocupação para a manutenção da qualidade dos alimentos tanto como para a segurança alimentar (HANSON et al., 2005; SPANU, 2016), mesmo que o produto tenha sido submetido a tratamentos térmicos como a pasteurização e, ou termização. Este último por ser um tratamento térmico moderado (65 °C / 15 s) pode provocar contaminação uma vez que pode ativar a germinação dos esporos. Devido a isso, as bactérias formadoras de esporos termófilas e psicrotróficas são de particular interesse para a indústria de alimentos, uma vez que têm a capacidade tanto de sobreviver à exposição dos tratamentos térmicos (microrganismos termodúricos), como também a capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (GLEESON et al., 2013; DOYLE et al., 2015). Estas posteriormente podem causar intoxicações pela produção de toxinas ou limitar a vida útil tanto do leite pasteurizado como de diversos produtos lácteos pela produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas. Esses tipos de microrganismos têm sido considerados um problema particular para a indústria de laticínios, sendo diferentes espécies pertencentes ao gênero aeróbio de *Bacillus* e do gênero anaeróbio *Clostridium* os que se destacam com maior frequência no leite e em diversos produtos lácteos (DOYLE et al., 2015).

As bactérias aeróbias formadoras de esporos que se encontram principalmente relacionadas a produtos lácteos são pertencentes aos gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus*. As diferentes espécies de *Paenibacillus* spp. se caracterizam por ser um grupo de bacilos aeróbicos e são geralmente responsáveis pela deterioração de produtos lácteos, principalmente do leite que é armazenado por mais de 10 dias. Em estudos desenvolvidos sobre o estudo da microbiota presente no leite após refrigeração prolongada, este gênero compreende mais de 95 % da população bacteriana presente nas amostras analisadas (RANIERI et al., 2009, 2012). Em relação às diferentes espécies do grupo Bacilos, *B. cereus* é um dos mais importantes patógenos esporulados veiculados por alimentos encontrados no leite e em outros produtos lácteos. Várias estirpes deste microrganismo são capazes de produzir toxinas e causar dois tipos de intoxicação alimentar, emética e diarreica. A toxina diarreica é produzida como consequência da germinação e crescimento dos esporos no intestino delgado, enquanto a toxina emética é produzida ou pré-formada pelas células vegetativas que crescem no leite durante seu pré-tratamento térmico (KRAMER e GILBERT, 1989). Algumas espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* e outros gêneros formadores de esporos são anaeróbios facultativos, grupo no qual encontram-se os contaminantes mais comumente isolados na indústria de laticínios

Amoxybacillus flavithermus (microrganismo termófilo) e *Bacillus licheniformis* (microrganismo mesófilico) (BURGESS et al., 2010).

Outra espécie aeróbia formadora de esporos de importância para a indústria de laticínios é *Geobacillus stearothermophilus* (anteriormente *Bacillus stearothermophilus*) e que juntamente com *Bacillus* spp. podem causar contaminação persistente a longo prazo nas instalações de processamento de laticínios devido à sua capacidade de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável nos equipamentos de processamento (BURGESS et al., 2010).

Por outro lado, os microrganismos anaeróbios formadores de esporos de interesse no setor lácteo são em sua maioria exclusivamente obrigatórios ou chamadas de bactérias anaeróbias estritas não redutoras de sulfato, as quais fazem parte do gênero *Clostridium*. Dentro do gênero *Clostridium*, um grupo de espécies, denominado *Clostridium* stricto sensu tem sido responsável tanto por causar a deterioração em alimentos como doenças veiculadas por alimentos associadas à indústria de laticínios (WIEGEL et al., 2006). A deterioração dos produtos lácteos devido a *Clostridium* spp. é causada tipicamente por *C. butyricum* e *C. tyrobutyricum*, microrganismos produtores de gases e, ou odores pútridos. Esta produção de gás durante o amadurecimento de queijos semi-duros é considerada como um defeito no produto final, mas o consumo deste tipo de produtos não tem sido relacionado com doenças humanas.

Espécies pertencentes ao gênero *Clostridium* são ubíquos como muitas outras bactérias formadoras de esporos, estando presentes no solo, em associação com endófitos fixadores de nitrogênio nos tecidos de gramíneas (MINAMISAWA et al., 2004), no trato gastrointestinal de mamíferos (BRYNESTAD e GRANUM, 2002) e em muitos outros ambientes e devido à sua ampla distribuição, juntamente com o seu potencial de deterioração e patogenicidade, fazem que seja o foco principal de diferentes pesquisas, por sua importância para a indústria de alimentos (DOYLE et al., 2015).

1.4 *Bacillus cereus* em produtos lácteos

Uma das bactérias aeróbias facultativas com maior incidência na indústria de produtos lácteos é *B. cereus*, um microrganismo móvel em forma de bastonete, gram-positiva, amplamente distribuída no ambiente e bem adaptada para viver no trato intestinal de mamíferos. *B. cereus* e outras espécies pertencentes a este gênero podem causar graves perdas econômicas na indústria de alimentos, pois podem sintetizar proteases, lipases e fosfolipases termorresistentes que causam alterações nas propriedades físico-químicas do alimento,

produzindo *off-flavors*, coagulação doce e mudanças em sua viscosidade (CHEN et al., 2003; HEYNDRICKX, 2011). Da mesma forma, algumas cepas de *B. cereus* podem variar amplamente em relação à temperatura ótima de crescimento e sobrevivência. Existem cepas que podem se multiplicar em ambientes a 8 °C ou até temperaturas de 55 °C, sendo sua temperatura ótima de crescimento em torno de 37 °C (KRAMER e GILBERT, 1989; WIJNANDS et al., 2006). Este microrganismo é frequentemente isolado de leite cru, leite pasteurizado e, ou vários produtos lácteos processados. Estudos realizados em diferentes países, como por Singh et al. (2015), evidenciaram a variação da prevalência de *B. cereus* no leite cru (9 a 30 %), leite pasteurizado (2 a 71,4 %). Em diferentes tipos de queijo, essa prevalência foi de 14, 52,9 e 17 % em queijo cheddar, paneer e pasta filata, respectivamente. Em creme, a prevalência observada esteve entre 29,41 e 48 % das amostras, enquanto a manteiga foi responsável por 65,1 %. Outros estudos realizados em sorvetes, demonstraram que *B. cereus* estava presente em 35 a 52 % (WONG et al., 1998; MESSELHÄUSSER et al., 2010), em leite em pó, produtos lácteos desidratados entre 29 a 54 % e, em iogurte e outros produtos lácteos fermentados de 2 a 17 % (WONG et al., 1998).

Apesar de ser uma bactéria frequentemente encontrada em alimentos, os surtos ocasionados por *B. cereus* representam apenas uma pequena porcentagem do total de surtos de doenças relacionadas com o consumo de alimentos contaminados (EFSA-ECDC, 2015). Surtos por *B. cereus* relacionados com produtos lácteos têm sido vinculados com o consumo de *milk shakes*, como o ocorrido em Ontário (1988), e com o consumo de leite, ocorrido em Quebec (1989). Em ambos os casos, a causa da doença foi o consumo do produto após este ter sido deixado a temperatura ambiente. Messelhäusser et al. (2014) relataram um surto causado por *B. cereus* produtor de toxina emética que ocorreu em Baviera (Alemanha) em 2007, associado ao consumo de um queijo duro. Da mesma forma, o leite pasteurizado foi responsável pela veiculação da toxina emética e pela intoxicação de 280 pessoas na Holanda (VAN NETTEN et al., 1990). Por outro lado, tem sido demonstrado que a capacidade de *B. cereus* em causar doenças também está relacionada com a cepa envolvida, sua concentração, microbiota competitiva e como o alimento é manipulado ou tratado antes de sua ingestão.

1.5 Importância do controle de bactérias formadoras de esporos

Devido à presença ubíqua das bactérias formadoras de esporos no ambiente, é quase impossível evitar a contaminação dos produtos lácteos por elas. Vários fatores contribuem para tornar o controle deste contaminante uma tarefa difícil na indústria de laticínios, já que este tipo de bactéria pode sobreviver a altas temperaturas de processamento (TE GIFFEL et al., 2002). Além disso, em circunstâncias favoráveis, os esporos podem germinar e produzir diversas substâncias e enzimas deteriorantes, que modificam as características físico-químicas tanto da matéria-prima como dos produtos finais (MC CLURE, 2006). A inativação destas bactérias formadoras de esporos é uma tarefa desafiadora devido à sua taxa de crescimento, tempo de geração, capacidade de formar biofilmes e sobrevivência de esporos sob condições extremas, como a altas temperaturas de processamento (BURGESS et al., 2009).

Os métodos tradicionalmente empregados para o controle dos microrganismos, são capazes de destruir células vegetativas e parte dos esporos presentes (DOLATOWSKI et al., 2007). Entretanto, tais métodos não destroem totalmente os esporos presentes e, ou formados quando estes tratamentos são aplicados. Os esporos que posteriormente podem germinar e causar a deterioração dos produtos finais ou sintetizar toxinas (BROWN, 2000; EVELYN e SILVA, 2018). Portanto, para minimizar perdas e melhorar a qualidade de diversos tipos de alimentos, tem-se observado um crescente interesse no uso de métodos alternativos para inativar os esporos e células vegetativas de espécies do gênero *Bacillus* (FAN et al., 2018). Tecnologias não-térmicas, como ultrassom, campo elétrico pulsado, irradiação, alta pressão hidrostática, campo magnético pulsado e plasma, têm sido propostas como métodos de pré-tratamentos de alimentos.

1.6 Biofilmes na indústria de produtos lácteos

As bactérias podem encontrar-se na natureza de duas formas: a planctônica na forma livre, ou séssil, na forma de biofilme (FASTENBERG et al., 2016). Por muitos anos, a maioria dos estudos foram realizados em células planctônicas, pois se acreditava que esta era sua principal forma de crescimento. Ideia que foi refutada ao se demonstrar que cerca de 95 % a 99 % das células coexistem na forma de biofilmes (NIKOLAEV e PLAKUNOV; 2007; FASTENBERG et al., 2016).

Os biofilmes bacterianos permitem a sobrevivência do microrganismo, uma vez que, as interações célula a célula são inevitáveis e facilitam o estabelecimento de populações ou comunidades densas, que podem ser formados por uma ou mais espécies bacterianas. Desse modo, estas bactérias ao estarem irreversivelmente ligadas a uma superfície, estabelecem comunidades complexas com comportamento coordenado e coletivo, imersas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares de diferente composição, dependendo da espécie colonizadora e do tipo de ambiente de produção do alimento (GIAOURIS et al., 2015; MEESILP e MESIL, 2019).

Esta matriz extracelular é composta principalmente por polissacarídeos, principal componente responsável pela sua resistência a agentes químicos e físicos (O'TOOLE, 2003; COUGHLAN et al., 2016; KHAN et al., 2016; DULA et al., 2021). Essa matriz possui características físico-químicas que confere coesão à sua estrutura e capacidade de retenção de nutrientes. Além disso, há presença de enzimas extracelulares que permitem a transferência de moléculas sinalizadoras de comunicação celular (FLEMMING et al., 2016; ZHAO et al., 2017).

Os biofilmes, podem se formar em ambientes da indústria de laticínios, pois além de, proporcionar condições ideais para o crescimento bacteriano, também, possibilitam o desenvolvimento das primeiras etapas para a ocorrência da adesão celular (acondicionamento da superfície do material e a ligação reversível das células a essa superfície), que posteriormente permitirão a ocorrência das ligações irreversíveis e, o início da formação de micro-colônias, que serão parte da estrutura tridimensional e que finalmente, permitirá a dispersão celular (COUGHLAN et al., 2016; GALIE et al., 2018).

Por outro lado, a formação de biofilmes multiespécies além de ser altamente dinâmica, depende das características intrínsecas dos microrganismos, com as genéticas, fisiológicas, estruturais, composição molecular, fase de crescimento, idade, presença de flagelos, pili, cápsula e capacidade de comunicação celular (*quorum sensing*) (FLEMMING et., 2016). Assim como as características ou condições extrínsecas, como tipo e as características da superfície de fixação (TANG et al., 2011), componentes da matriz alimentar, pH, disponibilidade de nutrientes e proteínas, temperatura, dinâmica de fluidos, entre outros fatores (ALLEN et al., 2018; CAMPOCCIA et al., 2013; FLEMMING et., 2016).

Do mesmo modo, quando está formado por múltiplas espécies tem diversas vantagens ecológicas no ambiente da indústria de alimentos, pois além de, facilitar sua multiplicação, permanência e sobrevivência, também lhes confere maior resistência a diversas condições extrínsecas, como resistência física (a altas temperaturas e, ou dessecação), resistência

mecânica (a correntes líquidas em tubulações e, ou dutos), proteção química (a compostos orgânicos, antimicrobianos, químicos, sanitizantes, entre outros, utilizados no processamento de alimentos (COUGHLAN et al., 2016; FLEMMING et al., 2016; GIAOURIS et al., 2015; YUAN et al., 2020).

Por outro lado, a formação de biofilmes multiespécies além de ser altamente dinâmica, depende das características intrínsecas dos microrganismos, como são as genéticas, fisiológicas, estruturais, composição molecular, fase de crescimento, idade, presença de flagelos, pili, cápsula e capacidade de comunicação (*quorum sensing*) (FLEMMING et., 2016). Como das características ou condições extrínsecas, como tipo e características da superfície de fixação (TANG et al., 2011), componentes da matriz alimentar, pH, disponibilidade de nutrientes e proteínas, temperatura, entre outros fatores (CAMPOCCIA et al., 2013; FLEMMING et., 2016; ALLEN et al., 2018).

Consequentemente, são responsáveis por ocasionar problemas na indústria de produtos lácteos 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). Ocasionalmente assim, perdas econômicas, comprometimento da segurança alimentar e aumento do risco de problemas de saúde pública (ABDALLAH et al., 2014).

1.7 Microbiologia Preditiva

A microbiologia preditiva é uma ferramenta que permite avaliar e prever os riscos na indústria de alimentos. Atualmente, é amplamente utilizada na área da qualidade e segurança de alimentos. Por meio de seu uso, o monitoramento da qualidade tem se tornado mais simples e rápido, possibilitando assim, avaliar ou determinar o risco microbiológico durante as diferentes etapas do processamento de alimentos, o desenvolvimento de novos produtos, a determinação da vida de prateleira, determinar o crescimento não crescimento, desenvolvimento de biofilmes, entre outros (MATAR et al., 2018; PAVLIDIS, MALLOUCHOS e NYCHAS, 2021; DA SILVA et al., 2022; HUANG e HWANG, 2022).

Fundamenta-se no uso de expressões matemáticas que permitem descrever o comportamento ou resposta dos microrganismos (multiplicação, inibição ou morte celular) quando são submetidos a fatores intrínsecos e extrínsecos. Sendo assim, a microbiologia preditiva está relacionada à quantificação de respostas microbianas ao ambiente, como taxa específica de crescimento, taxa de morte ou a probabilidade de crescimento (SCHAFFNER e LABUZA, 1997). Atualmente, é um mecanismo para simular o crescimento microbiano, pois,

pode descrever o crescimento microbiano durante três fases, a lag, exponencial e estacionária, principalmente. Tudo isso, empregando diferentes modelos que geralmente se encontram divididos em três categorias: 1) modelos primários, que são usados para descrever o processo de crescimento microbiano ao longo do tempo em um ambiente constante; 2) modelos secundários, que simulam os efeitos das condições ambientais sobre os parâmetros cinéticos do modelo primário; e 3) modelos terciários, que combinam modelos primários e secundários para descrever o processo de crescimento de diversos microrganismos em ambientes dinâmicos (YUE et al., 2011; HUANG, 2017).

Entre os modelos matemáticos, destaca-se a modelagem probabilística, já que, permitem elucidar a ocorrência de determinada circunstância por meio do cálculo de probabilidade e não a velocidade com a que isso pode acontecer. Particularmente, os modelos de regressão logística, são amplamente utilizados na avaliação de risco, pois permitem gerar informações sobre o crescimento/não crescimento, determinar as condições ótimas e, ou limitantes de crescimento, estimar o risco de adesão ou formação de biofilmes de determinado microrganismo quando submetido a diversas condições como são o pH e, temperatura e tempo de incubação (DA SILVA et al., 2022; GARCÍA-CORTÉS et al., 2022; GONZÁLEZ et al., (2019).

