

Bactérias Formadoras de Biofilmes na Indústria de Laticínios: uma Breve Revisão

Biofilm Training Bacterium in the Dairy Industry: a Brief Review

Iara Nunes de Siqueira^a; Clécio Henrique Limeira^a; Aline Antas Cordeiro Cavalcanti^a; Joyce Galvão de Souza^{*a}; Sérgio Santos Azevedo^a; Marcia Almeida de Melo^a; Danelly Henrique Ferreira Freire^a

^aUniversidade Federal de Campina Grande. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência e Saúde Animal. PB, Brasil.

*E-mail: joycegalvaosouza@gmail.com

Resumo

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) podem ser causadas por micro-organismos formadores de biofilmes que se aderem às superfícies dos equipamentos e, apesar dos procedimentos de higienização, esses não são eficazes para eliminar a contaminação. Esta breve revisão sistemática teve como objetivo identificar os principais micro-organismos formadores de biofilmes na indústria de laticínios através de uma pesquisa sistemática de literatura realizada em três bases eletrônicas de dados: ScienceDirect, PubMed e Web of Science, buscando-se estudos primários que contivessem como tema central a frequência ou prevalência dos micro-organismos formadores de biofilme na indústria de laticínios. Foram encontrados 756 isolados bacterianos nos equipamentos, no leite e seus derivados, onde os equipamentos representaram 69,31% e o leite e seus derivados 30,69% do total de micro-organismos isolados. As frequências de isolamento de bactérias foram: *Bacillus* 38,75%, *Staphylococcus* 21,56%, *Listeria* 12,30%, *Pseudomonas* 7,80%, *Streptococcus* 4,36%, *Enterococcus* 2,11%, e *Acinetobacter* com 1,71%. Além desses micro-organismos constatou-se que em torno de 11,41% pertenciam aos mais variados gêneros de micro-organismos. Observou-se que a indústria de laticínios apresenta uma grande diversidade de contaminantes formadores de biofilmes multi espécies, tanto nas superfícies dos equipamentos como também no leite e seus derivados, sendo os gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* os que obtiveram o maior número no total, tanto nos equipamentos como em leite e derivados. Esses resultados demonstram a necessidade de estratégias de prevenção e conhecimento de novas técnicas e alternativas à cerca dos procedimentos de limpeza e higienização que eliminem esses agentes, pois de acordo com os dados apresentados nesta revisão muitos eram patogênicos.

Palavras chave: Bactérias. Leite. Segurança Alimentar.

Abstract

Foodborne Diseases can be caused by biofilm-forming microorganisms that adhere to equipment surfaces and, despite hygiene procedures, they are not effective in eliminating contamination. This brief systematic review aimed to identify the main biofilm-forming microorganisms in the dairy industry through a systematic literature search conducted in three electronic databases: ScienceDirect, PubMed and Web of Science, seeking primary studies that contained the central theme is the frequency or prevalence of biofilm-forming microorganisms in the dairy industry. A total of 779 bacterial isolates were found in the equipment, in milk and its derivatives, and the equipment represented 69.57% and milk and its derivatives 30.69% of the total of isolated microorganisms. The frequencies of isolated bacteria were as follows: Bacillus 37.61%, Staphylococcus 21.05%, Listeria 11.93%, Pseudomonas 7.57%, Streptococcus 4.23%, Enterococcus 2.05%, and Acinetobacter with 1.66%. In addition to these microorganisms, it was found that about 11.41% belonged to the most varied genera of microorganisms. It was observed that the dairy industry has a great diversity of contaminants forming biofilms multi species, both on the surfaces of equipment and also in milk and its derivatives, with the genera Bacillus and Staphylococcus being the ones that obtained the highest number in total, both in equipment such as milk and dairy products. These results demonstrate the need for prevention strategies and knowledge of new techniques and alternatives to the cleaning and sanitation procedures that eliminate these agents, because according to the data presented in this review, many were pathogenic.

Keywords: Bacterium. Milk. Food Safety.

1 Introdução

De acordo com Balsamo *et al.* (2012), biofilme pode ser definido como uma comunidade microbiana envolta por uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS), que tem como função unir as células firmemente à superfície. Esta formação de biofilmes ocorre em virtude da adesão de micro-organismos em uma superfície de contato, a qual se fixam, constituem uma matriz de EPS e logo em seguida iniciam seu desenvolvimento. Diversos fatores contribuem para o processo de adesão em uma determinada superfície, consideraremos

alguns que se destacam: a genética, a virulência e a resistência dos micro-organismos, nutrição, a área e o material da superfície (KASNOWSKI *et al.*, 2010), os resíduos proteicos, lipídicos e de carboidratos, oriundos de produtos derivados do leite ou de carnes, são elementos importantes para formar a camada condicionante (WATRICK; KOLTER, 2000). O desenvolvimento de biofilmes pode ser dividido em diferentes estágios: fixação reversível, fixação irreversível, maturação e dispersão (LEWANDOWSKI; BEYENAL, 2014). Na primeira ocorre a ligação inicial das células bacterianas à superfície, esse processo é ainda reversível (KASNOWSKI

et al.,2010).

Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de EPS produzida pela bactéria, resultando em anexo irreversível mais firmemente aderido (TREMBLAY *et al.*, 2014). A ligação irreversível envolve forças de pequeno alcance entre os apêndices celulares e a superfície, ligações de hidrogênio, ligações covalentes, hidrofóbicas e iônicas (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Diversos fatores contribuem para o processo de adesão em uma determinada superfície, consideraremos alguns que se destacam: a genética, a virulência e a resistência dos micro-organismos, nutrição, a área e o material da superfície (KASNOWSKI *et al.*, 2010), o cisalhamento (MITTELMAN, 1990; GUILLEMOT *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008; FLORJANIČ; KRISTL, 2011), atividade metabólica microbiana, expressão gênica do microrganismo e *quorum sensing* (RICE *et al.*, 2005), que é um fenômeno que possibilita a comunicação entre células bacterianas, moléculas de sinalização extracelulares conhecidas como auto indutores são usadas como interação permitindo que as células atuem de uma forma cooperativa (BOYLE *et al.*, 2015).