Referências

ABDALLAH, Marwan et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 7, p. 453-472, 2014.

ALLEN, Ashley; HABIMANA, Olivier; CASEY, Eoin. The effects of extrinsic factors on the structural and mechanical properties of *Pseudomonas fluorescens* biofilms: A combined study of nutrient concentrations and shear conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 165, p. 127-134, 2018.

ALONSO, Vanessa Pereira Perez; DE OLIVEIRA MORAIS, Jéssica; KABUKI, Dirce Yorika. Incidence of *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans* and *Geobacillus stearothermophilus* in ultra-high temperature milk and biofilm formation capacity of isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 354, p. 109318, 2021.

- ANDRÉ, S; VALLAEYS, Tatiana; PLANCHON, Stella. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 4, p. 379-387, 2017.
- BROWN, K. L. Control of bacterial spores. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 158-171, 2000.
- BRYNESTAD, Sigrid; GRANUM, Per Einar. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 195-202, 2002.
- BURGESS, Sara A.; LINDSAY, Denise; FLINT, Steve H. *Thermophilic bacilli* and their importance in dairy processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 2, p. 215-225, 2010.
- CAMPOCCIA, Davide; MONTANARO, Lucio; ARCIOLA, Carla Renata. A review of the biomaterial's technologies for infection-resistant surfaces. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8533-8554, 2013.
- CHEN, L. D. R. M.; DANIEL, Roy M.; COOLBEAR, Tim. 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, Asma et al. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. **Dairy Science & Technology**, v. 96, p. 27-38, 2016.
- COUGHLAN, Laura M. et al. New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1641, 2016.
- DA SILVA, Mírian Pereira et al. Modelling adhesion and biofilm formation by *Bacillus cereus* isolated from dairy products as a function of pH, temperature and time. **International Dairy Journal**, v. 134, p. 105472, 2022.

DAIRY AUTHORITY OF SOUTH AUSTRALIA ('Dairysafe') – Guidelines for the Safe Manufacture of Dairy Products. The Dairy Authority of South Australia, South Australia ABN 36 767 901 242 © Government of South Australia 2019.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Dairy Production and

DE OLIVEIRA, Maíra MM; BRUGNERA, Danilo F.; PICCOLI, Roberta H. Biofilms in the dairy industries: general aspects and the use of essential oils as a new control alternative. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 390, p. 65-73, 2013.

DASTGHERI, John H. et al. Biofilms in dairy environments: Pathophysiology and

DOLATOWSKI, Zbigniew J.; STADNIK, Joanna; STASIAK, Dariusz. Applications of ultrasound in food technology. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 6, n. 3, p. 88-99, 2007.

EL-SHAMING, Hana-Quat et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews*

DOYLE, Conor J. et al. Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 77-87, 2015.

DUMAS, Sylvain et al. Biofilms in the food industry: health aspects and control

DRIEHUIS, Frank. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. **Agricultural and Food Science**, v. 22, n. 1, p. 16-34, 2013.

DAVOJA-CORTES, Andre et al. Absolute preservation indicator for the suppression of

DULA, Stanley; AJAYEOBA, Titilayo Adenike; IJABADENIYI, Oluwatosin Ademola. Bacterial biofilm formation on stainless steel in the food processing environment and its health implications. **Folia Microbiológica**, v. 66, p. 293-302, 2021.

GLAOURIS, Elythia et al. Inter- and intra-specific interactions from within biofilms of important

EFSA-ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 1, p. 162, 2015.

Journal of Food Safety and Food Quality. *Journal of Agricultural and Food*

EMBRAPA. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2022. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/67714903/setor-lacteo-deve-crescer-na-proxima-decada-mas-2022-sera-de-cautela>. Accessed 07 de November of 2023.

microbiology and related fields. *International Journal of Food*

ETENE. (Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste). 2023. https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1623/1/2023_CDS_266.pdf. Accessed 07 de November of 2023.

- FAN, Lihua et al. Synergistic inactivation and mechanism of thermal and ultrasound treatments against *Bacillus subtilis* spores. **Food Research International**, v. 116, p. 1094-1102, 2019.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Dairy Production and Products – Milk Production**. Disponível em <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/en/> Acessado em: 10 setembro 2018.
- FASTENBERG, Judd H. et al. Biofilms in chronic rhinosinusitis: Pathophysiology and therapeutic strategies. **World Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 2, n. 4, p. 219-229, 2016.
- FLEMMING, Hans-Curt et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.
- GALIE, Serena et al. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 898, 2018.
- GARCÍA-CORTÉS, Andrés et al. Absolute preservation indicator for the assessment of refrigeration performance based on dynamic temperature measurements and predictive microbiology. **Food Control**, v. 136, p. 108891, 2022.
- GIAOURIS, Efstathios et al. Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 841, 2015.
- GLEESON, David; O'CONNELL, Aine; JORDAN, Kieran. Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk-tank milk. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, p. 217-227, 2013.
- GONZÁLEZ, Salvador Cubero et al. 'MicroHibro': A software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 290, p. 226-236, 2019.

HANSON, M. L.; WENDORFF, W. L.; HOUCK, K. B. Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 7, p. 1484-1486, 2005.

HEYNDRICKX, Marc et al. The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2011, 2011.

HUANG, Lihan. IPMP Global Fit—A one-step direct data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 262, p. 38-48, 2017.

HUANG, Lihan; HWANG, Cheng-An. One-step dynamic analysis of growth kinetics of *Bacillus cereus* from spores in simulated fried rice—Model development, validation, and Marko Chain Monte Carlo simulation. **Food Microbiology**, v. 103, p. 103935, 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. 2023. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>. Accessed 07 de November of 2023.

KALÁČ, P. et al. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. **Czech Journal of Animal Science**, v. 55, n. 12, p. 521-537, 2010.

KHAN, M. S. I.; LEE, E.; KIM, Y. A submerged dielectric barrier discharge plasma inactivation mechanism of biofilms produced by *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii*, and *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 37072, 2016.

KRAMER, JOHN M. et al. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. **Foodborne Bacterial Pathogens**, v. 19, p. 21-70, 1989.

LINDSTRÖM, Miia et al. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 281-304, 2010.

LINDMARK-MÅNSSON, Helena; FONDÉN, Rangne; PETTERSSON, Hans-Erik. Composition of Swedish dairy milk. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 409-425, 2003.

LÜCKING, G; STOECKEL, M; ATAMER, Z; HINRICHS, J; EHLING-SCHULZ, M. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. **International Journal Food Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 270-279, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004>

MACHADO, Solimar G. et al. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 302, 2017.

MALLET, Adrien et al. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. **International Dairy Journal**, v. 27, n. 1-2, p. 13-21, 2012.

MAGNUSSON, M. et al. Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3866-3875, 2006.

MARKET RESEARCH FUTURE DAIRY DESSERTS MARKET. Dairy Desserts Market Research Report Information by Type and Region – Forecast till 2027. 2022 <http://www.marketresearchfuture.com/reports/dairy-desserts-market-5166>. Accessed 07 de November of 2022.

MATAR, Céline et al. Predicting shelf-life gain of fresh strawberries ‘Charlotte cv’ in modified atmosphere packaging. **Postharvest Biology and Technology**, v. 142, p. 28-38, 2018.

MC CLURE, P. J. **Spore-forming bacteria**, in: Clive de Blackburn (Ed.), Food spoilage microorganisms. Woodhead Publishing limited, Cambridge, p.579–623, 2006.

MEESILP, Nutthawut; MESIL, Nutthisha. Effect of microbial sanitizers for reducing biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel by cultivation with UHT milk. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, p. 289-296, 2019.

MENEZES, M. F. C., et al. Microbiota and conservation of milk. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental– REGET**. v. 18, Ed. Especial p. 76-89, 2014.

MESSELHÄUSSER, U. et al. Prevalence of emetic *Bacillus cereus* in different ice creams in Bavaria. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 2, p. 395-399, 2010.

MICHEL, V.; HAUWUY, A.; CHAMBA, J. F. Raw cow milk microflora: diversity and influence of conditions of production. **Lait (France)**, 2001.

MILKPOINT. Notícias Agripoint. **Qualidade do leite para a indústria de laticínios será tema de palestra do Interleite Sul 2015**. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/contato/noticias-agripoint/qualidade-do-leite-para-a-industria-de-laticinios-sera-tema-de-palestra-do-interleite-sul-2015-94848n.aspx> Acessado em: 30.08.2018.

MILKPOINT. **Aliança Láctea Sul Brasileira define plano de exportação de leite**. 2018. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/alianca-lactea-sul-brasileira-define-plano-de-exportacao-de-leite-208089/> Acessado em: 30.08.2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MAPA 2020. <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2020/07/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-72-DE-24-DE-JULHO-DE-2020-DOU-Imprensa-Nacional.pdf>. Accessed 07 de November of 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MAPA 2023. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite#:~:text=O%20Brasil%20%C3%A9%20o%20terceiro,de%204%20milh%C3%B5es%20e%20pessoas>. Accessed 07 de November of 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE MS, & AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA ANVISA. Este texto não substitui o publicado no Diário Oficial da União. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019 (Publicada no DOU n° 249, de 26 de dezembro de 2019).

MINAMISAWA, Kiwamu et al. Anaerobic nitrogen-fixing consortia consisting of clostridia isolated from gramineous plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 3096-3102, 2004.

MOSCHONAS, Galatios et al. Spoilage potential of *Bacillus subtilis* in a neutral-pH dairy dessert. **Food Microbiology**, v. 95, p. 103715, 2021.

NICHOLSON, W. L et al. Resistance of *Bacillus endospores* to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 548-572, 2000.

NIKAEDO, P. H. L; AMARAL, F. F; PENNA, A. L. B. Technological characterization of creamy chocolate milk desserts made with whey protein concentrate and mixtures of carrageenan and guar gums. **Brazilian Journal Pharmacology Science**, v. 40, p. 397-404, 2004.

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.

ORTUZAR, Juan et al. Quantifying changes in spore-forming bacteria contamination along the milk production chain from farm to packaged pasteurized milk using systematic review and meta-analysis. **Food Control**, v. 86, p. 319-331, 2018.

O'TOOLE, G. A. To Build a Biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2687– 2689, 2003.

- PAVLIDIS, Dimitrios E.; MALLOUCHOS, Athanasios; NYCHAS, George John. Microbiological assessment of aerobically stored horse fillets through predictive microbiology and metabolomic approach. **Meat Science**, v. 172, p. 108323, 2021.
- PENG, Jui-Sen; TSAI, Wei-Chong; CHOU, Cheng-Chun. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 1-2, p. 105-111, 2001.
- PENA, Wilmer Edgard Luera et al. 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.
- PEREIRA, Paula C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 619-627, 2014.
- POSTOLLEC, Florence et al. A multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 78-88, 2010.
- QUIGLEY, Lisa et al. The complex microbiota of raw milk. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013.
- RANIERI, M. L. et al. High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 10, p. 4823-4832, 2009.
- RANIERI, Matthew L. et al. Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf-life performance of pasteurized fluid milk products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5855-5863, 2012.
- RUSSELL, A. D. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 2, p. 99-119, 1990.

- SCHAFFNER, Donald W.; LABUZA, Theodore P. Predictive microbiology: where are we, and where are we going? **Food Technology (Chicago)**, v. 51, n. 4, p. 95-99, 1997.
- SADIQ, Faizan A. et al. The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 193-201, 2016.
- SADIQ, Faizan A.; FLINT, Steve; HE, GuoQing. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 159-168, 2018.
- SAUNDERS, A B. Dairy Desserts, Reference Module in Food Science, **Elsevier**. 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00831-3>.
- SILVA, Filipa VM et al. Differences in the resistance of microbial spores to thermosonication, high pressure thermal processing and thermal treatment alone. **Journal of Food Engineering**, v. 222, p. 292-297, 2018.
- SIMÕES, Manuel; SIMÕES, Lúcia C.; VIEIRA, Maria J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.
- SINGH, Vinay Kumar; SHUKLA, Sangeeta; CHATURVEDI, Anil. Study the incidence of *Bacillus cereus* isolates from dairy foods. **The Pharma Innovation**, v. 3, n. 12, Part A, p. 41, 2015.
- SPANU, Carlo. Sporeforming bacterial pathogens in ready-to-eat dairy products. In: **Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-eat Foods**. Academic Press, 2016. p. 259-273.
- TANG, L. et al. Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. **Biofouling**, v. 27, n. 1, p. 111-121, 2011.

- TECHER, Clarisse et al. Identification of the bacteria and their metabolic activities associated with the microbial spoilage of custard cream desserts. **Food Microbiology**, v. 86, p. 103317, 2020.
- TE GIFFEL, MC te et al. Bacterial spores in silage and raw milk. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 625-630, 2002.
- VACHEYROU, Mallory et al. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 253-262, 2011.
- VAN NETTEN, P. et al. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 73-79, 1990.
- VITHANAGE, Nuwan R. et al. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. **International Dairy Journal**, v. 57, p. 80-90, 2016.
- VERDIER-METZ, Isabelle et al. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 305-310, 2009.
- WANG, Ni et al. Development of multi-species biofilm formed by thermophilic bacteria on stainless steel immersed in skimmed milk. **Food Research International**, v. 150, p. 110754, 2021.
- WIEGEL, Juergen et al. An introduction to the family Clostridiaceae. **Prokaryotes**, v. 4, p. 654-678, 2006.
- WIJMAN, Janneke GE et al. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1481-1488, 2007.

WIJNANDS, L. M. et al. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 2, p. 120-128, 2006.

WONG, H. Ch; CHANG, M. H.; FAN, J. Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 699-702, 1988.

2.2. Objetivos específicos

YUAN, Lei et al. Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 13, p. 2277-2293, 2020.

YUE, Xiaoyu et al. Modeling the effect of temperature and water activity on the growth rate and lag phase of *Aspergillus flavus* during rice drying. **Drying Technology**, v. 29, n. 11, p. 1306-1312, 2011.

ZHAO, Xihong et al. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **RSC advances**, v. 7, n. 58, p. 36670-36683, 2017.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Estudar a ocorrência, multiplicação e formação de biofilmes multiespécies de bactérias formadoras de esporos isoladas de sobremesas lácteas e queijo petit suisse.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar a ocorrência de bactérias formadoras de esporos psicrófilas, mesófilas e termófilas a partir de sobremesas lácteas e queijo petit suisse;
- Determinar a produção de enzimas proteolíticas pelos isolados de maior ocorrência nas sobremesas e queijo petit suisse;
- Avaliar a capacidade de multiplicação dos isolados com maior capacidade de síntese de enzimas proteolíticas;
- Identificação genética de isolados com características mesofílicas;
- Avaliar a capacidade da formação de biofilmes multiespécies por três co-culturas de bactérias formadoras de esporos em cupons de aço inoxidável;
- Desenvolver modelos preditivos de regressão logística que permitam avaliar a formação de biofilmes multiespécies.

Abstract

Dairy desserts are commercially sold refrigerated products that are widely consumed due to their nutritional characteristics, practicality, and sensory appeal. Their deterioration is related to changes in texture, color, and the production of off-flavors caused by spore-forming bacteria and other contaminating bacteria that produce heat-stable spoilage enzymes. This study aimed

CAPÍTULO I

OCCURRENCE OF SPORE-FORMING BACTERIAL IN BRAZILIAN DAIRY DESSERTS

Artigo aceito para publicação pelo Journal Caderno Pedagógico em 21 de novembro de 2023

¹ Angie Dahiana Duque-Rodríguez, Master in Food Science and Technology. Department of Food Technology, Federal University of Viçosa, MG, Brazil. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n. University Campus, Viçosa, MG, Brazil. angieduque@gmail.com (A. D. Duque-Rodríguez). <https://orcid.org/0000-0003-1636-4602>.

² Andressa de Almeida Cordeiro. Undergraduate student in Dairy Science and Technology. Department of Food Technology, Federal University of Viçosa, MG, Brazil. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n. University Campus, Viçosa, MG, Brazil. andressa.cordeiro@ufv.br

³ Estefânia Claudia Caldeira. Undergraduate student in Dairy Science and Technology. Department of Food Technology, Federal University of Viçosa, MG, Brazil. Estefania.caldeira@ufv.br

⁴ Beatriz Rodrigues Olimpio. Undergraduate student of Chemistry. Department of Chemistry, Federal University of Viçosa, MG, Brazil. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n. University Campus, Viçosa, MG, Brazil. Beatriz.olimpio@ufv.br

⁵ Patrícia Erica Fernandes. Doctor in Food Science and Technology. Department of the Technical Course in Agroindustry, Federal Institute of Alagoas, Batalha, AL, Brazil. Rua Odilon Vasconcelos, 103, Maceió, AL, Brazil. patriciaericafe@gmail.com

⁶ Wilmer Edgar Luera Pena. Doctor in Food Science. Department of Food Technology, Federal University of Viçosa, MG, Brazil. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n. University Campus, Viçosa, MG, Brazil. wilmer.pena@ufv.br

Abstract

Dairy desserts are commercially sold refrigerated products that are widely consumed due to their nutritional characteristics, practicality, and sensory appeal. Their deterioration is related to changes in texture, odor, and the production of *off-flavors* caused by spore-forming bacteria and other contaminating bacteria that produce heat-stable spoilage enzymes. This study aimed

to determine the presence of spore-forming bacteria in three types of dairy desserts, which were subjected to thermal shock to induce the germination of bacterial spores. The ability of vegetative cells to grow under different conditions, as well as the synthesis of proteolytic enzymes and their multiplication rates, were evaluated. The results indicated a higher occurrence of mesophilic aerobic bacteria with higher proteolytic and lipolytic activity, and a higher growth rate. Twelve isolates showed statistically significant differences ($P < 0.05$), exhibiting superior capacity for synthesis of enzymes and growth rate. These isolates were genetically identified as *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. tequilensis* and *B. parabrevis*. These results reinforce the necessity for control measures against spore-forming aerobic mesophilic or thermophilic bacteria to ensure quality. Therefore, production losses, reduced shelf life, damage to brand reputation, and sales losses continue to be a challenge for the Brazilian dairy industry.

Key words: Spoilage bacteria, Thermophilic bacteria, Proteolytic activity, Lipolytic activity, Thermostable enzymes, Dairy derivatives.

1. Introduction

Dairy desserts comprise a broad group of products that, according to the Codex Alimentarius, consist of ingredients of a dairy nature, natural sources of calcium, potassium, vitamin A, and manganese, as well as non-dairy ingredients such as sucrose, fruits, fruit pulp, jellies, cocoa powder, vanilla, gelling agents, thickeners, conservatives, among others. It is a diverse set of ready-to-eat products, such as creamy and gelled desserts, creams and/or puddings, carbonated desserts (mousses), cheesecakes, flans, among others, that are marketed refrigerated, frozen, and canned [1, 2]. These products are widely known and consumed worldwide due to their nutritional characteristics, practicality, and sensory appeal. Their sales will reach values above US\$ 10.5 billion [2]. According to the research report on the dairy dessert market, an annual growth of 4.30% is estimated from 2022 to 2030, reaching US\$ 1.7 billion by the end of 2030 [3]. The deterioration of these products is related to changes in texture, flavor, and odor caused by the development of spore-forming bacteria. These microorganisms are widely distributed in nature, in different types of food, and in processing environments. However, other non-sporulating bacteria (thermophilic) can also cause the

deterioration of the ingredients or even the processed product by producing heat-resistant proteolytic and lipolytic enzymes that affect the quality of the final product [4, 5].

The genera *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Anoxybacillus*, and *Paenibacillus* are the main spore-forming microorganisms present in dairy products. They can survive adverse environments for long periods of time because they are resistant to thermal or non-thermal treatments, chemical products, and refrigeration conditions [4, 6]. When spores germinate under favorable conditions or after receiving some extrinsic stimulus, they produce vegetative cells capable of multiplying and synthesizing thermostable proteolytic and lipolytic enzymes [4, 6]. Additionally, they are able to form biofilms, populations, or cellular communities that give them greater resistance to different environmental, physical, and chemical factors [7].

While the presence of spore-forming bacteria that are resistant to thermal processing in milk and dairy products is well-documented in the literature, their occurrence in dairy desserts is not yet well understood, as demonstrated by the studies of André et al. [4], Ortuzar et al. [6] and Techer et al. [8]. It is important to emphasize that the presence of spore-forming or thermotolerant bacteria in dairy dessert or other types of dairy products can pose a risk to human health for different reasons. Several pathogenic bacteria, such as *B. cereus*, have been implicated in illnesses related to dairy products. Although there have been relatively few outbreaks linked to dairy desserts worldwide, the risk of contamination should not be underestimated [9]. According to a 2019 study conducted by the Brazilian Health Regulatory Agency [10], two out of every five samples of dairy desserts analyzed did not meet the established microbiological standards. Therefore, the objective of this study was to assess the occurrence of spore-forming bacteria in three different types of Brazilian dairy desserts, as well as to determine their potential for causing spoilage.

2. Methods

2.1 Selection of dairy desserts

Three types of industrialized dairy desserts produced in four Brazilian factories located in three different states were selected. The samples were obtained in supermarkets in the city of Viçosa, Minas Gerais (MG), stored under refrigeration between 8 to 12°C, all in valid condition for consumption, properly packaged, and in hygienic environments. 70 dairy desserts were obtained: Chocolate Flavored Dairy Dessert-DD1 (n=30), manufactured in the state of

Paraná (PR) and in the state of São Paulo (SP). Petit Suisse Cheese Dessert with Fruit Preparation-DD2 (n=30), in the state of MG and Dairy Flan Dessert with Caramel Flavor Syrup-DD3 (n=10), in the state of PR.

All samples were transported in styrofoam boxes and kept refrigerated (4°C) until analysis. Information about the lot, production date, expiration date, and manufacturing location were recorded. The pH and water activity of the samples were measured using a digital potentiometer (DM-20, Digimed) and a water activity meter (AquaLab-4TE, Decagon-Devices), respectively.

2.2 Detection of spore-forming bacteria in dairy desserts

The isolation of spore-forming bacteria was carried out using the methodology described by Postollec et al. [7], with some modifications.

2.2.1 Enrichment of samples

Twenty-five g of each sample were transferred to sterilized plastic bags and homogenized with 100 mL of Reinforced Clostridial Broth (RCB) (KASVI, Spain) in a stomacher (MA440-Marconí, Brazil) for 2 min. Then, 20 mL aliquots of the homogenate were transferred to six Falcon tubes. To inhibit the growth of lactic acid bacteria and induce the germination of bacterial spores, four tubes were subjected to thermal shock at 80°C for 30 min in a water bath (Fisatom Mod 550, Brazil). After that, they were cooled in an ice bath and incubated for 20 h at different temperatures and conditions: the first tube was incubated at 7°C under aerobic conditions to stimulate the growth of aerobic psychrotrophic microorganisms; the second tube was incubated at 7°C under anaerobic conditions to stimulate the growth of anaerobic psychrotrophic microorganisms; the third tube was incubated at 30°C under aerobic conditions to stimulate the growth and germination of aerobic mesophilic bacteria and the fourth tube was incubated at 37°C under anaerobic conditions to stimulate the growth of facultative anaerobic mesophiles.

Similarly, the two remaining tubes were subjected to thermal shock at 96°C for 20 min, then cooled in an ice bath. The first tube was incubated at 55°C for 20 h under aerobic conditions to stimulate the growth of thermophilic aerobes. The second tube was incubated at 55°C under anaerobic conditions to stimulate the growth of facultative anaerobic thermophiles.

2.2.2 Isolation

The isolation process was carried out following the methodology of Murano and Hudnall [11]. 100 μ L aliquots of the different samples were spread-plated in diverse culture media. For aerobic and anaerobic psychrotrophic microorganisms, Tryptic Soy Agar-TSA (KASVI, Spain) was used. Firstly, the plates were incubated at 17°C under aerobic or anaerobic conditions for 16 h, and then at 7°C for 10 days. For aerobic mesophiles, Tryptone Glucose Extract-TGE (KASVI, Spain) and Tryptone Dextrose Agar-DTA (KASVI, Spain) were used, and the plates were incubated at 35°C for 48 to 72 h. For anaerobic mesophilic microorganisms, a 1 mL aliquot was transferred to tubes containing PE-2 medium and incubated at 35°C under anaerobic conditions for 48 to 72 h. Subsequently, 100 μ L was transferred to plates containing Reinforced Clostridial Agar-RCA (KASVI, Spain) and incubated under anaerobic conditions at 55°C for 48 to 72 h. For aerobic thermophilic microorganisms, DTA (KASVI, Spain) was used, and the plates were incubated at 55°C for 48 to 72 h. In regards to thermophilic anaerobic microorganisms, 1 mL was transferred to tubes containing PE-2 medium and incubated at 51°C for 48 to 72 h. Afterwards, 100 μ L was transferred to RCA agar and incubated under anaerobic conditions at 55°C for 48 to 72 h.

2.2.3 Selection of isolates

Colonies displaying distinct morphological characteristics were randomly selected from each plate and were streaked in standard Plate Count Agar-PCA (KASVI, Spain). The psychrotrophic microorganisms were incubated aerobically or anaerobically at 7°C for 10 days, mesophilic microorganisms were incubated aerobically or anaerobically at 37°C for 48 to 72 h, and thermophilic microorganisms were incubated aerobically or anaerobically at 55°C for 48 to 72 h. Finally, was obtained bacterial stock of the isolates and cryopreserved at -20°C.

2.3 Evaluation of proteolytic activity

The activity was estimated followed the methodology of Von Neubeck et al. [12] with some modifications. The cellular concentration was standardized by measuring the optical density (OD) at a wavelength of 600 nm, to 0.1 OD₆₀₀=0.1 (4×10^8 CFU.mL⁻¹), using a spectrophotometer (Kasuki, IL-227). The plates were divided into four quadrants of 4.5x4.5

cm. Then, 30 μ L were placed in the skimmed milk agar. The plates were incubated at 37°C for up to 72 h. The enzymatic activity was checked every 12 h, and at the end of the incubation period, the plates were examined for enzymatic activity, indicated by a clearing zone due to hydrolysis of the substrate. The size of the halos was measured and the proteolysis was categorized as high; medium-high; medium and low. A culture of *B. cereus* ATTC14579/CCT0198 was used as a positive control, and a culture of *L. monocytogenes* serovar 1/2b (UFV_2) isolated from melon by Souza [13], was used as a negative control.

2.4. Determination of the multiplication rate

The growth kinetics were evaluated in the group with the highest occurrence that showed proteolytic activity (high or medium-high). To accomplish this, the DMFit software (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit) was utilized. Each culture was standardized by measuring the optical density OD₆₀₀=0.1 and transferred to glass tubes with screw caps and incubated at 35°C. The growth of microorganisms was assessed by measuring the OD₆₀₀ every hour for a total of 12 h, and then again at the 24 h. The OD data were fitted to the microbial growth model of Baranyi and Roberts [14] using the DMFit 3.5 program, and the growth rate (μ) was calculated. Statistical analysis was performed and Tukey's mean comparison test was performed. A difference was considered significant ($P < 0.05$). The STATISTICA 7.0 software was used for statistical analysis.

2.5 Evaluation of lipolytic and catalase activity

These enzymatic activities and their morphological characterization by Gram stain were evaluated using the methodology described by Murano and Hudnall [11]. The isolates with superior proteolytic activity and μ were selected based on the Tukey mean analysis. Aliquots of 30 μ L at OD₆₀₀=0.1 were placed in wells made in Spirit Blue culture medium (Merck-KGaA), and the plates were incubated at 37°C for up to 120 h. Enzyme activity was monitored every 12 h by observing the presence or absence of halo formation and categorized as positive or negative.

2.6 Genetic identification of isolates

Genetic identification was performed on isolates that showed higher growth rates and higher proteolytic capacity. Genomic DNA was extracted using the thermal extraction protocol developed by Dashti et al. [15], with modifications. The extracted DNA samples were amplified using primers 27F and 1492R (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) and a Verity 96-well thermocycler (AB-Applied Biosystems). The PCR products were confirmed via electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Finally, the partial sequences amplified were purified and sequenced. Genetic identification was based on the partial sequences of the 16S rRNA gene, which were obtained by the Sanger sequencing method and compared with reference bacterial sequences in GenBank databases found at the National Center for Biotechnology Information-NCBI, using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program.

3. Results and discussion

3.1 The pH and Aw of the samples

The average pH values of samples DD1, DD2, and DD3 were 6.89, 4.41, and 6.33, respectively. The lowest value was observed in DD2, which is a characteristic of this fermented product, while the others are not. Likewise, the variations in pH values among all dessert samples can be attributed to the different ingredients that are used in each type of dessert, such as cocoa powder, pulp, fruit extract, syrups, caramel, and others, as well as their production stages [16]. Values that, according to the literature, promote the proliferation of various bacterial groups were observed in this research. Other studies have also reported pH values ranging from 5.0 to 6.5, and even as low as 4.8, which allowed for bacterial survival and growth [17]. Similarly, in a study conducted by Nikaedo et al. [1], different formulations of chocolate milk desserts were analyzed, revealing pH variations ranging from 5.7 to 7.1. These variations in pH highlight the influence of the dairy dessert's composition on its acidity.

The average Aw values for all the dairy desserts analyzed showed a range of variation between 0.9761 and 0.9838. These physicochemical characteristics suggest that spore-forming bacteria and other microorganisms can survive and multiply [16]. Although the manufacturing process of these products involves thermal treatment and refrigeration of the finished product,

the ample availability of nutrients, particularly carbohydrates, in conjunction with its neutral pH and high-water content, renders this product particularly favorable for microbial growth [18, 8].

3.2 Evaluation of the occurrence of spore-forming bacteria in dairy desserts

After subjecting the 70 samples to heat shock and enrichment, 79.5% were positive for occurrence of spore-forming bacteria (334). Specifically, 127 (38%) corresponded to DD1, 152 (46%) to DD2, and 53 (16%) to DD3 (Table 1). Furthermore, 57 (81%) tested positive for aerobic psychrotrophs (AEP), 55 (78%) for anaerobic psychrotrophs (ANP), 60 (86%) for aerobic mesophiles (AEM), 66 (94%) for anaerobic mesophiles (ANM), 37 (53%) for aerobic thermophiles (AET), and 59 (84%) for anaerobic thermophiles (ANT).

Table 1. Samples that presented microbial growth under different incubation conditions following heat shock and enrichment stage.

Number	Samples	AEP	ANP	AEM	ANM	AET	ANT	Total
1	DD1	-	+	+	-	-	-	127
2		+	+	+	+	+	+	
3		-	-	-	+	-	+	
4		-	-	+	+	+	+	
5		+	-	+	+	-	-	
6		-	-	-	+	+	+	
7		-	+	+	+	-	-	
8		+	+	+	+	-	-	
9		+	+	+	+	-	+	
10		+	+	+	+	-	+	
11		-	+	+	-	-	-	
12		+	-	+	-	-	-	
13		-	-	+	-	-	-	
14		+	+	+	+	+	-	
15		+	+	+	+	-	-	
16		+	+	+	+	+	-	
17		+	+	+	+	-	+	
18		+	+	+	+	-	+	
19		+	+	+	+	-	+	
20		+	+	+	+	-	+	
21		+	+	+	+	-	+	
22		+	+	+	+	+	+	
23		+	+	+	+	-	+	
24		+	+	+	+	-	+	
25		+	+	+	+	-	+	
26		+	+	+	+	-	+	
27		+	+	+	+	-	+	
28		+	+	+	+	-	+	
29		+	+	+	+	-	-	
30		+	+	+	+	+	+	
Total		23	24	28	26	7	19	
31	DD2	+	-	-	+	-	+	151
32		+	+	-	+	+	+	
33		-	-	-	+	+	+	
34		+	-	+	+	+	+	
35		-	-	+	+	+	+	

36	-	-	+	+	+	+	
37	-	-	+	+	+	+	
38	+	-	+	+	+	+	
39	+	+	+	+	+	+	
40	+	+	+	+	+	+	
41	+	+	+	+	+	+	
42	+	+	+	+	+	+	
43	+	+	+	+	+	+	
44	+	+	+	+	+	+	
45	+	+	+	+	+	+	
46	-	+	+	+	+	+	
47	+	+	+	+	+	+	
48	+	+	+	+	+	+	
49	-	+	+	+	+	+	
50	+	+	+	+	+	+	
51	+	+	+	+	-	+	
52	+	+	+	+	-	+	
53	+	+	+	+	+	+	
54	+	+	+	+	+	+	
55	+	+	+	+	+	+	
56	+	+	-	+	-	+	
57	+	+	-	+	-	+	
58	+	+	-	+	-	+	
59	+	+	-	+	-	+	
60	+	+	-	+	-	+	
Total	24	23	22	30	22	30	
61	+	+	+	+	+	+	
62	+	+	+	+	+	+	
63	+	+	+	+	+	+	
64	+	+	+	+	+	+	
65	+	+	+	+	+	+	
66	+	+	+	+	+	+	
67	+	+	+	+	-	+	
68	+	+	+	+	-	+	
69	+	-	+	+	+	+	
70	+	-	+	+	+	+	
Total	10	8	10	10	8	10	
Total positive samples	57	55	60	66	37	59	334

AEP Aerobic psychrotrophs. **ANP** Anaerobic psychrotrophs. **AEM** Aerobic mesophiles. **ANM** Anaerobic mesophiles. **AET** Aerobic thermophiles. **ANT** Anaerobic thermophiles.