O processo de dispersão pode ser iniciado por diferentes fatores como distúrbios mecânicos, degradação enzimática da matriz de EPS, indução de motilidade e afrouxamento da EPS (TREMBLAY *et al.*, 2014).

A formação de biofilmes é geralmente indesejável para a indústria de alimentos pois representa uma fonte potencial de contaminação microbiana e de enzimas de deterioração que afetam a qualidade dos alimentos (TEH *et al.*, 2014), aumenta a resistência bacteriana e estresse ambientais, (BRIDIER *et al.*, 2015; KOSTAKI *et al.*, 2012),

Nas indústrias de laticínios, os equipamentos de processamentos como sistema de filtragem, que são usados continuamente por longos períodos de operação, tem condições particularmente susceptíveis para a formação de biofilmes (ANAND *et al.*, 2014). Estudos anteriores indicam que os biofilmes podem ser encontrados em diferentes partes dos equipamentos de processamentos de laticínios, como tanque de armazenamento de leite, silos de leites, exterior de bombas, paredes, tubulações, trocadores de calor e unidade de envase, sendo classificados como peças de alto risco para a formação de biofilmes (MARCHAND *et al.*, 2009).

O controle de biofilmes em fábricas de laticínios geralmente envolve um processo chamado de Cleaning-in-place (CIP) (MARCHAND *et al.*, 2012). Em relação ao controle dos biofilmes em laticínios, o uso adequado de agentes de limpeza é imprescindível. A correta seleção das soluções de limpeza, como detergentes e sanificantes, depende dos fatores como eficácia, segurança e facilidade de remoção após a aplicação, levando-se em consideração o caráter corrosivo de cada um desses agentes, bem como a ocorrência de efeitos sensoriais nos produtos obtidos após sua aplicação (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Caso ocorram falhas no procedimento de

higienização, superfícies de aço inoxidável podem se tornar importantes fontes de contaminação microbiana durante o processamento de alimentos (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003), e isso pode levar a sérios problemas de saúde pública e a perdas econômicas mediante a deterioração de alimentos e a danificação de equipamentos (BREMER *et al.*, 2006).

Uma das tarefas mais desafiadoras em qualquer linha de processamento da indústria de laticínios é a manutenção de condições sanitárias que é comprometida com a alta disponibilidade de nutrientes e oxigênio que favorece o crescimento microbiano. (CLETO *et al.*,2012). A limpeza consiste na remoção de sujeiras e partículas acumuladas nas superfícies. Essa remoção se dá através de ações químicas e mecânicas, onde são utilizados detergentes específicos, água de boa qualidade, alcalinos e escovas de diversos tamanhos e formatos, assim como esponjas e raspados (ANDRADE, 2008).

A segunda etapa é a desinfecção, onde através de produtos químicos, ocorre a significativa redução de micro-organismos. O objetivo desta desinfecção é eliminar as bactérias que sobrevivem durante o processo de limpeza e se desenvolvem durante o processamento dos alimentos. Após a desinfecção, não é realizado o enxágue, apenas a drenagem (retirar o excesso de solução que pode ter ficado na tubulação). A desinfecção é especialmente requerida em superfícies úmidas, as quais oferecem condições favoráveis ao crescimento de micro-organismos (ANDRADE, 2008).

Para se evitar a formação de biofilmes na indústria de alimentos, é essencial o estabelecimento e a adequação das medidas de higiene e sanitização (ARAÚJO, 2006). Várias técnicas estão sendo utilizadas e novas tecnologias estão sendo testadas para o controle de biofilmes na indústria de laticínios. Entre essas técnicas podemos citar pesquisa com óleos essenciais para serem utilizados no controle de biofilmes microbianos, pois eles possuem atividade antimicrobiana que despertam grande interesse, e podem ser utilizados como princípios ativos de sanitizantes. Estes são metabólitos secundários de vegetais que atuam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática (OLIVEIRA *et al.*,2013).

Os biossurfactantes são compostos com propriedades tensoativas, produzidos por micro-organismos. A sua utilização em superfícies pode reduzir consideravelmente a contaminação microbiana de materiais e inibir ou diminuir a formação de biofilmes. As principais vantagens em relação aos detergentes sintéticos residem em sua baixa toxicidade e natureza altamente biodegradável. Por enquanto, os biossurfactantes ainda não são acessíveis do ponto de vista econômico em comparação aos compostos sintetizados quimicamente que estão disponíveis no mercado (ARAÚJO *et al.*, 2013).

A utilização de fagos como agentes antimicrobianos pode ser muito vantajosa pela sua alta especificidade, precisão e potência em comparação ao uso de biocidas, possuindo a

capacidade de infectar bactérias de forma seletiva. Eles são capazes de destruir a matriz de polissacarídeo dos biofilmes, infectar células e causar uma desestruturação extensa (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014)

Vários são os gêneros e espécies bacterianas capazes de aderir e formar biofilmes em superfícies que entram em contato com leite ou produtos lácteos (OLIVEIRA *et al.*, 2013). As bactérias patogênicas e deteriorantes podem fazer parte da composição microbiana dos biofilmes formados em superfícies industriais, esses micro-organismos podem atingir a indústria de laticínio através de várias fontes, tais como água e alimentos podendo persistir nos equipamentos por longos períodos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2016),

Diante disso, o objetivo desse estudo foi fazer uma revisão sistemática para identificar os principais micro-organismos envolvidos na formação de biofilmes na indústria de laticínios.

2 Desenvolvimento

2.1 Estratégias de busca e elegibilidade dos estudos

Para realização desta revisão foram observadas as recomendações da metodologia PRISMA - Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses, que descreve as principais etapas a serem seguidas no desenvolvimento de uma revisão sistemática de literatura (MOHER *et al.*, 2009). Assim, realizou-se uma pesquisa sistemática em três bases eletrônicas de dados: ScienceDirect, PubMed e Web of Science, buscando-se estudos primários que contivessem como tema central a frequência ou prevalência de bactérias formadoras de biofilme na indústria de laticínios. Para isso, foram utilizados os seguintes termos de busca, em inglês: “biofilm and (“milk industr* or dairy industr*”), sendo o * (asterisco) utilizado para incluir tanto a palavra industry quanto industries. As citações dos estudos identificados nessa fase foram salvas no formato BibTex e exportadas para um gerenciador bibliográfico, para facilitar o processo de triagem e seleção.