DD1 Dairy Dessert with Chocolate Flavor. **DD2** Petit Suisse Cheese Dessert with Fruit Preparation. **DD3** Flan Dairy Dessert with Caramel Flavor Syrup. (+) Positive bacterial growth.

(-) Negative bacterial growth. **Source:** Authors.

After the process of isolation and purification, a total of 1079 isolates were obtained (Table 2). Among these isolates, 403 (37.3%) were derived from DD1, 490 (45.4%) from DD2, and 186 (17.2%) from DD3. DD2 yielded the highest number of isolates, while DD3 had the lowest count. These findings suggest a predominant occurrence of mesophilic bacteria in the analyzed dairy dessert samples.

Table 2. Isolates obtained from different types of dairy desserts evaluated according to their growth conditions.

Sample	Isolations		Growth Conditions				
			Aerobic		Anaerobic		
DD1	403	Psychrotrophs	294	606	473	AEP	164
						AEM	346
DD2	490	Mesophiles	518	473	473	AET	96
						ANP	130
DD3	186	Thermophiles	267	473	473	ANM	172
						ANT	171
Total	1079	Total	1079	Total	1079	Total	1079

DD1 Dairy Dessert with Chocolate Flavor. **DD2** Petit Suisse Cheese Dessert with Fruit Preparation. **DD3** Flan Dairy Dessert with Caramel Flavor Syrup. **AEP** Aerobic psychrotrophs. **ANP** Anaerobic psychrotrophs. **AEM** Aerobic mesophiles. **ANM** Anaerobic mesophiles. **AET** Aerobic thermophiles. **ANT** Anaerobic thermophiles. **Source:** Authors.

Taking into account the growth temperature, it can be observed that mesophilic microorganisms accounted for 48% of all isolates, while psychrotrophic and thermophilic microorganisms represented 27% and 25%, respectively. With regards to oxygen conditions, aerobic microorganisms were more predominant than anaerobic ones, representing 56% and 44%, respectively. According to the growth conditions in general, 164 (15%) isolates were identified as AEP, 130 (12%) as ANP, 346 (32%) as AEM, 172 (16%) as ANM, 96 (9%) as AET, 171 (16%) as ANT, and seven isolates were discarded due to contamination. Therefore, the group of aerobic mesophiles was of the higher occurrence (Table 2).

The study shows that, although all microbial groups were present in the samples, mesophilic aerobic spore-forming microorganisms had a higher occurrence compared to other groups. This result highlights the importance of temperature control not only during processing but also during storage, marketing, and consumption. Similar findings were reported in the analysis of dairy desserts performed by Lücking et al. [19] and Moschonas et al. [18].

In this regard, the different types of milk used in the production of dairy desserts are an important source of deteriorating microorganisms that can directly affect the bacterial composition of the final products [20]. Therefore, it has been shown that this type of raw material is considered the main vector of spores, because their germination can occur due to the increase in water activity in the final product when milk is used [5, 6, 21].

Non-dairy ingredients such as cocoa, sugar, and starch also contribute to the microbiota composition of dairy desserts. Cocoa powder can provide *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, yeasts, and molds, while sugar can introduce *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, and *Corynebacterium* [22]. Furthermore, the presence of these microorganisms in processing environments reinforces the need for effective measures for cleaning and sanitizing the surfaces of equipment and utensils used in the manufacture of these products [6].

3.3 Proteolytic activity

Among the 1072 evaluated isolates, 725 (68%) showed proteolytic activity categorized as high, medium-high, medium, or low (108 AEP, 97 ANP, 243 AEM, 123 ANM, 65 AET, and 89 ANT). Additionally, 218 isolates (20%) did not show enzymatic activity, and in 129 isolates (12%), it was not possible to quantify it (Table 3).

Table 3. Characterization of the proteolytic activity of isolates from the three types of dairy desserts according to their growth conditions.

Activity proteolytic	AEP	ANP	AEM	ANM	AET	ANT	Total
High	26	19	94	46	29	38	252
Medium-high	44	38	96	46	27	39	290
Medium	27	25	37	25	5	8	127
Low	11	15	16	6	4	4	56
No activity	43	22	52	43	11	47	218
NGA	0	3	16	1	11	4	35
NGP	13	8	27	13	13	20	94
Total Avaluated	164	130	338	180	100	160	1072

AEP Aerobic psychrotrophs. **ANP** Anaerobic psychrotrophs. **AEM** Aerobic mesophiles. **ANM** Anaerobic mesophiles. **AET** Aerobic thermophiles. **ANT** Anaerobic thermophiles. **NGA** Did not grow on activation. **NGP** Did not grow on the culture plate. **Source:** Authors.

In Table 3, it is observed that the highest number of microorganisms exhibiting enzymatic activity were aerobic mesophiles. Specifically, 94 isolates showed high proteolytic activity, 96 showed medium-high, 37 showed medium, and 16 showed low. Therefore, a total

of 190 isolates (55%) exhibited high and medium-high proteolytic capacity. This proteolytic activity is linked to the deterioration process of these products, attributed to the extracellular enzyme activity of spore-forming bacteria that are capable of surviving thermal processes [5]. Similar findings were reported by Moschonas et al. [18] who investigated the potential for deterioration caused by bacteria that survived pasteurization in 268 cream pudding samples during different storage periods, and in various types of milk and dairy products [23, 21].

Bacteria belonging to the genera *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, and *Paenibacillus* are part of a group of thermotolerant bacteria, as demonstrated by Lucking et al. [19], who evaluated the deteriorating microbiota of milk and its processing environment. The authors identified 43 species, of which 75% were isolated from the products and 25% from the processing line. They concluded that most of these species belonged to the *Bacillus* group, producing proteolytic enzymes. Similar results were presented by André et al. [4], (2017), who demonstrated that species of the genera *Bacillus*, *Geobacillus*, and *Paenibacillus* were more frequently found in different dairy products, and their distribution depended on the type of milk used. Powdered milk, for example, was considered the main vehicle of spores, which when germinating and multiplying during the manufacture of the product, are responsible for the deterioration caused by the proteases they produce, as was corroborated for Moschonas et al. [18].

It is evident from Table 3 that aerobic mesophiles have the highest occurrence among the bacterial groups analyzed in the dairy desserts. Therefore, studying their growth kinetics was crucial to identify the isolate(s) with the highest growth rate(s) and determine which strains have the potential to cause spoilage in these products.

3.4 Growth kinetics and genetic identification

In this study, the growth kinetics of 190 aerobic mesophilic isolates was evaluated, focusing on those with high and medium-high proteolytic activity. The enzymatic activity serves as an important indicator of the isolates' potential to contribute to product deterioration in case of spore germination or the persistence and multiplication of thermotolerant bacteria capable of producing these enzymes. By assessing multiplication bacterial under optimal growth conditions, it becomes possible to predict the behavior of microorganisms in dairy desserts. This information is crucial for assessing the potential risk of spoilage associated with specific isolates and their enzymatic capabilities.

Of total the isolation evaluated, 141 (74%) presented higher absorbance, 52 (37%) were obtained from DD1, 54 (38%) from DD2, and 35 (25%) from DD3. The μ varied between 0.006 and 0.209. For isolates from each type of dessert, DD1 isolates showed μ between 0.006 to 0.187, DD2 isolates had μ between 0.009 to 0.209, and DD3 isolates varied between 0.022 and 0.173.

According to the analysis of variance, there was a significant difference ($P < 0.05$) in the growth rates of isolates among the three types of dairy desserts. The Tukey's mean comparison test was performed, and it showed that in DD1, three isolates had a significantly greater growth rate (μ from 0.141 to 0.187) than the other 46 isolates; in DD2, five isolates (μ from 0.149 to 0.209) had a significantly greater growth rate than the other 45 isolates; and in DD3, four isolates (μ from 0.098 to 0.183) had a significantly greater growth rate than the other 30 isolates. Thus, 12 isolates (Table 4) showed different growth rate and, consequently, a greater potential for deterioration.

Table 4. General characterization and taxonomic affiliation of isolates from dairy desserts obtained by comparative analysis of 16S rRNA gene sequences.

Isolated	Dessert Origin	μ (h ⁻¹)	PA	LA	C	Sequence with maximum similarity*	(%) GC	(%) S
1	DD1/Paraná	0.143	Medium-high	+	+	<i>Bacillus subtilis</i>	54	86
2	DD1/Paraná	0.187	Medium-high	+	+	<i>Bacillus cereus</i>	54	91
3	DD1/São Paulo	0.151	Medium-high	-	+	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	54	96
4	DD2/Minas Gerais	0.157	High	+	+	<i>Bacillus thuringiensis</i>	53	92
5	DD2/Minas Gerais	0.209	High	+	+	<i>Bacillus sp.</i>	54	98
6	DD2/Minas Gerais	0.188	High	+	+	<i>Bacillus subtilis</i>	55	97
7	DD2/Minas Gerais	0.188	High	+	+	<i>Bacillus sp.</i>	55	97
8	DD2/Minas Gerais	0.204	High	+	+	<i>Bacillus cereus</i>	54	99
9	DD3/Paraná	0.136	High	+	+	<i>Bacillus sp.</i>	55	98
10	DD3/Paraná	0.157	High	-	+	<i>Bacillus tequilensis</i>	56	98
11	DD3/Paraná	0.173	High	+	+	<i>Bacillus subtilis</i>	55	99
12	DD3/Paraná	0.098	High	+	+	<i>Bacillus sp.</i>	53	99

DD1 Dairy Dessert with Chocolate Flavor. **DD2** Petit Suisse Cheese Dessert with Fruit Preparation. **DD3** Flan Dairy Dessert with Caramel Flavor Syrup. μ Growth rate. **PA** Proteolytic activity. **LA** Lipolytic activity. **C** Catalase. * Similarity to NCBI database

sequences. (%) GC Percentage of guanine and cytosine. (%) S Percentage of similarity.

Source: Authors.

The morphological characterization of the isolates showed that all of them were rod-shaped Gram-positive. Likewise, 100% of the isolates were catalase-positive and showed proteolytic activity. Medium-high proteolytic activity was observed in three isolates (25%) belonging to DD1, and high proteolytic activity was observed in nine isolates (75%) belonging to DD2 and DD3. Regarding lipolytic activity, 10 of the isolates (83.3%) showed positive results, and only two (17%) were negative for this type of activity. Thus, 83% of the isolates exhibited both enzymatic activities, which can cause unpleasant *off-flavors* in various dairy products [19, 25].

After genetic identification based on partial sequences of the 16S rRNA gene, it was determined that these isolates belonged to families Bacillaceae (92%) and Paenibacillaceae (8%). Likewise, 92% of the isolates showed similar values greater than 90% regarding the sequences found in the NCBI database, and it was possible to perform a taxonomic classification of the species in 67% of the samples. As shown in Table 4, microorganisms from the two families were identified in dessert DD1, but with a reduced number of different species, while dessert DD2 had a larger number of species identified, but belonging a one family. Finally, in DD3, four different species belonging to one family too.

It is interesting to the diversity of microbial species found in the analyzed products. 25% of the species were identified as *B. subtilis*, 17% as *B. cereus*, 8.3% as *B. thuringiensis*, 8.3% as *B. tequilensis*, 33.3% as *Bacillus* spp and 8.3% as *B. parabrevis*. These results demonstrate that the identified isolates belong to genera capable of forming spores, such as *Bacillus* or *Brevibacillus*. According to various studies, the bacterial diversity found in different types of dairy desserts may be related to the use of diverse raw materials and the different steps involved in their production process. Even though these types of food are thermally processed, they must be transported, distributed, stored, and marketed under refrigeration to prevent the microbiological growth and deterioration of the product [26, 18]. Furthermore, the physicochemical characteristics, such as pH, Aw, and nutrient content, create a favorable environment for the growth of various types of microorganisms in milk products [19], as shown by Alonso et al. [23] and Pinto et al. [25] after evaluating various types of UHT from different regions in Brazil.

Regarding the microorganisms identified, *B. cereus* represented 17% of the DD1 and DD2 isolates. Techer et al. [8] also identified this bacterium in pudding samples. *B. cereus* is characterized by being mesophilic, but it can multiply at low temperatures and can be considered a thermotolerant psychrotrophic microorganism. It produces proteolytic and lipolytic enzymes that can affect the quality of milk and its derivatives. Furthermore, some strains can produce toxins that cause food poisoning, assessed the potential risk of consuming dairy desserts for public health, as they found the enterotoxin complex HBL (hbIA, hbIC, and hbID) in 20 of the isolates identified as *B. cereus* [27].

As previously described, most of the microorganisms identified in this research (33,3%) were *Bacillus* spp. isolated from DD2 and DD3. This same microbial group was identified by Lücking et al. [18], who characterized 467 spore-forming bacteria, 379 of which were isolated from dairy processing environments, including raw materials, dehydrated ingredients and processed dairy foods such as puddings, flavored milk, cheeses, creams, among others. Similar results were reported in the analysis of different milk derivatives [28, 6, 20], and ingredients such as cocoa, sugar, and starch used in the preparation of dairy desserts [19, 20].

B. subtilis was another bacterium identified in 25% of the isolates, associated with the deterioration of dairy desserts by causing milk casein coagulation, unpleasant flavors, and odors through the synthesis of proteases and lipases, as was also evidenced in vanilla cream pudding by Moschonas et al. [18]. Finally, the last isolated species belonging to the genus *Bacillus* was *B. tequilensis* (8.3%), a microorganism capable of surviving and multiplying in a wide range of temperatures (from 25 to 50 °C) and pHs (from 5.5 to 8.0). These characteristics, together with the production of several enzymes, make this bacterium resistant to different environments and adverse conditions. This bacterium isolated from milk has been characterized by its ability to produce high concentrations of exopolysaccharides, which increase its resistance [29].

Regarding the genus *Brevibacillus*, the only isolated species was *B. parabrevis* (8.3%) from DD1. Some studies have also identified this microorganism in dairy products, such as chocolate and vanilla pudding, cocoa powder, powdered milk, skimmed milk powder, among others [28, 18, 8]. It is important to emphasize the implementation of quality programs as a tool to prevent product contamination by these microorganisms, especially through cross-contamination during milking or from other raw materials used in the dairy desserts [6].

It is evident that the quality of dairy desserts initially involves the identification of microorganisms associated with the raw materials and the processing environment [6]. Although these products undergo microbiological stability processes, spore-forming

microorganisms can still survive and pose a potential risk of product spoilage. In this regard, the findings of this study are significant, as they aid in the identification of the microorganisms with the highest occurrence. This facilitates the implementation of control measures to mitigate the risks associated with these microorganisms, as they should be recognized as potential challenges for the dairy industry [19, 28, 20].

Several studies have shown that the mesophilic aerobic microorganisms (*Bacillus* spp., *B. cereus*, *B. subtilis*, and *B. thuringiensis*), have the potential to adhere to and form biofilms on the surfaces and pipes of equipment used in the dairy industry. Through detachment of the vegetative cells, these microorganisms can contaminate food with toxins that they synthesize and/or form spores [25, 21]. These findings highlight the persistence of microbiological quality issues in dairy products, which may be due to failures in obtaining and processing raw materials or errors during production stages such as poor implementation of good manufacturing practices, inadequate implementation of sanitization protocols, or use of inefficient protocols [25, 6].