Foram considerados para inclusão na pesquisa artigos completos e *shorts communications* que relatassem o isolamento de bactérias formadoras de biofilmes na indústria de laticínios, sendo excluídos outros tipos de publicação (revisões de literatura, editoriais, livros eletrônicos) e pesquisas que tratavam de outros microrganismos, como fungos, por exemplo. Não houve restrição quanto ao idioma de publicação, porém apenas estudos publicados nos últimos dez anos foram incluídos.

2.2 Critérios de seleção

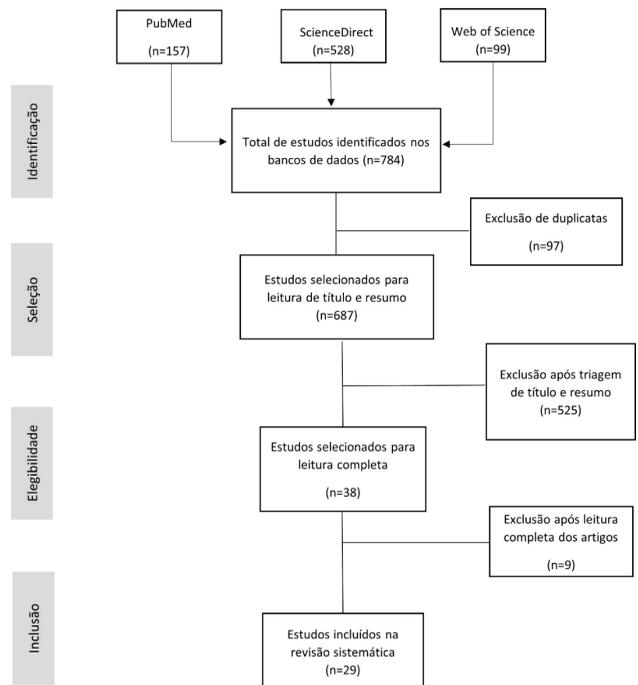
Dois revisores avaliaram independentemente os estudos primários encontrados na pesquisa dos bancos de dados. Inicialmente, já no ambiente do gerenciador bibliográfico, estudos duplicados foram excluídos, e os revisores iniciaram o processo de seleção pelos títulos dos trabalhos. Os estudos foram baixados, avaliados pelos títulos e resumos e por fim

foi realizado uma leitura na íntegra, selecionando aqueles que se enquadravam nos critérios de elegibilidade e removendo os demais.

2.3 Resultados

A pesquisa nas três bases de dados retornou um total de 784 trabalhos. Após a remoção das duplicatas, triagem de títulos, resumos e a avaliação do texto, restaram 28 estudos que foram sintetizados nesta revisão. Todo o processo de busca, triagem e seleção está demonstrado pelo fluxograma (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma de seleção de estudos para inclusão na revisão sistemática



Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com os Quadros 1 e 2, foram encontrados 756 isolados bacterianos nos equipamentos, no leite e seus derivados, onde os equipamentos representaram 69,31% e o leite e seus derivados 30,69% do total de micro-organismos isolados. Sendo que 38,75% *Bacillus*, 21,56% *Staphylococcus*, 12,30% *Listeria*, 7,80% *Pseudomonas*, 4,36% *Streptococcus*, 2,11% *Enterococcus*, e 1,71% *Acinetobacter*. Além desses micro-organismos constatou-se que em torno de 11,41% pertenciam aos mais variados gêneros de micro-organismos.

De acordo com o Quadro 1, 20 estudos realizaram a pesquisa de micro-organismos formadores de biofilmes nos diversos materiais e equipamentos da indústria de laticínios, totalizando 524 bactérias. Desse total os gêneros mais citados foram: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* e *Pseudomonas*. Isso representa 80,41% de todos os micro-organismos isolados dos equipamentos, além desses observou-se mais de 24 tipos de gêneros diferentes.

Quadro 1 - Principais gêneros bacterianos formadores de biofilme isolados em equipamentos e materiais utilizados na indústria de laticínios

Equipamento/material de formação do biofilme	Nº de isolados bacterianos	Grupo de bactérias isoladas	Referências	País de realização do estudo
Tubulação de leite cru, entrada do pasteurizador, saída do pasteurizador	40	<i>Pseudomonas</i>	Pagedar & Singh (2014)	Índia
Superfície interna do tanque transportador de leite	4	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i>	Teh et al. (2013)	Nova Zelândia
Planta de processamento de soro de leite e de uma fábrica de laticínios	2	<i>Klebsiella</i>	Tang et al. (2010)	Nova Zelândia
Plantas de produtos de laticínios	12	<i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i>	Alonso & Kabuki (2019)	Brasil
Luva	1	<i>Staphylococcus</i>	Lee et al., (2016)	Brasil
Superfícies externas dos tanques de armazenamento de leite (4) e tubos e conexões interiores das tubulações de leite (4)	40	<i>Acinetobacter</i> (7), <i>Aeromonas</i> (2), <i>Pseudomonas</i> (6), <i>Bacillus</i> (5), <i>Clostridium sensu Stricto</i> (3), <i>Exiguobacterium</i> , (5), <i>Sphingobacterium</i> (1), <i>Lactococcus</i> , (2), <i>Rahnelia</i> (2), <i>Comamona</i> (1) <i>Kurthia</i> (1), <i>Streptococcus</i> (2) <i>Vagococcus</i> (1), NI 2	Wang et al. (2019)	China
Tanque de recepção, tubo de conexão de plástico, caixa de coleta de soro de leite, tanque de processamento de ricota, suporte de mangueira de entrada de soro de leite, vassoura, Dreno de esgoto de soro de leite, Balde para coleta de leite, termômetro, agitador, pá e panela para coleta de coalhada, peneira da coalhada, molde de queijo, prensa, malha de retenção, parede, bancada da embalagem, caixa de armazenamento, bancada da embalagem	60	<i>Bacillus</i>	Ribeiro et al. (2019)	Brasil
Planta de processamento de soro de leite	2	<i>Klebsiella</i>	Tang et al. (2009)	Nova Zelândia
Tanque de recepção, Tubo de conexão de plástico, Caixa de coleta de soro de leite, Tanque de processamento de ricota, Suporte de mangueira de entrada de soro de leite, Vassoura, Dreno de esgoto de soro de leite, Balde para coleta de leite, Termômetro, Agitador, Pá e panela para coleta de coalhada, Peneira da coalhada, Molde de queijo, Prensa, Malha de retenção, Parede, Bancada da embalagem, Caixa de armazenamento, Bancada da embalagem	45	<i>Bacillus</i>	Fernandes et al. (2014)	Brasil
Tanques, Pasteurizadores, Cortadores de coalhada, Moldes, Misturadores	70	<i>Staphylococcus</i>	Avila-Novoa et al. (2018)	México
Tanque de processamento de ricota, Caixa de coleta de soro de leite, Bancada da embalagem, Superfície de bancada e embalagem, Molde das embalagens	7	<i>Enterococcus</i>	Fernandes et al. (2015)	Brasil
Tanque de refrigeração	3	<i>Bacillus</i>	Kumari & Sarkar (2014)	Índia
Equipamentos	1	<i>Staphylococcus</i>	Naik et al. (2018)	Índia
Superfícies dos equipamentos	6	<i>Staphylococcus</i>	Filipello et al. (2019)	Itália
Superfícies interna de tanques transportadores de leite	6	<i>Bacillus</i> (1), <i>Staphylococcus</i> (1), <i>Streptococcus</i> , (1), <i>Pseudomonas</i> (2), <i>Serratia</i> (1)	Teh et al. (2012)	Nova Zelândia
Tanque de leite cru, Válvulas, Junta das válvulas, Tubo de alimentação do pasteurizador, Trocadores de calor, Tanque do leite pasteurizado, Filtro duplo antes da homogeneização, Tanque de leite homogeneizado, Filtro duplo, Sondas do sensor, Bicos de pulverização	35	<i>Micrococcus</i> (2), <i>Bacillus</i> (18), <i>Serratia</i> (2), <i>Acinetobacter</i> (6), <i>Clostridium</i> sp., (1), <i>Pseudomonas</i> (1), <i>Streptococcus</i> (2), <i>Moraxella</i> sp., (1) <i>Microbacteria</i> (1) <i>Micrococcus</i> 1	Zou & Liu (2018)	China

Equipamento/material de formação do biofilme	Nº de isolados bacterianos	Grupo de bactérias isoladas	Referências	País de realização do estudo
Linha de leite cru, Pré-Pasteurização, Pós-pasteurização, Pré-resfriador, Pós-resfriador, Silo, Entrada do pasteurizador, Saída do pasteurizador, Pré-resfriador, Pós-resfriador, Entrada do tanque, Saída do tanque	105	<i>Bacillus</i> (39), <i>Micrococcus</i> (1), <i>Lactococcus</i> (4) <i>Enterobacter</i> (9), <i>Staphylococcus</i> (14) <i>Klebsiella</i> sp. (1) <i>Shigella</i> sp., (13), <i>Escherichia</i> (11), <i>Citrobacter</i> (1) <i>Lactobacillus</i> (2), <i>Streptococcus</i> (1) <i>Flavobacterium</i> (2) <i>Proteus</i> (1) Não classificado (1)	Sharma & Anand (2002)	Índia
Câmara de resfriamento, Sala de pasteurização, Piso da câmara de refrigeração, Caixa de plástico, Plataforma da câmara de resfriamento, Luvas de trabalho	85	<i>Listeria monocytogenes</i>	Lee et al. (2017)	Brasil
Ambiente de processamento de ricota	12	<i>Enterococcus</i> (6) e <i>Bacillus</i> (6)	Fernandes et al. (2017)	Brasil
Superfícies de aço inoxidável de mangueiras transportadoras de leite	8	<i>Pseudomonas</i>	Fysun et al. (2019)	Alemanha

Fonte: Dados da pesquisa.

Com relação à metodologia utilizada para avaliar a formação de biofilmes nos equipamentos, a Técnica de Contagem em Placas foi a que apresentou um maior número seguido pela microtitulação e pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

No Quadro 2 concentram-se os dados referentes às bactérias isoladas formadoras de biofilmes do leite e seus derivados. Foram

realizados 12 estudos, desse total encontraram-se 232 micro-organismos. Os gêneros que apresentaram um maior número foram *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Esses três gêneros representaram um total de 88,36% dos isolados no leite e seus derivados, sendo 11,642% referente aos mais de 23 gêneros diferentes. Observou-se que o leite do tanque *in natura* foi o mais avaliado, seguindo pelo leite pasteurizado e leite em pó.

Quadro 2 - Principais gêneros bacterianos formadores de biofilme isolados a partir de leite e seus derivados

Produto	Nº dos Isolados	Micro-Organismos	Referências	País
Queijo de leite cru	25	<i>Streptococcus</i>	Bassi et al., 2017	Itália
Salmoura e leite do tanque	5	<i>Staphylococcus</i> (4), <i>Listeria</i> (1)	Lee et al., 2016	Brasil
Leite pasteurizado	11	<i>Bacillus</i> (1) <i>Corynebacterium</i> (1) <i>Delftia</i> (1), <i>Halomonas</i> (1), <i>Lactococcus</i> (1), <i>Streptococcus</i> (1), <i>Psychrobacter</i> (1), <i>Mesonnia</i> (1), <i>Pseudomonas</i> (1), <i>Rhizobiales</i> (1) <i>Sediminibacterium</i> (1)	Chamberland et al., 2019	Canadá
Leite cru Leite pasteurizado Soro de queijo Ricota antes da embalagem Ricota embalada	45	<i>Bacillus</i>	Ribeiro et al. 2019	Brasil
Leite pasteurizado, leite cru, ricota antes da embalagem, ricota embalada	36	<i>Bacillus</i>	Fernandes et al. 2014	Brasil
Ricota comercial	4	<i>Listeria</i>	Fernandes et al. (2015)	Brasil
Leite em pó	1	<i>Bacillus</i>	Wang et al. (2019)	China
Leite em pó	41	<i>Bacillus</i> (24), <i>Geobacillus</i> (5), <i>Anoxybacillus</i> (2), <i>Laceyella</i> (1), <i>Thymus</i> (1), <i>brevis</i> (1), <i>Antrozous</i> (1), <i>Cookii</i> (1), <i>Contaminans</i> (1), <i>Lysinabacillus</i> (1), <i>Virgibacillus</i> (1), <i>Paenibacillus</i> (1) e <i>Brevibacillus</i> (1)	Sadig et al. (2017)	China
Leite cru Coalhada Queijo	43	<i>Staphylococcus</i>	Filipello et al. (2019)	Itália
Leite pasteurizado	3	<i>Bacillus</i>	Kumari & Sarkar (2017)	Índia
Leite em pó	3	<i>Bacillus</i>	Wang et al. (2019)	China
Leite cru	20	<i>Staphylococcus</i>	Akba & Kokumer (2015)	Turkey