Additionally, failures in refrigeration during transport, commercialization, and/or consumption can contribute to the breakage of the cold chain. This can result in the survival of spores, or those introduced through post-processing contamination. Furthermore, in the absence of antagonistic microbiota, these spores can germinate and multiply under abusive temperature conditions [26, 18]. Therefore, it is crucial to better apply the risk analysis and critical control points system, improve inspection by government agencies responsible for the sanitary inspection of dairy products, and ensure compliance with the current rules and legislation in order to protect the health of consumers and the economy of the sector.

However, it is important to highlight that the economic losses are only one part of the impact of microbiological issues in dairy desserts. The consequences for public health, including the possibility of outbreaks caused by the transmission of such microorganisms or their toxins through food, are more important and concerning. Therefore, it is essential for the dairy industry to invest in research and develop new technologies for controlling and inhibiting problematic bacteria in dairy derivatives such as thermophilic and spore-forming bacteria.

4. Conclusions

Based on the results, it was found that spore-forming mesophilic aerobic bacteria had a higher occurrence in the analyzed samples, with a high percentage of these isolates showing

proteolytic capacity. The study also revealed that more microorganisms were isolated from Petit Suisse Cheese Dessert with Fruit Preparation, possibly due to differences in its ingredients and fermentation stage compared to the other desserts. The detection of *B. cereus*, *B. subtilis* and *B. thuringiensis*, their high potential to cause deterioration in desserts, represents a technological challenge for the Brazilian dairy industry. Improving sanitation processes is necessary to inhibit the presence of these highly persistent microorganisms in industrial installations and, therefore, in the final product.

Acknowledgments: The Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais FAPEMIG) (Grant number APQ-02856-16) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Financial code 001) for financial support.

Conflicts of interest/Competing interests: The authors declare no conflicts and competing interests.

References

- [1]. Nikaedo PHL, Amaral FF, Penna ALB. (2004). Technological characterization of creamy chocolate milk desserts made with whey protein concentrate and mixtures of carrageenan and guar gums. *Braz. J. Pharm. Sci.* 40:397-404.
- [2]. Saunders AB. (2016). Dairy Desserts, Reference Module in Food Science, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00831-3>.
- [3]. Market Research Future Dairy Desserts Market. (2022) Dairy Desserts Market Research Report Information by Type (Ice creams, Yoghurt, Custards, and Others), Distribution Channel [Store-Based (Supermarkets & Hypermarkets, Convenience Stores, and Others) and Non-Store-Based], and Region (North America, Europe, Asia-Pacific, and RoW) – Forecast till 2027 <http://www.marketresearchfuture.com/reports/dairy-desserts-market-5166>. Accessed 07 de November of 2022.
- [4]. André S, Vallaeys T, Planchon S. (2017). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Res. Microbiol.* 168(4):379-387.

- [5]. Machado SG, Baglinière F, Marchand S, Van Coillie E, Vanetti MC, De Block J, Heyndrickx, M. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Front Microbiol* 8:302.
- [6]. Ortuzar J, Martinez B, Bianchini A, Stratton J, Rupnow J, Wang B. (2018). Quantifying changes in spore-forming bacteria contamination along the milk production chain from farm to packaged pasteurized milk using systematic review and meta-analysis. *Food Control* 86:319-331.
- [7]. Postollec F, Bonilla S, Baron F, Jan S, Gautier M, Mathot AG, Hallier-Soulier S, Pavan S, Sohier DA. (2010). Multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food. *Int J Food Microbiol* 142:78–88.
- [8]. Techer C, Jan S, Thierry A, Maillard MB, Grosset N, Galet O, Baron F, et al. (2020). Identification of the bacteria and their metabolic activities associated with the microbial spoilage of custard cream desserts. *Food microbiol* 86:103317.
- [9]. Dairy Authority of South Australia ('Dairysafe') – Guidelines for the Safe Manufacture of Dairy Products. The Dairy Authority of South Australia, South Australia ABN 36 767 901 242 © Government of South Australia 2019.
- [10]. Ministério da Saúde MS, & Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Este texto não substitui o publicado no Diário Oficial da União. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019 (Publicada no DOU nº 249, de 26 de dezembro de 2019).
- [11]. Murano EA, Hundall JA. (2001). Media, Reagents, and Stains. Chapter 63. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Fourth Edition. (ed) Frances Pouch Downes and Keith IT O. American Public Health Association.
- [12]. Von Neubeck M, Baur C, Krewinkel M, Stoeckel M, Kranz B, Stressler T., ... & Wenning, M. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International journal of food microbiology*, 211, 57-65. v. 211, p. 57-65, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001>.

- [13]. Souza P. Evaluation of *Listeria monocytogenes* in melon and jaboticaba. Dissertation (Master in Food Science and Technology) Federal University of Viçosa. Viçosa MG. 2014.
- [14]. Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *International journal of food microbiology*, 26(2), 199-218, v. 26, n. 2, p. 199-218, 1995.
- [15]. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM (2009). Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Med J*, 41(2): 17-122.
- [16]. Young NWG, O'sullivan GR. (2011). The influence of ingredients on product stability and shelf life. In: *Food and beverage stability and shelf-life*. Woodhead Publishing p. 132-183.
- [17]. Valencia MS, Salgado SM, Andrade SAC, Padilha VM, Livera AVS, Stamford TLM (2016). Development of creamy milk chocolate dessert added with fructo-oligosaccharide and *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* LBC 81. *LWT - Food Sci Technol* 69:104-109.
- [18]. Moschonas G, Lianou A, Nychas GJE, Panagou EZ. (2021). Spoilage potential of *Bacillus subtilis* in a neutral-pH dairy dessert. *Food Microbiol* 95:103715.
- [19]. Lücking G, Stoeckel M, Atamer Z, Hinrichs J, Ehling-Schulz M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *Int J Food Microbiol* 166(2):270-279. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004>
- [20]. Pereira APM, Sant'Ana AS. (2018). Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. *Trends Food Sci Technol* 76:101-118.
- [21]. Sadiq FA, Flint S, He G. (2018). Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. *Int Dairy J* 85:159-168.

[22]. Ledenbach LH, Marshall RT. (2009). Microbiological spoilage of dairy products: In Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. Springer, New York, NY. pp 41-67.

[23]. Alonso VPP, de Oliveira MJ, Kabuki DY. (2021). Incidence of *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans* and *Geobacillus stearothermophilus* in ultra-high temperature milk and biofilm formation capacity of isolates. Int J Food Microbiol 354: 109318.

[25]. Pinto CLO, Souza L V, Meloni VAS, Batista CS, Silva R, Martins EMF, Martins ML, et al. (2017). Microbiological quality of Brazilian UHT milk: Identification and spoilage potential of spore-forming bacteria. Int J Dairy Technol 71(1):20–26. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12339>

[26]. Mercier S, Villeneuve S, Mondor M, Uysal L. (2017). Time-temperature management along the food cold chain: a review of recent developments. Compr Rev Food Sci F 16:647–667. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12269>.

[27]. Griffiths MW, Schraft H. (2017). *Bacillus cereus* Food Poisoning. Foodborne Diseases, 395–405. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385007-2.00020-6>

[28]. Martinez BA, Stratton J, Bianchini A. (2017). Isolation and genetic identification of spore-forming bacteria associated with concentrated-milk processing in Nebraska. J Dairy Sci 100(2):919-932. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11660>

[29]. Luang-In V, Saengha W, Deeseenthum S. (2018). Characterization and bioactivities of a novel exopolysaccharide produced from lactose by *Bacillus tequilensis* PS21 isolated from Thai milk kefir. Microbiol Biotechnol Lett 46(1):9-17.

CAPÍTULO II

MODELAGEM DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES POR BACTÉRIAS FORMADORAS DE ESPOROS

Angie Dahiana Duque-Rodríguez^{1*}; Wilmer Edgard Luera Peña¹

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
Campus Universitário, Viçosa, MG, Brasil.

* Autor de correspondência angieduque@gmail.com (A. D. Duque-Rodríguez).

<https://orcid.org/0000-0003-1636-4602>.

Resumo

A formação de biofilmes multiespécies por bactérias formadoras de esporos e termodúricas, nas superfícies dos equipamentos durante as etapas de processamento dos derivados lácteos, podem provocar contaminação cruzada e deterioração dos produtos antes de atingir sua data de validade. Igualmente, as falhas nos procedimentos de limpeza e sanitização dos equipamentos, pode facilitar a formação de biofilmes. Portanto, evitar sua formação e sua eliminação têm sido um desafio constante para a indústria de laticínios e de alimentos em geral. Deste modo, esta pesquisa teve como objetivos determinar a capacidade de espécies como *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. tequilensis*, *Bacillus sp.* e *B. parabrevis* em co-cultura (mixes bacterianos) de formar biofilmes multiespécies em cupons de aço inoxidável, em temperaturas de 6, 15, 25 e 32 °C durante 24, 48, 72, 96 e 120 h. Os dados obtidos das contagens bacterianas foram considerados como biofilmes microbianos quando maiores a 5,0 log UFC·cm⁻². Seguidamente, os dados foram transformados na forma binária e utilizados para desenvolvimento do modelo, para prever os limites de formação de biofilme. Para tanto, o modelo de regressão logística foi ajustado aos dados binários das três co-culturas empregando o programa estatístico Minitab v.12.1 (USA). Posteriormente, o desempenho de cada modelo foi avaliado pelo índice estatístico de Nagelkerke R², porcentagem (%) de dados corretos e o índice estatístico de Hosmer-Lemeshow, além de testes experimentais de validação. Entre os resultados obtidos destaca-se, que a formação de biofilmes na temperatura de incubação de 32

°C foram mais robustos, seguidos pela temperatura de 25 °C, ao contrário do que foi observado à temperatura de 6 °C. Também, foi evidenciado que o mix bacteriano 2 teve maior probabilidade de formação de biofilmes em menor tempo. Igualmente, foi demonstrado que o aço inoxidável permite a adesão bacteriana e, conseqüentemente, a formação de biofilme. Estes resultados auxiliam a estabelecer estratégias de controle para biofilmes multiespécies e o estabelecimento de protocolos de sanitização em indústrias de alimentos.

1. Introdução

Os biofilmes permitem a sobrevivência dos microrganismos imersos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) de diferente composição e, dependendo das espécies colonizadoras e do tipo de ambiente de produção do alimento, conseguem estabelecer populações e, ou comunidades complexas com comportamentos coordenados e coletivos, (GIAOURIS et al., 2015; MEESILP e MESIL, 2019), que lhes confere resistência a agentes químicos e físicos (O'TOOLE, 2003; COUGHLAN et al., 2016; KHAN et al., 2016; YUAN et al., 2020; DULA et al., 2021), coesão à sua estrutura, capacidade de retenção de nutrientes e, além disso facilita a transferência de moléculas sinalizadoras de comunicação celular (FLEMMING et al., 2016; ZHAO et al., 2017).

A indústria de laticínios, apresenta condições ideais para o crescimento bacteriano (componentes da matriz alimentar, disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, dinâmica de fluidos, entre outros fatores intrínsecos e extrínsecos), superfícies de contato com características que permitem a fixação e, por tanto, a formação de biofilmes multiespécies (TANG et al., 2011; CAMPOCCIA et al., 2013; COUGHLAN et al., 2016; FLEMMING et., 2016; ALLEN et al., 2018; GALIE et al., 2018).

A forma sésil confere aos microrganismos resistência a diversas condições extrínsecas, como a altas temperaturas de aquecimento, dessecação, resistência mecânica a correntes líquidas em tubulações, antimicrobianos, compostos químicos, sanitizantes, entre outros (GIAOURIS et al., 2015; COUGHLAN et al., 2016; FLEMMING et al., 2016; YUAN et al., 2020; DULA et al., 2021).

As bactérias que formam biofilmes multiespécies na indústria de produtos lácteos, incluem espécies psicrófilas, termófilas, psicrotróficas, formadoras de esporos e termodúricas (DE OLIVEIRA et., 2013; COUGHLAN et al., 2016; WANG et., 2021). Entre estas destacam as pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Geobacillus*, caracterizando-se por causar

deterioração nas matérias-primas e nos produtos finais, redução na vida de prateleira, devido à sua capacidade de sintetizar enzimas extracelulares proteolíticas e lipolíticas termoestáveis.

A contaminação de diferentes produtos lácteos (leite pasteurizado, leite UHT, leite desnatado, leites saborizados, leite em pó, queijos, requeijão, entre outros) por bactérias formadoras de esporos e termodúricas está bem documentado na literatura (LUCKING et al., 2013; QUIGLEY et al., 2013; PENA et al., 2014; SADIQ et al., 2016; ANDRÉ et al., 2017; MACHADO et al., 2017; SADIQ et al., 2018; ALONSO et al., 2021; MOSCHONAS et al., 2021; WANG et al., 2021), mas o estudo dos microrganismos formadores de esporos e, ou termodúricos isolados de sobremesas lácteas e, sua capacidade de formação de biofilmes ainda é escassa (YANG et al., 2020). Embora, a literatura evidencie o mecanismo de formação dos biofilmes por uma única espécie, sabe-se que nas condições “reais” os biofilmes são formados por mais de uma espécie ou gênero microbiano e, os tratamentos de controle e remoção deveriam ser direcionados para essa matriz formada por múltiplas espécies, sem deixar de lado as características fisiológicas das espécies que as conformam. Avaliar os dados quantitativos da formação de biofilme, bem como, a predição da ocorrência tem sido um desafio para implementação de medidas preventivas. Nesse sentido o uso de modelos preditivos tem se convertido em uma ferramenta para descrever a capacidade de adesão e formação de biofilme.

O desenvolvimento de modelos preditivos fornece informações relevantes que contribuam na implementação de estratégias de controle eficazes na ocorrência destes microrganismos e sua capacidade de formação de biofilmes na cadeia alimentar. Recentemente, Silva et al. (2022) usaram modelos de regressão logística para prever os limites de adesão e formação de biofilme por *B. cereus* em aço inoxidável. Considerando esses aspectos, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de formação de biofilmes multiespécies por microrganismos formadores de esporos e termodúricos, isolados de sobremesas lácteas brasileiras e desenvolver modelos probabilísticos que descrevem o efeito da temperatura e do tempo na formação deste tipo de biofilmes.

2. Metodologia

O experimento foi conduzido no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais. A metodologia implementada foi a desenvolvida por Da Silva et al., (2022) com algumas modificações.

2.1 Avaliação da formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável

Para a avaliação da adesão e formação de biofilmes, foram empregadas as cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus sp.* e *Brevibacillus parabrevis* isoladas de sobremesas lácteas e queijos petit suisse brasileiros e identificadas geneticamente pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr durante a pesquisa desenvolvida por Duque-Rodríguez et al. (2023).

2.1.1 Preparo e padronização dos microrganismos

Cada um dos 10 isolados pertencentes a 6 espécies, foram ativados duas vezes consecutivas em caldo Infusão Cérebro Coração (*Brain Heart Infusion - BHI*) (Merck®, EUA), preparado conforme instruções do fabricante e incubados a $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 h. Para a padronização dos inóculos foi empregado caldo Nutriente (*Nutrient Broth - KASVI®*, Espanha), preparado conforme instruções do fabricante, foram realizadas leituras da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Kazuaki IL-227), no comprimento de onda de 600 nm, sendo a absorbância ajustada para 0,010 ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,010$), equivalente a uma concentração aproximadamente de $1,0 \times 10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$. Posteriormente, as suspensões celulares foram empregadas nos ensaios da avaliação dos processos de adesão e formação de biofilmes na superfície de cupons de aço inoxidável, por uma única espécie e por múltiplas espécies, quando incubadas a diferentes temperaturas e tempos.