Fonte: Dados da pesquisa.

A metodologia mais utilizada no leite e seus derivados foi a microtitulação em placas seguida pela PCR e Técnica de Contagem em Placas que apresentaram os mesmos valores.

Quadro 3 - requência geral dos principais gêneros bacterianos formadores de biofilmes isolados a partir de equipamentos/materiais e no leite e seus derivados

Microrganismo	Número de cepas isoladas	%
<i>Bacillus</i>	294	30,78
<i>Staphylococcus</i>	160	16,75
<i>Listeria</i>	93	9,73
Proteobacteria	72	7,53
<i>Pseudomonas</i>	65	6,80
<i>Streptococcus</i>	39	4,08
<i>Enterobacter</i>	25	2,61
<i>Acinetobacter</i>	24	2,51
Outros	183	19,21

Fonte: Dados da pesquisa.

2.4 Discussão

Um dos problemas mais significativos para o setor de leite e derivados, quanto a segurança microbiológica, consiste na formação de biofilmes em plantas de processamento. A presença de biofilmes em superfícies de plantas e equipamentos parece ser um dos principais focos de contaminação de produtos lácteos por bactérias patogênicas. A gravidade do problema fica evidente quando se observa o grande número de trabalhos publicados que indicam a persistência de patógenos envolvidos em DTAs em superfícies que entram diretamente em contato com alimentos por longos períodos (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA; 2010)

Um biofilme é um complexo ecossistema microbiológico formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies, sejam bactérias, fungos e/ou protozoários de modo isolado ou em combinação, associados a seus produtos extracelulares constituindo uma matriz de polímeros orgânicos e que se encontram aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (COSTA, 1999; JAY, 2005), entretanto as bactérias são mais numerosas, e tanto as Gram-positivas quanto Gram-negativas podem apresentar essa característica, incluindo alguns gêneros considerados patogênicos para humanos, como *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (BEAUREGARD *et al.*, 2013; VITAL-LOPEZ *et al.*, 2015) Os sistemas de processamento de alimentos são locais ideais para o crescimento bacteriano devido ao seu rico suprimento de nutrientes. A adesão é facilitada pela excreção microbiana de uma matriz de exopolissacarídeos, algumas vezes referida como glicocálix. Nesse microambiente são formadas microcolônias, bem como canais de água entre e em volta das mesmas. Tal sistema de irrigação que se localiza em volta das microcolônias tem sido correlacionado com um sistema circulatório primitivo, no qual nutrientes são trazidos para dentro e produtos tóxicos são carregados para fora (JAY, 2005). Além disso, os equipamentos utilizados no processo produtivo são conectados por vários dutos, o que dificulta

uma higienização de forma eficiente (VERRAN, 2002; REMENANT *et al.*, 2015), assim como o tipo de material, também é de grande importância na exibição de superfícies de contato e processamento de alimentos e inclui o aço inoxidável, vidro, borracha, polietileno, politetrafluoretileno (PTFE, conhecido pelo nome comercial teflon), borracha de nitrilo (NBR) (VAN HOUTD; MICHIELS, 2010; SREY *et al.*, 2013).

Neste estudo, verificou que o isolamento ocorreu em diferentes locais como equipamentos processadores de leite, pasteurizadores, tanques de refrigeração, todos de material de aço inoxidável. De acordo com Bansal e Chen (2006), as superfícies de aço inox apresentam alta tensão interfacial, o que facilita a adesão. Estudo realizado por Kananeh *et al.* (2010) mostrou que a adesão dos depósitos poderia ser reduzida pelo decréscimo da tensão interfacial com materiais que possuem baixa energia superficial. Além desses equipamentos, foram isolados micro-organismos formadores de biofilmes em diversos outros tipos de superfícies e de locais, como luvas, mão de manipuladores, superfícies ambientais, câmara de resfriamento e bancada de embalagens, o que demonstra que a formação de biofilmes pode ocorrer nos mais diversos tipos de materiais presentes nas empresas processadoras de leite.

As fábricas de laticínios geralmente diferem em sua capacidade de processamento de leite modificando o perfil das instalações de processamento. Portanto espera-se que a microflora de tais laticínios varie em número e diversidade das comunidades representativas (PAGEDAR; SINGH, 2014). Neste trabalho observou-se que o gênero *Bacillus* representou o maior número dos isolados, tantos nos equipamentos como no leite e seus derivados. Esse alto percentual de *Bacillus* se deve à sua resistência aos tratamentos térmicos normalmente utilizados na indústria de laticínios como a pasteurização.

De acordo com Bartoszewicz *et al.* (2008), *Bacillus* é um contaminante do leite cru e é considerado o quarto principal agente responsável por doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (TRANT *et al.*, 2011). Por ser um microrganismo formador de esporo termorresistente, o *Bacillus* tem sido associado à contaminação de produtos lácteos (GRANUM; LUND, 1997). O *Bacillus* pode estar presente em biofilmes formados em ambientes de processamento de leite e derivados, devido ao acúmulo de matéria orgânica e inorgânica na superfície, juntamente com a colonização das bactérias e dos seus esporos sendo estes resistentes aos processos de higienização (RIBEIRO *et al.*, 2019).