2.1.2 Preparo dos inóculos formados por múltiplas espécies

As co-culturas foram formadas com base nos microrganismos isolados de cada sobremesa láctea. A co-cultura 1 (CC1), foi formada por três microrganismos *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. parabrevis* isoladas da Sobremesa Láctea Cremosa Sabor Chocolate; a co-cultura 2 (CC2), formada por quatro microrganismos *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, e *Bacillus sp.* isolados de sobremesa láctea Queijo Petit Suisse com Preparado de Frutas e, a co-cultura 3 (CC3), formada por três microrganismos *B. tequilensis*, *B. subtilis* e *Bacillus sp.* isolados de Sobremesa Láctea com Calda Sabor Artificial Caramelo.

Foi preparado 1 mL de cada co-cultura. A CC1 continha 333 μL do homogenato padronizado $1,0 \times 10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,010$) de cada microrganismo; a CC2 continha

250 µL do homogenato padronizado de cada microrganismo, e a CC3 continha 333 µL do homogenato padronizado de cada microrganismo.

2.1.3 Preparo e limpeza dos cupons de aço inoxidável

Foram empregados cupons de aço inoxidável (AISI #304) com dimensões 1 cm x 1 cm x 0,1 cm e preparados seguindo a metodologia Da Silva (2018). Primeiramente, os cupons foram lavados com detergente líquido neutro e enxaguados em água destilada. Após a lavagem, foram imersos em álcool 70 % (v/v) durante 30 min com o intuito de remover resíduos de gordura na superfície e logo, foram imersos em solução de NaOH 1 % (m/v) por 60 min. Seguidamente, com o auxílio de uma pinça, os cupons foram retirados da solução de NaOH 1 % (m/v) e enxaguados novamente com água destilada. Após a completa secagem ao ar, os cupons finalmente foram embalados e esterilizados a 121 °C por 15 min.

2.2 Determinação da formação de biofilmes multiespécies

A capacidade de formação de biofilme de cada co-cultura foi avaliada em caldo Nutriente (*Nutrient Broth* - KASVI®, Espanha), preparado conforme instruções do fabricante, empregando cupons de aço inoxidável preparados, limpos e esterilizados (2.1.3) e, placas de poliestireno de 24 poços de 2 mL.

As placas de 24 poços contendo os cupons de aço inoxidável foram inoculadas com um volume total de 1 mL do homogenato da co-cultura. Seguidamente, as placas foram incubadas às temperaturas de 6 ± 1 , 15 ± 1 , 25 ± 1 e 32 ± 1 °C e, a quantificação celular foi realizada em intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h, além da troca do caldo Nutriente (*Nutrient Broth* - KASVI®, Espanha) a cada 24 h. As temperaturas testadas foram selecionadas por estar relacionadas com a faixa de temperaturas nas quais as espécies podem ser expostas durante processamento, obtenção de produtos lácteos e, ou higienização e sanitização dos equipamentos.

Finalizado cada período de incubação, os cupons foram transferidos, com o auxílio de uma pinça esterilizada, de um poço para outro contendo 1,0 mL de solução salina peptonada em relação 0,8:0,1 % (m/v) e mantidos nesta solução por 1 min para remoção das células planctônicas. Em seguida, os cupons foram imersos em tubos Falcon contendo 10 mL de solução salina peptonada na mesma concentração e, submetidos ao ultrassom (Vibra Cell,

Newtown, EUA) em modo contínuo e operante (130 W 20 kHz) durante 10 min para remoção das células sésseis. Logo, as suspensões foram homogeneizadas em vórtex e realizadas diluições seriadas. Finalmente, alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas em ágar Padrão para Contagem (*Plate Count Agar - PCA*) (KASVI®, Espanha) pela técnica de *spread plate* e incubadas a 32 ± 1 °C por 24 h. As colônias foram enumeradas e os resultados expressos em $\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, conforme a Equação 1. Os experimentos foram realizados em duas repetições em triplicata.

$$\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2} = \frac{N \cdot D \left(\frac{V}{P}\right)}{A} \quad \text{Equação (1)}$$

Na qual: N = média da contagem de colônias 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.

2.3 Desenvolvimento de modelos para prever a formação de biofilmes multiespécies

Os dados obtidos dos experimentos de formação de biofilmes (contagens bacterianas) foram considerados como biofilmes microbianos quando as contagens foram maiores a $5 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ (DA SILVA et al., 2022). Posteriormente, foram transformados em dados binários (0: não formação de biofilme, 1: formação de biofilme) e utilizados para desenvolvimento de modelos para prever os limites de formação de biofilme. Para tanto, o modelo de regressão logística (Equação 2) foi ajustado aos dados binários.

$$\text{Logit}(P) = \text{Ln} \left(\frac{p}{1-p} \right) = g(x) = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 T + \beta_3 Tt + \beta_4 t^2 + \beta_5 T^2 \quad \text{Equação (2)}$$

Na qual: P é a probabilidade de adesão e formação de biofilme (na faixa de 0 – 1);

t , e T (°C) são o tempo e temperatura, respectivamente;

$\beta_0 - \beta_5$ são os coeficientes a serem estimados pelo ajuste aos dados experimentais.

O modelo foi ajustado usando o programa estatístico Minitab v.12.1. O desempenho de cada modelo foi avaliado pelo índice estatístico de Nagelkerke R^2 , porcentagem (%) de dados corretos e o índice estatístico de Hosmer-Lemeshow. Igualmente com a Equação 2 foram calculadas as probabilidades de formação de biofilme. Além disso, tempos críticos para que ocorra a adesão foram calculados, com 0,05 % de nível de probabilidade.

2.4 Análises experimentais do desempenho dos modelos preditivos desenvolvidos

Os modelos de regressão, para cada co-cultura foram validados. Essa validação foi realizada em caldo BHI envolvendo oito experimentos de combinações não testadas na construção dos modelos: duas temperaturas, 8 ± 1 °C e 30 ± 1 °C durante 0, 23, 31, 48 e 56 h, seguindo a metodologia descrita no item 2.2. Finalmente, as colônias foram enumeradas e os resultados expressos em $\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, conforme a Equação 1.

3. Resultados e discussão

3.1. Formação de biofilme multiespécies

A adesão e formação de biofilmes para os três mixes bacterianos avaliados foram mais robustas à temperatura de 32 °C, apresentando aumento de $3,0 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ quando comparado à temperatura de 25 °C, com incrementos de $1,5 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. Em relação à temperatura de 6 °C os incrementos foram apenas de $1,0 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. Sendo assim, quando a temperatura de análise encontrou-se mais próxima à faixa ótima de crescimento das espécies de cada co-cultura (32 °C) e, os tempos de incubação foram maiores, o crescimento bacteriano e adesão celular foram maiores.

Segundo as contagens bacterianas após dos diferentes tempos de incubação dos mixes, evidenciou-se que a maior média de crescimento foi para a CC1 ($6,4 \log \cdot \text{cm}^{-2}$), seguidos da CC2 ($6,2 \log \cdot \text{cm}^{-2}$) e, CC3 ($5,8 \log \cdot \text{cm}^{-2}$). Em relação aos tempos de incubação, durante as 24

e 48 h, a diferença no crescimento bacteriano foi de $0,5 \text{ log.cm}^{-2}$, após 48 h de incubação apresentou um aumento na multiplicação bacteriana de $1,1 \text{ log.cm}^{-2}$. Finalmente, evidenciou-se que a temperatura de incubação teve um efeito na capacidade de multiplicação bacteriana, o qual demonstra que a formação de biofilme multiespécies foi afetada por esta diretamente. Já na temperatura de $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a média de crescimento bacteriano foi menor ($4,7 \text{ log.cm}^{-2}$) quando comparada com o crescimento apresentado nas outras temperaturas. Em relação às temperaturas de $15, 25$ e $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ os valores de crescimento bacteriano foram $6,6, 6,8$ e $6,4 \text{ log.cm}^{-2}$, respectivamente.

De igual forma, as diferenças entre as contagens bacterianas durante a avaliação da adesão e formação dos biofilmes das co-culturas 1, 2 e 3 sob as mesmas condições experimentais, indicaram que a concentração de cada espécie ou comunidade não foi estável durante os cinco dias de análises, demonstrando que no desenvolvimento de biofilmes mistos, as expressões gênicas e, conseqüentemente, as características fenotípicas exercem um papel fundamental na ocorrência das interações entre célula-célula. Ou seja, no momento do contato físico (interação) e, ou da comunicação celular *quorum sensing*, pois, algumas espécies que não têm a capacidade de formar biofilmes isoladamente, podem promover o aumento de biomassa em biofilmes mistos (REN et al., 2015).

Assim também, as interações antagônicas e sinérgicas podem influenciar o desenvolvimento das comunidades bacterianas, pois, podem ajudar no crescimento de uma espécie e, ou cepa predominante que influencie a coexistência dos microrganismos (YUAN et al., 2020; WANG et al., 2021) e, conseqüentemente a formação do biofilme multiespécies (ZHAO et al., 2018; YUAN et al., 2020). Nesse sentido, as interações sinérgicas, podem permitir a adesão de estirpes com pouca capacidade para crescer de forma séssil, pois, algumas espécies podem servir como “bactérias ponte” e, ajudar e, ou melhorar à incorporação de diversas espécies, inclusive espécies patogênicas nos biofilmes formados por múltiplas espécies (GUO et al., 2016). Por outro lado, as interações antagônicas ou de competição, podem diminuir a concentração populacional, afetar a sobrevivência e, ou reprodução celular (REN et al., 2015).

Por exemplo, a competição pode ser de exploração, quando um microrganismo consome ou impede o acesso ao recurso limitante, sem a interação entre os indivíduos das diferentes espécies. Essa competição é indireta e apresenta-se por nutrientes e, ou oxigênio disponíveis, além do espaço disponível para colonizar. Por outro lado, a competição pode ser de interferência, quando os indivíduos se prejudicam diretamente, pela síntese de compostos bioativos como bacteriocinas, antibióticos, ácidos orgânicos, biosurfactantes e, ou enzimas

(BRAGA, DOURADO e ARAÚJO, 2016; FLEMMING et al., 2016). Esse tipo de substâncias, têm a capacidade de alterar as condições extrínsecas como pH, acidez, pressão osmótica, concentração de gases, temperatura, ou bloquear os receptores da superfície celular envolvidos em diversos processos celulares de comunicação, transporte, entre outros e, inibir a multiplicação e, ou causar a morte do microrganismo (REN et al., 2015).

Por outro lado, a 6 °C, a temperatura mais baixa de incubação, a formação de biofilmes tomou mais tempo quando comparada com as outras temperaturas avaliadas. No caso da CC3 a formação do biofilme ocorreu às 72 h e, no caso das CC1 e CC2 a formação foi observada após 96 h com contagens de 5,2 e 5,9 log UFC·cm⁻², respectivamente.

A 15 °C, a formação de biofilmes nos mixes 1 e 2 ocorreu 72 h de incubação, atingindo contagens bacterianas de 7,4 e 7,3 log UFC·cm⁻², respectivamente e, no caso da CC3 a formação ocorreu com 24 h de incubação atingindo a concentração de 8,4 log UFC·cm⁻².

A 25 °C, os três mixes apresentaram formação de biofilmes depois de 24 h de incubação com 8,4; 8,8 e 5,1 log UFC·cm⁻² para CC1, CC2 e CC3 respectivamente. Mas foi a temperatura na qual se quantificaram maiores diferenças de concentração bacteriana. Depois de 72 h de incubação as concentrações passaram a 7,1 log UFC·cm⁻² para as co-culturas 1 e 3 e, para 7,0 log UFC·cm⁻² para a co-cultura 2. Finalmente, à temperatura de 32 °C a formação de biofilme foi determinada 48 h nas três co-culturas com concentrações de 7,2; 8,5 e 8,6 log UFC·cm⁻², respectivamente.

Nas imagens das figuras 1, 2 e 3 tomadas por microscopia eletrônica de varredura, visualiza-se a formação exopolissacarídeos (EPS) pelas três co-culturas avaliadas, após 24 e 46 h de incubação a 30 °C. Observa-se o aumento de EPS, dimensão e espessuras dos biofilmes, assim como o aumento da biomassa celular no maior tempo de incubação.

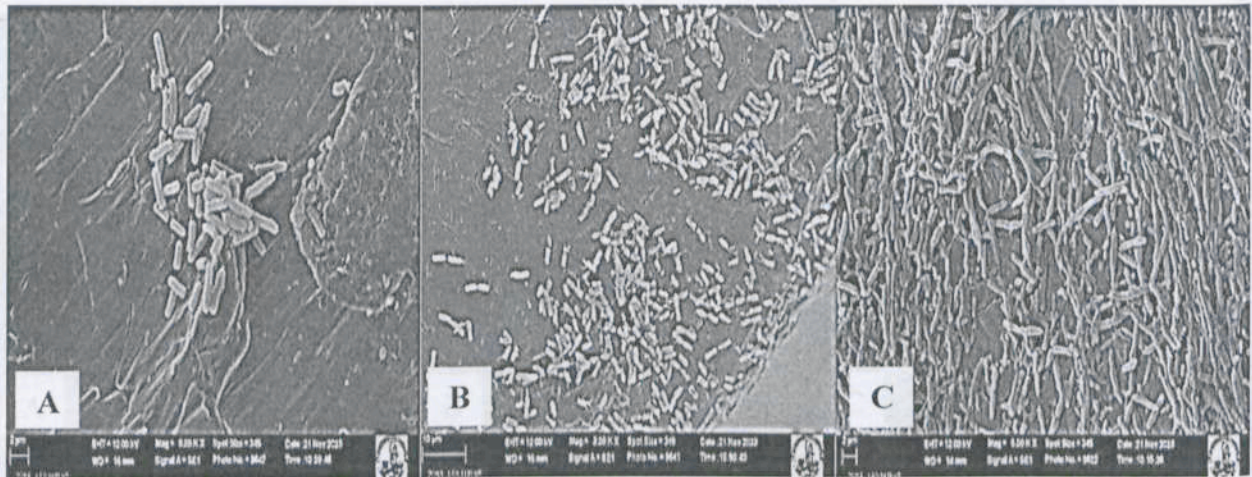


Figura 1. Biofilme multiespécie formado por *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. parabrevis* em co-cultura incubada a 30 °C durante 24 h (A) e durante 46 h a diferentes aumentos 2,0 e 10,0 K X, respectivamente (B e C).

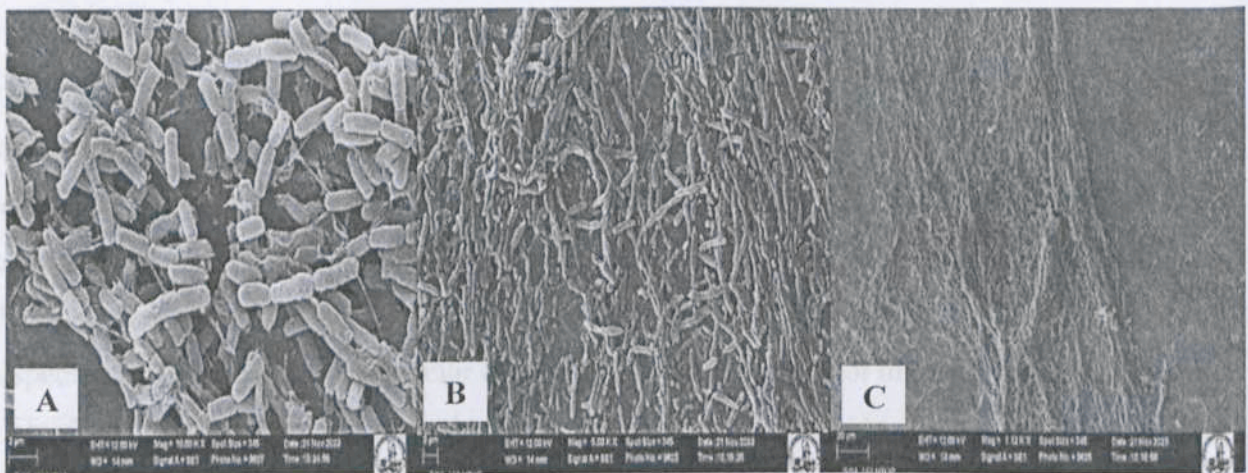


Figura 2: Biofilme multiespécie formado por *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, e *Bacillus* sp. em co-cultura incubada a 30 °C durante 24 h (A) e durante 46 h a diferentes aumentos 2,0 e 10,0 K X, respectivamente (B e C).

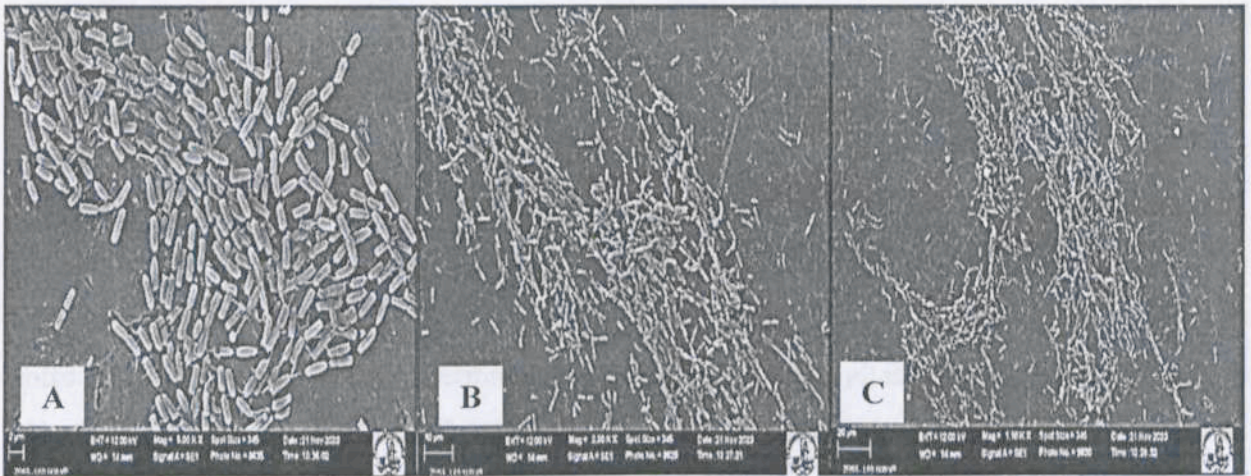


Figura 3. Biofilme multiespécie formado por *B. tequilensis*, *B. subtilis* e *Bacillus* sp. em co-cultura incubada a 30 °C durante 24 h (A) e durante 46 h a diferentes aumentos 2,0 e 10,0 K X, respectivamente (B e C).

Resultados similares foram evidenciados por Wang e colaboradores (2021), quando avaliaram a capacidade de formação de biofilmes multiespécies em leite desnatado reconstituído (LDR) na superfície de aço inoxidável por *B. licheniformis* + *G. stearothermophilus*, *B. licheniformis* + *B. subtilis*, *B. licheniformis* + *A. flavithermus*, *G. stearothermophilus* + *B. subtilis*, *G. stearothermophilus* + *A. flavithermus* e, *B. subtilis* + *A. flavithermus*, obtendo contagens de 5,39; 5,20; 5,89; 5,22; 4,39 e 3,41 log UFC.cm⁻², respectivamente, além de, evidenciar que a biomassa bacteriana foi menor, quando comparada à obtida na formação de biofilmes de uma única espécie. Igualmente, as contagens bacterianas dos biofilmes de duas espécies também apresentaram diferenças, evidenciando assim a ocorrência de interações sinérgicas ou antagônicas entre estas.

Nas três co-culturas estudadas, predominam espécies do gênero *Bacillus*, especificamente *B. subtilis* e *B. cereus*, sendo este último, um dos microrganismos de maior preocupação na indústria de alimentos (DA SILVA et al., 2022) e, que se destaca por estar presente na indústria de produtos lácteos, uma vez que, além de ser capaz de formar esporos e toxinas, também tem a capacidade de se aderir e formar biofilmes, principalmente na interface ar-líquido (MAJED et al., 2016), mas também algumas cepas em superfícies submersas (tanques e tubulações de aço inoxidável) (WIJMAN et al., 2007; HAYRAPETYAN et al., 2015). Sendo que, em ambas condições, a motilidade flagelar está envolvida no desenvolvimento do biofilme, já que, facilita a colonização, movimentação e, migração de

células planctônicas por longas distâncias ao longo da tubulação dos diferentes equipamentos empregados na produção de alimentos (HOURY et al., 2010).

Da Silva et al. (2022), ao avaliarem a adesão e formação de biofilmes em aço inoxidável de três estirpes de *B. cereus* isoladas de produtos lácteos, quando submetidas a diferentes combinações de pH (4,5; 6,0; 7,5 e 9,0) e temperaturas (5, 15, 25 e 32 °C) de incubação, obtiveram resultados similares aos desta pesquisa. Uma vez que, evidenciaram a formação de biofilmes por estas estirpes aos 25 e 32 °C, nos pHs de 6,0; 7,5 e 9,0 com contagens bacterianas entre 5,9 a 6,67 log UFC.cm⁻². Permitindo-lhes concluir que as altas temperaturas e valores de pH neutros ou mais elevados, influenciam e favorecem os processos de adesão e formação de biofilmes. Igualmente, outros pesquisadores como Hayrapetyan et al. (2015) e Sadiq et al. (2017), têm evidenciado a capacidade de formação de biofilme por 21 estirpes de *B. cereus* e, por 148 cepas formadoras de esporos mesófilas ou termófilas, respetivamente.

Algumas características fisiológicas específicas de *B. cereus*, permitem às células planctônicas contribuir na formação inicial do biofilme e, conseqüentemente facilitam significativamente o desenvolvimento de biofilmes multiespécies, como foi evidenciado nesta pesquisa nas temperaturas de 25 e 32 °C nas três co-culturas estudadas. Na literatura, os biofilmes formados por *B. cereus* são frequentemente associados a outros microrganismos ao longo das linhas de processamento de alimentos (MAJED et al., 2016). Essa associação é favorecida por sua complexa matriz de exopolissacarídeos, proteínas e DNA extracelular.

Marchand e colaboradores (2012), reportaram que a fixação inicial de *B. cereus* nas superfícies dos equipamentos causa um efeito de pré-condicionamento, o que facilita uma adesão rápida de outras espécies bacterianas, que possivelmente seriam removidas pelo fluxo de água, correntes de leite ou outros mecanismos físicos durante o processamento de produtos lácteos. Do mesmo modo, Shaheen et al. (2010), demonstraram que a formação de biopelículas por *B. cereus* é intensificada sob condições de estresse nutricional e, na presença de substâncias biosurfactantes. No caso específico do leite e seus derivados lácteos, a presença de surfactantes naturais, fosfolípidios e compostos tensoativos que se encontram no glóbulo de gordura, possibilita a colonização dos equipamentos de aço inoxidável.

Deste modo, a presença e formação de biofilmes multiespécies por diferentes espécies formadoras de esporos e termodúricas na indústria de sobremesas lácteas, é um tópico amplamente desconhecido que precisa ser estudado (YUAN et al., 2020). Portanto, a aplicação da microbiologia preditiva e o desenvolvimento de modelos matemáticos, como os probabilísticos, podem ajudar a elucidar a ocorrência desta forma de crescimento celular,

desenvolver e, ou melhorar os processos de sanitização e, ou higienização e, que são relevantes no controle de sua ocorrência e a manutenção da qualidade dos diferentes produtos lácteos, como os estudados nesta pesquisa.

3.2 Modelos probabilísticos de regressão logística

As respostas binárias de formação de biofilme pelas co-culturas 1, 2 e 3, testadas em função da temperatura para um período de 24 a 120 h, são apresentadas na Tabela 1, na qual, as respostas correspondem a (0) para biofilme não formado e (1) para biofilme formado.

Tabela 1. Resposta de formação de biofilme dos três mixes bacterianos avaliados em função do tempo e temperatura.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	CC1		CC2		CC3	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2
6	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	1	0	0	0
	96	1	0	1	1	0	0
	120	1	0	0	1	1	0
15	24	1	0	1	1	1	0
	48	0	1	1	1	0	1
	72	1	1	1	1	1	1
	96	1	1	1	1	1	1
	120	1	1	1	1	1	1
25	24	1	1	1	1	1	0
	48	1	1	0	1	0	1
	72	1	1	1	1	1	1
	96	1	1	1	1	1	1
	120	1	1	1	1	1	1
32	24	1	0	1	0	1	0
	48	1	1	1	1	1	1
	72	1	1	1	1	1	1
	96	1	1	1	1	1	1
	120	1	1	1	1	1	1

CC1: Co-cultura 1. CC2: Co-cultura 2. CC3: Co-cultura 3. R1: Repetição 1, R2: Repetição 2, 0: Não formação de biofilme, 1: formação de biofilme.

De forma geral, as três co-culturas estudadas tiveram a capacidade de formar biofilmes multiespécies a diferentes temperaturas e tempos de incubação avaliados. A co-cultura 2 foi a única capaz de formar biofilmes em todas as temperaturas testadas, evidenciando assim, que o número de espécies presentes no ambiente ou meio, tem um papel fundamental na formação do biofilme. Isso pode ser verificado quando comparando a co-cultura 2, contendo 4 espécies, com as co-culturas 1 e 3, onde foram utilizadas 3 espécies. De forma particular, na temperatura de 15 °C a formação de biofilme ficou evidente em 72 h de incubação, para as CC1 E CC3 e após 24 h de incubação para a CC2. Em relação às temperaturas de 25 e 32 °C, a formação de biofilmes se apresentou após 24 h de incubação pelos três mixes bacterianos.

Outras pesquisas relacionadas com a avaliação da formação de biofilmes, têm empregado as respostas binárias, para descrever a região de interface de adesão/não adesão e formação de biofilmes/não formação de biofilmes sob diferentes condições experimentais por espécies como *B. cereus* (DA SILVA et al., 2022), *Listeria monocytogenes* (GYSEMANS et al., 2007; GWAK et al., 2015; HU et al., 2022), *Salmonella entérica* (MORAES et al., 2018), como uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento de modelos matemáticos.

3.2.1 Desenvolvimento da modelagem probabilística

Os dados binários foram ajustados a um modelo polinomial usando regressão logística, e os coeficientes obtidos foram utilizados para desenvolver os modelos probabilísticos (Tabela 2).

Tabela 2. Coeficientes dos modelos probabilísticos para as três co-culturas bacterianas estudadas.

Biofilme CC1			
Variável	Coefficiente estimado	Desvio padrão	p-valor
Constante	-9,353	4,650	0,040
Tempo	0,061	0,035	0,040
Temperatura	0,309	0,140	0,030
Biofilme CC 2			
Variável	Coefficiente estimado	Desvio padrão	p-Valor
Constante	-3,421	2,010	0,080
Tempo	0,020	0,010	0,040
Temperatura	0,147	0,060	0,050

Biofilme CC 3

Variável	Coefficiente estimado	Desvio padrão	p-valor
Constante	-9,733	4,540	0,030
Tempo	0,068	0,033	0,040
Temperatura	0,246	0,118	0,030

Em seguida, com os dados da Tabela 2 foram geradas as equações matemáticas 3, 4 e 5 para explicar a formação dos biofilmes pelas co-culturas 1, 2 e 3, respectivamente na superfície de aço inoxidável, mantendo apenas os termos significativos para as variáveis estudadas tempo e temperatura.

$$g(x) = -9,353 + 0,061 * t + 0,309 * T \quad \text{Equação (3)}$$

$$g(x) = -3,421 + 0,020 * t + 0,141 * T \quad \text{Equação (4)}$$

$$g(x) = -9,733 + 0,068 * t + 0,246 * T \quad \text{Equação (5)}$$

Os parâmetros estatísticos do ajuste do modelo (Tabela 3), indicaram que a porcentagem de concordância, para o modelo da Equação 3 (CC1) foi de 85 %, para o modelo da Equação 4 (CC2) de 80 % e, para o modelo da Equação 5 (CC3) de 85 %. Estas porcentagens determinam as concordâncias entre os valores preditos pelos modelos e os dados experimentais obtidos. Em relação aos valores, de R^2 , estes foram de 0,74; 0,50 e 0,70 para as equações 3, 4 e 5 respectivamente, e o teste de Hosmer e Lemeshow todos os valores $> 0,05$. Esse último parâmetro estatístico é usado para variáveis de respostas binárias associando o valor de x-quadrado de Hosmer-Lemeshow e um valor de p. Valores pequenos de p significam que o ajuste não foi bom, assim para grandes valores de p o modelo se ajusta bem os dados (VERMEULEN et al., 2009; HOSMER e LEMESHOW, 2013).

Tabela 3. Parâmetros estatísticos para os modelos implementados.

Parâmetros estatísticos	Equação 1 (CC 1)	Equação 2 (CC 2)	Equação 3 (CC 3)
Porcentagem de concordância (%)	85	80	85
R^2 – Negelkerke	0,74	0,50	0,70
Teste de Hosmer e Lemeshow	0,81	0,74	0,90

Diversas pesquisas têm sido realizadas para avaliar o ajuste dos modelos probabilísticos para espécies do gênero *Bacillus* na adesão e formação de biofilmes, bem como para outros gêneros. Da Silva et al., (2022), avaliaram modelos probabilísticos de regressão logística para determinar o efeito do pH e temperatura na adesão e formação de biofilmes em aço inoxidável por diferentes estirpes de *B. cereus*. Moraes et al., (2018), avaliaram o ajuste da modelagem probabilística de formação de biofilmes por *S. entérica* em função do pH, temperatura e concentração de NaCl ao determinar valores de Nagelkerke $R^2 > 0,80$. Gysemans et al., (2007), também determinaram o ajuste dos modelos crescimento/não crescimento de *L. monocytogenes*, sob diferentes condições de atividades de água, pH e concentração de ácido acético implementando esses parâmetros.

Com as equações obtidas (3, 4 e 5) nas suas formas logísticas, foram calculadas as probabilidades de formação de biofilme em superfície de aço inoxidável por cada uma das co-culturas bacterianas avaliadas (Figura 4).

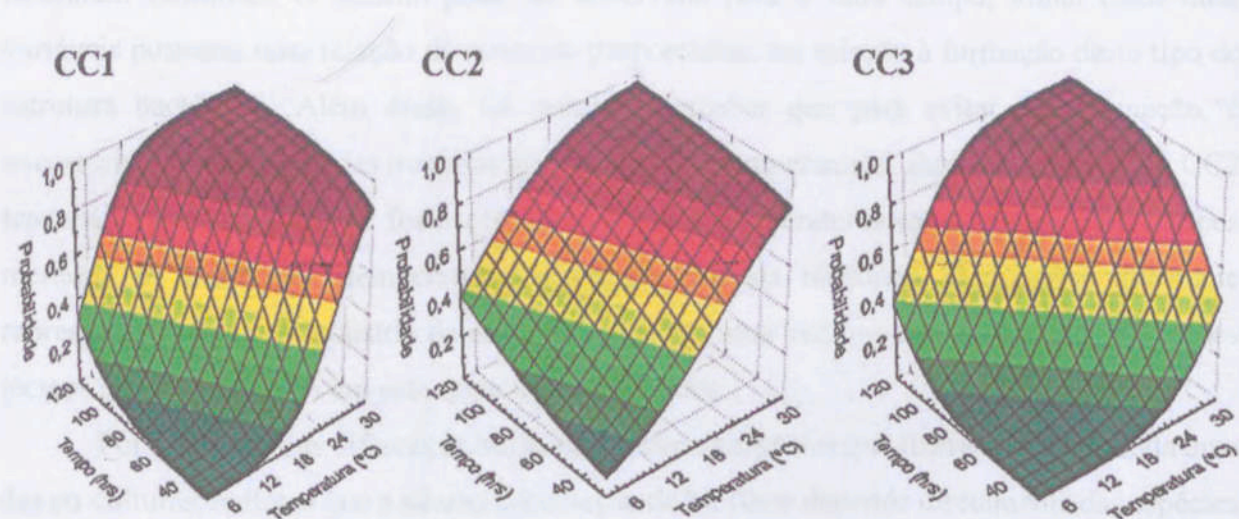


Figura 4. Probabilidades de formação de biofilmes pelas co-cultura 1, 2 e 3 em 120 h, previstas pelo modelo probabilístico de regressão logística gerado pelas Equações 3, 4 e 5, respectivamente. **CC1:** Co-cultura 1. **CC2:** Co-cultura 2. **CC3:** Co-cultura 3.