O segundo maior número de isolados de micro-organismos em termos percentual foi o *Staphylococcus* (16,6%). Quanto ao isolamento de *Staphylococcus*, observou-se sua presença nos equipamentos, mãos de manipuladores, linha de leite cru e tanques de resfriamento.

A formação de biofilmes por *Staphylococcus* nas superfícies de contato com o leite no ambiente das fábricas de laticínios é uma fonte potencial de contaminação para o leite e produtos lácteos representando um risco para os consumidores

(MICHU *et al.*, 2011).

Meira *et al.* (2012) avaliaram a formação de biofilmes de três isolados de *Staphylococcus aureus* associados à indústria de alimentos em superfície de aço inoxidável e polipropileno incubados a duas temperaturas (7 e 28°C/ 15 dias), observando-se que a formação de biofilmes foi favorecida a 28°C, assim como a composição nutricional da solução são propriedades que determinam a aderência dos micro-organismos à superfície (DONLAN, 2002), como também a presença de leite integral, pois o mesmo pode competir por locais de ligação na superfície do aço inoxidável, podendo alterar as propriedades físico-químicas resultando em baixa adesão.

Em torno de 21,86% dos micro-organismos formadores de biofilmes eram de diferentes espécies, ou seja, a indústria de laticínios alberga uma grande variedade de micro-organismos multi-espécies, formando um verdadeiro nicho dos mais variados gêneros. Esses resultados vão de acordo com Sauer *et al.* (2007), que relataram em seu estudo que os biofilmes comumente encontrados na natureza são multi-espécies. Biofilmes proporcionam um nicho ideal para transferência de DNA extracromossômico (plasmidial), e essa característica permite que determinados clones contribuam para um alto índice de manutenção de genes. Nesse sentido, as interações metabólicas entre as bactérias podem influenciar a expressão fenotípica decorrente de alterações genéticas (FROLUND *et al.*, 1996).

Nesse contexto, atenta-se para o preocupante quadro de resistência a sanitizantes, fator potencializado pela transferência diferenciada de genes dentro da comunidade do biofilme. Ademais, sanitizantes também apresentam eficácia reduzida devido à proteção mecânica conferida pela matriz de EPS que envolve o biofilme maduro (FLEMMING *et al.*, 2005; MONROE, 2007). O desenvolvimento de biofilmes bacterianos em superfície é favorecido principalmente por procedimentos inadequados de limpeza e sanitização, especialmente em áreas de difícil acesso como tubos, válvulas e trocadores de calor na indústria de laticínios (BRIDIER *et al.*, 2015). Portanto as diferenças observadas na capacidade de formação de biofilmes dos isolados, levam a diferentes capacidades de resistência do patógeno no ambiente industrial (LEE *et al.*, 2017).

Assim como *Bacillus* foi o grupo encontrado em maior número nos equipamentos, observou-se uma predominância deste no leite e seus derivados. Devido ao risco para a saúde pública e a sua associação com a deterioração do leite e produtos lácteos, vários estudos investigaram a ocorrência de *Bacillus cereus* no leite cru, leite pasteurizado, leite UHT e iogurte (BANYKÓ; VYLETĚLOVÁ, 2009; BARTOSZEWICZ *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2016).

Na linha de produção da indústria de laticínios, a formação de biofilmes eleva a carga microbiana dos produtos durante o processamento e, muitas vezes, os contamina com patógenos devido ao eventual desprendimento de células anteriormente

aderidas. Desta forma, podem colocar em risco a saúde do consumidor, além de ocasionar prejuízos financeiros à indústria em decorrência da diminuição da vida de prateleira dos produtos (SANTOS; PEREIRA, 2009; SIMÕES *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011).

A formação de biofilmes é uma problemática na indústria de laticínios, dificultando os processos de higienização e interferindo na qualidade e segurança do produto. É fundamental conhecer os fatores que influenciam na intensidade de sua formação, de modo a desenvolver sistemas eficientes de higienização, capazes de promover a remoção e controle das incrustações, e permitir equipamentos e linhas em condições ideais de operação (SANTOS; PEREIRA, 2009).

3 Conclusão

A formação de biofilmes é um mecanismo que os micro-organismos encontram para se tornarem mais resistentes aos processos de higienização comumente utilizados pelas indústrias de laticínios, tornando-se desta forma alvo de preocupação pois muitas dessas bactérias formadores de biofilmes são patogênicas e podem ser veiculadas pelos alimentos, tornando-se assim um potencial perigo para o consumidor. É necessário que novas tecnologias nos procedimentos de higienização sejam empregadas para evitar a incrustação dos micro-organismos, pois de acordo com essa revisão sistemática foi possível observar que existe uma grande variedade de bactérias que se aderem à superfície e formam biofilmes, e assim permitem uma troca de material genético tornando-se resistentes aos diversos procedimentos de higienização. Desta forma é necessário conhecer quais os principais micro-organismos encontrados na formação de biofilmes em indústria de laticínios e as possíveis formas de eliminá-lo através dos diferentes processos de higienização. O resultado do presente estudo nos mostrou uma preocupação emergente, pois foi possível observar que *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Listeria* foram os micro-organismos encontrados com maior frequência na formação de biofilmes, e assim se faz necessária a adoção de medidas mais eficazes para a eliminação desses potenciais perigos na indústria láctea.

Referências

- AKBAS, M.Y.; KOKUMER, T. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. *Int. J. Food. Sci. Tech.*, v.50, p.1666-1672, 2015. doi: 10.1111/ijfs.12823.
- ALBUQUERQUE, A.C.; ANDRADE, C.; NEVES, B. Biocorrosão – da integridade do biofilme à integridade do material. *Corros. Prot. Mater.*, v.33, n.1-2, p.18-23, 2014.
- ALONSO, V.P.P.; KABUKI, D.Y. Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates. *Int. J. Dairy Technol.*, v.70, p.1-7, 2019. doi:10.1111/1471-0307.12587.
- ANAND, S. *et al.* Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, v.13, p.18-33, 2014. doi: 10.1111/1541-4337.12048.