De acordo com os modelos desenvolvidos, as probabilidades de formação dos biofilmes conseguem auxiliar na determinação de alguns valores críticos para as diferentes co-culturas avaliadas. Por exemplo, a CC1, na temperatura 6 °C atingira a probabilidade (P) de formação de biofilme de 0,051 após de 75 h de incubação, uma $P=0,118$ após de 90 h de incubação e, uma $P=0,501$ após de um período de incubação de 123 h. Quando a CC1 seja incubada a 12 °C, a formação de biofilme tem uma $P=0,052$ às 45 h de incubação, a partir das 57 h uma $P=0,103$

e, a partir das 93 h uma $P=0,507$. A partir da temperatura de 23 °C a CC1, mesmo no tempo zero de incubação se atinge uma $P=0,10$, e aos 30 °C uma $P \geq 0,479$, valores críticos que conseguem comprometer a qualidade da matéria-prima ou do produto final.

Em relação à CC2, a probabilidade de formação de biofilme a 6 °C mesmo no tempo zero de incubação é $P=0,07$; às 17 h, já se atinge o valor crítico de $P=0,100$ e, às 130 h. uma $P=0,506$. A 9 °C no tempo zero de incubação já se consegue atingir uma $P=0,104$, aos 24 °C uma $P \geq 0,491$ e, aos 30 °C uma $P \geq 0,692$.

Segundo o modelo da CC3, na temperatura de 6 °C, a probabilidade de formação de biofilme às 78 h de incubação é de $P=0,049$, às 90 h a $P=0,1056$ e, às 120 h $P=0,4758$. Nos tempos zero de incubação a 24 °C a $P= 0,021$ e, a 30 °C uma $P \geq 0,087$. Para atingir uma $P \geq 0,507$ são necessárias 35 h de incubação.

Evidenciou-se por meio dos modelos probabilísticos de regressão logística desenvolvidos, que quanto maior a temperatura maior é a probabilidade das co-culturas de formarem biofilmes. O mesmo pode ser observado para o fator tempo, afinal essas duas variáveis possuem uma relação diretamente proporcional em relação à formação deste tipo de estrutura bacteriana. Além disso, foi possível perceber que para evitar sua formação, é necessária a manutenção das matérias primas a baixas temperaturas. Então, nota-se que a CC2 tem maior probabilidade de formação de biofilme a temperaturas mais baixas e em tempos menores de incubação (temperaturas e tempos críticos menores). Resultados altamente representativos para a indústria de alimentos lácteos, uma vez que são diversos os derivados lácteos que se produzem em esta faixa de temperaturas.

Por outro lado, as diferenças intrínsecas entre as espécies que fizeram parte de cada uma das co-culturas, indicam que a adesão e formação de biofilme depende diretamente das espécies envolvidas. Pois, além de definir suas características fisiológicas, estão igualmente relacionadas com os tipos de interações que ocorrem na comunidade bacteriana e, conseqüentemente com o potencial para formação dos biofilmes multiespécies. Evidenciando-se assim, a importância de estudar os microrganismos no mesmo ambiente que são isolados, sem generalizar o gênero e a espécie bacteriana. De tal modo que, determinar o procedimento de higienização e, ou sanitização seja mais eficiente e, possam ser realizados antes que se apresente o risco de formação dos biofilmes.

3.3 Validação dos modelos desenvolvidos

A validação do desempenho e confiabilidade dos modelos probabilísticos de regressão logística, gerados com os dados da quantificação do crescimento bacteriano das diferentes co-culturas, foram avaliados frente a combinações diferentes de temperatura e tempo não testados na construção dos modelos (8 ± 1 °C e 30 ± 1 °C durante 0, 23, 31, 48 e 56 h) e são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Validação dos modelos de probabilidade de formação de biofilmes em caldo nutriente.

Temperatura °C	Tempo(h)	CC1		CC2		CC3	
		Observado	Predito	Observado	Predito	Observado	Predito
8	23	0	0,004	0	0,138	0	0,002
	31	0	0,007	0	0,158	0	0,003
	48	0	0,019	0	0,209	0	0,011
	56	0	0,030	1	0,236	0	0,019
30	23	1	0,789	1	0,781	1	0,312
	31	1	0,859	1	0,807	1	0,439
	48	1	0,945	1	0,854	1	0,713
	56	1	0,966	1	0,873	1	0,811

CC1: Co-cultura 1. **CC2:** Co-cultura 2. **CC3:** Co-cultura 3. **0:** Não formação de biofilme,

1: formação de biofilme.

Pode-se observar pelos dados da Tabela 4 que para a temperatura de incubação de 8 °C não se apresentou formação de biofilme com exceção da CC2 com 56 h de incubação. Os valores preditos pelas equações 2, 3 e 4 acompanharam esses resultados. Para a CC2, embora os resultados experimentais sejam de não formação de biofilme até 48 horas, o modelo previu probabilidade de ocorrência de biofilme de 0,138 até 0,209 entre as 23 e 48 h de incubação. Para a temperatura de 30 °C as três co-culturas formaram biofilme. As equações estimaram valores de probabilidade muito próximas de 1,0 para a CC1 e CC2. Para CC3 esses valores previstos foram de 0,312 a 0,811 entre os tempos de 23 a 56 horas respectivamente.

Na literatura, tem se evidenciado o uso de modelos probabilísticos para avaliar a formação de biofilmes por *B. cereus* em função do tempo e da temperatura por Bernardes et al.,

(2013), determinar o potencial de adesão e formação de biofilmes por *Escherichia coli* O157:H7 por Mendonça et al., (2012), estimar os efeitos do pH e atividade de água na capacidade de formação de biofilme por *Salmonella entérica* por Dimakopoulou-Papazoglou et al., (2016). Mas também, se tem empregado para estimar o tempo de inativação térmica dos esporos de *B. cereus* por Membré et al., (2006), na modelagem do efeito da pressão ácida e osmótica no crescimento e inativação de *Salmonella Enteritidis* por Shi et al., (2017), prever o crescimento e produção de aflatoxinas B1 por *Aspergillus flavus* em função do tempo e a temperatura por Aldars-García et al., (2016), caracterizar a dinâmica de migração de comunidades microbiana por Schroeder et al., (2015), para prever o potencial de multiplicação bacteriana sob diferentes condições extrínsecas de crescimento por Georgie et al., (2015), entre outros.

Há muitas pesquisas que evidenciam a versatilidade do uso dos modelos probabilísticos na microbiologia de alimentos, corroborando sua implementação potencial na indústria de alimentos e assim ajudar a garantir a qualidade microbiológica de diversos produtos. No entanto, para descrever a probabilidade de formação de biofilmes multiespécies ainda há poucos trabalhos publicados até o momento.

4. Conclusões

Os modelos desenvolvidos para predição dos limites de formação de biofilme para a CC1, formada por *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. parabrevis*; a CC2, formada por *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *Bacillus* sp e, a CC3 formada por *B. tequilensis*, *B. subtilis* e *Bacillus* sp., podem ser considerados adequados para avaliação da formação de biofilmes multiespécies em aço inoxidável em diferentes tempos e variações de temperaturas.

É possível concluir que a temperatura e o tempo afetaram a probabilidade de formação de biofilmes multiespécies pelos mixes estudados, embora não se tenha evidenciado interações entre estas duas variáveis. Dentre as co-culturas, a CC2 parece ser a que possui mais facilidade de formação de biofilme e os modelos probabilísticos de regressão logística descreveram bem o comportamento destes microrganismos em co-cultura, como foi demonstrado pelos índices estatísticos, que evidenciaram o efeito sinérgico da temperatura e do tempo na formação de biofilme microbiano.

5. Referências

- ALDARS-GARCÍA, Laila et al. Modelling the probability of growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* under changing temperature conditions in pistachio nuts. **Procedia Food Science**, v. 7, p. 76-79, 2016.
- ALLEN, A.; HABIMANA, O.; CASEY, E. The effects of extrinsic factors on the structural and mechanical properties of *Pseudomonas fluorescens* biofilms: A combined study of nutrient concentrations and shear conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 165, p. 127–134, 2018.
- ALONSO, Vanessa Pereira Perez; DE OLIVEIRA MORAIS, Jéssica; KABUKI, Dirce Yorika. Incidence of *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans* and *Geobacillus stearothermophilus* in ultra-high temperature milk and biofilm formation capacity of isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 354, p. 109318, 2021.
- ANDRÉ, S; VALLAEYS, Tatiana; PLANCHON, Stella. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 4, p. 379-387, 2017.
- BERNARDES, Patricia Campos et al. 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.
- BRAGA, Raíssa Mesquita; DOURADO, Manuella Nóbrega; ARAÚJO, Welington Luiz. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 86-98, 2016.
- CAMARGO, Anderson Carlos et al. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 11, p. 623-636, 2017.
- CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. A review of the biomaterial's technologies for infection-resistant surfaces. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8533– 8554, 2013.

CARRASCO, Elena et al. A review on growth/no growth Salmonella models. **Food research international**, v. 47, n. 1, p. 90-99, 2012.

COUGHLAN, Laura M. et al. New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1641, 2016.

DA SILVA, Mírian Pereira. EFEITO DO pH E TEMPERATURA NA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Bacillus cereus* EM AÇO INOXIDÁVEL. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2018.

DA SILVA, Mírian Pereira et al. Modelling adhesion and biofilm formation by *Bacillus cereus* isolated from dairy products as a function of pH, temperature and time. **International Dairy Journal**, v. 134, p. 105472, 2022.

DE OLIVEIRA, Maíra M. M.; BRUGNERA, Danilo F.; PICCOLI, Roberta H. Biofilms in the dairy industries: general aspects and the use of essential oils as a new control alternative. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 390, p. 65-73, 2013.

DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLU, Dafni; LIANOU, Alexandra; KOUTSOUMANIS, Konstantinos 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.

DULA, Stanley; AJAYEOBA, Titilayo Adenike; IJABADENIYI, Oluwatosin Ademola. Bacterial biofilm formation on stainless steel in the food processing environment and its health implications. **Folia Microbiologica**, v. 66, p. 293-302, 2021.

DUQUE-RODRÍGUEZ, A. D.; CORDEIRO, A. de A.; CALDEIRA, E. C.; OLIMPIO, B. R.; FERNANDES, P. E.; PENA, W. E. L. Occurrence of spore-forming bacterial in brazilian dairy desserts. **Caderno Pedagógico, [S. l.]**, v. 20, n. 7, p. 2792-2813, 2023. doi: 10.54033/cadpedv20n7-019.

- FLEMMING, Hans-Curt et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.
- GALIE, Serena et al. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 898, 2018.
- GEORGE, S. M.; MÉTRIS, A.; BARANYI, J. Integrated kinetic and probabilistic modeling of the growth potential of bacterial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 9, p. 3228-3234, 2015.
- GIAOURIS, Efstathios et al. Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 841, 2015.
- GUO, Ailing et al. *Ralstonia insidiosa* induces cell aggregation of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 67, p. 303-309, 2016.
- GYSEMANS, Kristel PM et al. Exploring the performance of logistic regression model types on growth/no growth data of *Listeria monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, v. 114, n. 3, p. 316-331, 2007.
- GWAK, Eunji et al. Probabilistic models to predict *Listeria monocytogenes* growth at low concentrations of NaNO₂ and NaCl in frankfurters. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 6, p. 815, 2015.
- HAYRAPETYAN, Hasmik et al. Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 72-79, 2015.
- HOSMER JR, David W. Model-building strategies and methods for logistic regression. **Applied logistic regression**, p. 89-151, 2013.
- HOURY, Ali et al. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. **Microbiology**, v. 156, n. 4, p. 1009-1018, 2010.

- HU, Lili et al. Modelling the Adhesion and Biofilm Formation Boundary of *Listeria monocytogenes* ST9. **Foods**, v. 11, n. 13, p. 1940, 2022.
- KHAN, M. S. I.; LEE, E.; KIM, Y. A submerged dielectric barrier discharge plasma inactivation mechanism of biofilms produced by *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii*, and *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 37072, 2016.
- LÜCKING, Genia et al. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. **International journal of food microbiology**, v. 166, n. 2, p. 270-279, 2013.
- MACHADO, Solimar G. et al. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 302, 2017.
- MAJED, Racha et al. *Bacillus cereus* biofilms—same, only different. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1054, 2016.
- MARCHAND, Sophie et al. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 133-147, 2012.
- MEESILP, Nutthawut; MESIL, Nutthisha. Effect of microbial sanitizers for reducing biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel by cultivation with UHT milk. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, p. 289-296, 2019.
- MEMBRÉ, J.-M. et al. A probabilistic modeling approach in thermal inactivation: estimation of postprocess *Bacillus cereus* spore prevalence and concentration. **Journal of food protection**, v. 69, n. 1, p. 118-129, 2006.
- MENDONÇA, Regina Célia Santos et al. Prediction of *Escherichia coli* O157: H7 adhesion and potential to form biofilm under experimental conditions. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 389-396, 2012.

MORAES, Juliana O. et al. 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.

MOSCHONAS, Galatios et al. Spoilage potential of *Bacillus subtilis* in a neutral-pH dairy dessert. **Food Microbiology**, v. 95, p. 103715, 2021.

ORTUZAR, J.; MARTINEZ, B.; BIANCHINI, A.; STRATTON, J.; RUPNOW, J.; WANG, B. Quantifying changes in spore-forming bacteria contamination along the milk production chain from farm to packaged pasteurized milk using systematic review and meta-analysis. **Food Control**, v. 86, p. 319-331, 2018.

O'TOOLE, G. A. To Build a Biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2687– 2689, 2003.

PENA, Wilmer Edgard Luera et al. 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.

QUIGLEY, Lisa et al. The complex microbiota of raw milk. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013.

REN, Dawei et al. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. **The ISME journal**, v. 9, n. 1, p. 81-89, 2015.

SCHROEDER, Joanna L. et al. Probabilistic models to describe the dynamics of migrating microbial communities. **Plos one**, v. 10, n. 3, p. e0117221, 2015.

SADIQ, Faizan A. et al. The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. **International journal of food microbiology**, v. 238, p. 193-201, 2016.

SADIQ, Faizan A. et al. Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. **International journal of food microbiology**, v. 262, p. 89-98, 2017.

SADIQ, Faizan A.; FLINT, Steve; HE, GuoQing. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 159-168, 2018.

SHAHEEN, Ranad et al. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. **Food microbiology**, v. 27, n. 3, p. 347-355, 2010.

SHI, Yujiao et al. Establishment of probabilistic model for *Salmonella Enteritidis* growth and inactivation under acid and osmotic pressure. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 4, p. 176-186, 2017.

TANG, L. et al. Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. **Biofouling**, v. 27, n. 1, p. 111-121, 2011.

VERMEULEN, An et al. Modelling the influence of the inoculation level on the growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of pH, aw and acetic acid. **International journal of food microbiology**, v. 135, n. 2, p. 83-89, 2009.

WANG, Ni et al. Development of multi-species biofilm formed by thermophilic bacteria on stainless steel immersed in skimmed milk. **Food Research International**, v. 150, p. 110754, 2021.

WIJMAN, Janneke GE et al. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1481-1488, 2007.

YUAN, Lei et al. Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 13, p. 2277-2293, 2020.

ZHAO, Xihong et al. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **RSC advances**, v. 7, n. 58, p. 36670-36683, 2017.

CONCLUSÃO GERAL

É importante ressaltar que a ocorrência de bactérias formadoras de esporos, capazes de formar biofilmes multiespécies, nas plantas de processamento de sobremesas lácteas, ainda representa um desafio para a indústria de laticínios. Essas bactérias continuam sendo encontradas em produtos lácteos, como é o caso das sobremesas lácteas e queijo petit suisse, e há a possibilidade de comprometer a qualidade microbiológica e físico-química do produto final. Dependendo da espécie envolvida, também pode representar riscos à saúde do consumidor.

Além disso, o isolamento dessas bactérias em sobremesas e queijos petit suisse comercializados em diferentes regiões do Brasil evidencia as falhas ainda presentes nos protocolos de higiene e sanitização. Isso demonstra a necessidade contínua de estudar e compreender as condições que favorecem o crescimento bacteriano. Neste sentido a microbiologia preditiva se torna uma poderosa ferramenta no desenvolvimento de modelos matemáticos probabilísticos de regressão logística que permitem prever a dinâmica da multiplicação bacteriana, conseguindo assim desenvolver estratégias de controle e protocolos de higienização e sanitização eficazes para indústrias de alimentos.