- ANDRADE, N.J. *Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos*. São Paulo: Varela, 2008.
- ARAÚJO, V.L. *et al.* Biosurfactantes: propriedade anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Quím. Nova*, v.36, n.6, p.848-858, 2013. doi:10.1590/S0100-40422013000600019
- ARAÚJO, L.V. *Biosurfatantes como agentes inibidores de adesão de Listeria monocytogenes em superfícies de aço inox*. São Paulo: Universidade Estácio de Sá, 2006.
- AVILA-NOVOA, M.G.A. *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* Isolated from food contact surfaces in the dairy industry of Jalisco, Mexico. *J. Food Qual.*, v.2018, p.1-8, 2018. doi: 10.1155/2018/1746139.
- BALSAMO, C.A. *et al.* Remoção de biofilme em canais de endoscópios: avaliação de métodos de desinfecção atualmente utilizados. *Rev. Esc. Enferm.*, v.46, 2012. doi.org/10.1590/S0080-62342012000700014.
- BANSAL, B.; CHEN, X.D. A critical review of Milk fouling in heat exchanges. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, v.5, n.2, p.27-33, 2006. doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00080.x.
- BANYKÓ, J.; VYLETĚLOVÁ, M. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.48, n.3, p.318-323, 2009. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02526.x.
- BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B.M.; SWIECIEKA, L. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly presente contaminants of fresh and a heat-treated milk. *Food Microbiol.*, v.25, n.4, p.588-596, 2008. doi: 10.1016/j.fm.2008.02.001.
- BASSI, D. *et al.* Biofilm Formation on Stainless Steel by *Streptococcus thermophilus* UC8547 in Milk Environments Is Mediated by the Proteinase PrtS. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.83, p.1-12, 2017. doi: 10.1128/AEM.02840-16.
- BEAUREGARD, P.B. *et al.* *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.110, n.17, p.1621-1630, 2013. doi: 10.1073/pnas.1218984110.
- BREMER, P. J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A.J. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbiol.*, v.106, n.3, p.254-262, 2006. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004.
- BRIDIER, A. *et al.* Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.*, v.45, p.167-178, 2015. doi: 10.1016/j.fm.2014.04.015.
- BOYLE, E.K. *et al.* Integration of metabolic and quorum sensing signals governing the decision to cooperate in a bacterial social trait. *PLoS Comput Biol.*, v.11, n.6, 2015. doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004279.
- CHAMBERLAND, J. *et al.* Influence of feed temperature to biofouling of ultrafiltration membrane during skim milk processing. *Int. Dairy J.*, v.93, p.99-105, 2019. doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.02.005.
- CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, v.2, n.1, p.23-32, 2003. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x.
- CLETO, S. *et al.* Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS One.*, v.7, n.6, 2012. doi.org/10.1371/journal.pone.0040189.
- COSTA, E.T.R. *Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável*. Seropédica. Rio de Janeiro: UFRRio de Janeiro, 1999, 81p.
- DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, n.9, p.881-890, 2002. doi: 10.3201/eid0809.020063.
- FERNANDES, M.S. *et al.* Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. *Int. Dairy J.*, v.38, p.16-23, 2014. doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.009.
- FERNANDES, M.S.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. *Int. J. Food Microbiol.*, v.200, p.5-12, 2015. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.003.
- FERNANDES, M.S. *et al.* Formation of multi-species biofilms by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing and effectiveness of chemical procedures. *Int. Dairy J.*, v.72, p.23-28, 2017. doi: 10.1016/j.idairyj.2017.03.016. 2017.
- FILLIPELLO, V. *et al.* Molecular characterisation and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolates from the dairy production chain in Northern Italy. *Int. Dairy J.*, v.91, p.110-118, 2019. doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.10.002.
- FLEMMING, H.C. *et al.* Physico-chemical Properties of Biofilms. In: EVANS, L.V. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2005.
- FLORJANIČ, M.; KRISTL, J. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. *Intl. J. Pharm.*, v.405, n.1/2, p.16-22, 2011. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.11.038.
- FRØLUND, B. *et al.* Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.*, v.30, n.8, p.1749-1758, 1996. doi: 10.1016/0043-1354(95)00323-1.
- GRANUM, P.E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.157, n.2, p.223-228, 1997. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x.
- GUILLEMOT, G. *et al.* Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: influence of yeast and solid surface properties. *Colloid Surface B.*, v.49, n.2, p.126-135, 2006. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.001.
- GUTIÉRREZ, D. *et al.* Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.*, v.7, n.8., 2016. doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825.
- JAY, J.M. *Biofilmes*. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- KANANEH, A.B. *et al.* Reduction of milk fouling inside gasketed plate heat exchanger using nano-coatings. *Food Bioprod. Process.*, v.88, n.4, p.349-356, 2010. doi: 10.1016/j.fbp.2010.09.010.
- KASNOWSKI, M.C. *et al.* Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Rev. Cient. Eletr. Med. Vet.*, v.8, n.15, p.1-23, 2010.
- KOSTAKI, M. *et al.* Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, p.2586-2595, 2012. doi: 10.1128/AEM.07099-11.
- KUMARI, S.; SARKAR, P.K. *In vitro* model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control*, v.36, p.153-158, 2014. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.08.014.

- KUMARI, S.; SARKAR, P.K. Optimisation of *Bacillus cereus* biofilm removal in the dairy industry using an in vitro model of cleaning-in-place incorporating serine protease. *Int. J. Dairy Technol.*, v.71, n.2, p.512-518, 2017. doi.org/10.1111/1471-0307.12454.
- LEE, J.H.; KAPLAN, J.B.; LEE, W.Y. Microfluidic devices for studying growth and detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Biomed. Microdevices*, v.10, n.4, p.489-98, 2008. doi: 10.1007/s10544-007-9157-0.
- LEE, S.H. *et al.* Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. *Food Res. Int.*, v.91, p.88–91, 2017. doi: 10.1016/j.foodres.2016.11.039.
- LEE, S.H.I. *et al.* Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. *Int. J. Dairy Sci.*, v.99, n.3, p.2384-2390, 2016.
- LEWANDOWSKI, Z.; BEYENAL, H. Fundamentals of biofilm research. Boca Raton: CRC Press, 2014.
- MARCHAND, S. *et al.* Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environ. Microbiol.* v.11, n.2, p.467-482, 2009. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01785.x.
- MARCHAND, S. *et al.* Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, v.11, n.2, p.133-147, 2012. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x.
- MEIRA, Q.G.S. *et al.* Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control.*, v.25, n.2, p.469-475, 2012. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.11.030.
- MICHU, E. *et al.* Biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermidis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of ica-mediated biofilms. *Int. Dairy J.*, v.21, n.3, p.179-184, 2011. doi:10.1016/j.idairyj.2010.10.004.
- MITTELMAN, M.W.; KOHRING, L.L.; WHITE, D.C. The role of biofilms in contamination of process fluids by biological particulates. New York: Plenum Press, 1990.
- MOHER, D. *et al.* Prisma Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.*, v.6, n.7, e1000097, 2009. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097.
- MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.*, v.5, n.11, p.2458-2461, 2007. doi: 10.1371/journal.pbio.0050307.
- NAIK, M.M. *et al.* Enhanced exopolysaccharide production and biofilm forming ability in methicillin resistant *Staphylococcus sciuri* isolated from dairy in response to acyl homoserine lactone (AHL). *J Food Sci Technol.*, v.55, n.6, p.2087-2094, 2018. doi.org/10.1007/s13197-018-3123-0.
- OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; PICCOLI, R.H. Biofilmes em indústrias de laticínios: aspectos gerais e uso de óleos essenciais como nova alternativa de controle. *Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"*, v.68, n.390, p.65-73, 2013. doi.org/10.5935/2238-6416.20130010.
- PAGEDAR, A.; SINGH, J. Evaluation of antibiofilm effect of benzalkonium chloride, iodophore and sodium hypochlorite against biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* of dairy origin. *J. Food Sci. Technol.*, v.52, n.8, p.5317–5322, 2014. doi: 10.1007/s13197-014-1575-4.
- REMENANT, B. *et al.* Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiol.* v.45, p.45–53, 2015. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.009.
- RIBEIRO, M.C.E. *et al.* Influence of different cleaning and sanitisation procedures on the removal of adhered *Bacillus cereus* spores. *Int. Dairy J.*, v.94, p.22-28, 2019. doi: 10.1016/j.idairyj.2019.02.011.
- RICE, S.A. *et al.* Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J. Bacteriol.*, v.187, n.10, p.3477–3485, 2005. doi: 10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005.
- SADIG, F.A. *et al.* Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *Int. J. Food Microbiol.*, v.262, p.89–98, 2017. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.015.
- SANTOS, A. L.; PEREIRA, D.B.C. A formação de incrustações no processamento do leite. Aspectos Químicos e Tecnológicos. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 26., 2009, Juiz de Fora. Anais eletrônicos... Juiz de Fora: Epamig/ILCT, 2009. 1 CD-ROM.
- SANTOS, A.L.; PEREIRA, D.B.C.; SARAIVA, C.B. A formação do Fouling e seus impactos no processamento e limpeza de indústrias de laticínios (Parte 2). *Rev. Leite Deriv.*, v.126, p.80-84, 2011.
- SAUER, K.; RICKARD, A.H.; DAVIES, G.D. Biofilms and Biocomplexity. *Microbe*, v.2, n.7, p.347-353, 2007. doi: 10.1128/microbe.2.347.1.
- SHARMA, M.; ANAND, S.K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry: a case. *Food Control.*, v.13, p.469-477, 2002. doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00068-8.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.*, v.43, n.4, p.573-583, 2010. doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.008.
- SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S.D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, v.31, n.2, p.572-585, 2013. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.12.001.
- TANG, X. *et al.* The efficacy of different cleaners and sanitisers in cleaning biofilms on UF membranes used in the dairy industry. *J. Membr. Sci.*, v.352, n.1-2, p.71–75, 2010. doi.org/10.1016/j.memsci.2010.01.063.
- TANG, X. *et al.* Biofilm growth of individual and dual strains of *Klebsiella oxytoca* from the dairy industry on ultrafiltration membranes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v.36, p.1491–1497, 2009. doi 10.1007/s10295-009-0637-5.
- TEH, K.H. *et al.* Biofilm – An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *Int. Dairy J.*, v.34, n.1, p.32-40. 2014. doi: 10.1016/j.idairyj.2013.07.002.
- TEH, K.H. *et al.* Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. *Int. J. Food Microbiol.*, v.157, n.1, p.28-34, 2012. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.008.
- TRANT, S.L. *et al.* Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cell. Microbiol.*, v.13, n.1, p.92-108, 2011. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01522.x.
- TREMBLAY, N.D.Y; HATHROUBI, S; JACQUES, M. Les biofilms bactériens: Leur importance em santé animale et em santé publique. *Can. J. Vet. R.*, v.78, n.2, p.110- 116, 2014.
- VAN HOUTDT, R.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surfasse. *J. Appl. Microbiol.*, v.109, n.4, p.1117-1131, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x.

- VERRAN, J. Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential? *Food. Bioprod. Process.*, v.80, p.292–298, 2002. doi: 10.1205/096030802321154808.
- VIDAL, A.M.C. *et al.* Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra-high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Cienc. Rural*, v.46, n.2, p.286-292, 2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20141539.
- VITAL-LOPEZ, F.G.; REIFMAN, J.; WALLQVIST, A. Biofilm formation mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* predicted via genome- scale kinetic models of bacterial metabolism. *Plos. Comput. Biol.*, v.11, p.1–24, 2015. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004452.
- WANG, N. *et al.* Tandem mass tag-based quantitative proteomics reveals the regulators in biofilm formation and biofilm control of *Bacillus licheniformis*. *Food Control*, v.110, p.107029, 2019. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.107029.
- WATNICK, P., KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.*, v.182, n.10, p. 2675-2679, 2000. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
- ZOU, M.; LIU, D. A systematic characterization of the distribution, biofilm-forming potential and the resistance of the biofilms to the CIP processes of the bacteria in a milk powder processing factory. *Food Res. Int.*, v.113, p.316-326, 2018. doi: 10.1016/j.foodres.2018.07.020.