

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES
DESINFETANTES SOBRE BIOFILMES DE *Bacillus cereus*
EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL**

Higor Oliveira Silva

Médico Veterinário

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES
DESINFETANTES SOBRE BIOFILMES DE *Bacillus cereus*
EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL**

Higor Oliveira Silva

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

2017

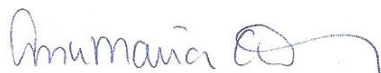
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES DESINFETANTES SOBRE BIOFILMES DE *Bacillus cereus* EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL

AUTOR: HIGOR OLIVEIRA SILVA

ORIENTADORA: ANA MARIA CENTOLA VIDAL

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP



Prof. Dr. HEIDGE FUKUMASU
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP



Profa. Dra. VERA LETTÍCIE DE AZEVEDO RUIZ
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA/USP - Pirassununga/SP



Profa. Dra. NAIA CARLA MARCHI DE REZENDE LAGO
Inspeção e tecnologia de Alimentos / Centro Universitário Moura Lacerda / Ribeirão Preto/SP



Pesquisadora Dra. RACHEL ZOCCAL SABA
Autônoma / Médica Veterinária / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 08 de dezembro de 2017

Silva, Higor Oliveira
S586a Avaliação da eficiência de diferentes desinfetantes sobre biofilmes de *Bacillus cereus* em superfícies de aço inoxidável / Higor Oliveira Silva. -- Jaboticabal, 2018
iv, 89 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Ana Maria Centola Vidal

Banca examinadora: Heidge Fukumasu, Vera Letticie de Azevedo Ruiz, Naia Carla Marchi de Rezende Lago, Rachel Zoccal Saba

Bibliografia

1. Biofilmes. 2. *Bacillus cereus*. 3. Aço inoxidável. 4. "Clean in place". 5. Segurança dos alimentos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Higor Oliveira Silva – nascido em 26 de novembro de 1985 em Uberlândia, Minas Gerais, é graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia, onde foi bolsista do Programa de Educação Tutorial Institucional da Faculdade de Medicina Veterinária da mesma Instituição, sob orientação da Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima. Realizou estágio curricular junto ao Serviço de Inspeção Federal, sob supervisão do Prof. Dênio Reis. Obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária Preventiva, em 2014, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista - Câmpus Jaboticabal, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior, com ênfase em Microbiologia de Alimentos. Realizando o doutorado na mesma instituição, sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Câmpus Fernando Costa, USP/Pirassununga.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade, e por sempre guiar meus passos. Por me dar forças para suportar todas as provações e obstáculos do caminho.

A Maria Parecida e José Antônio, meus queridos pais, sem os quais nunca teria chegado aqui, pelo incentivo e confiança em mim depositados. A vocês dedico e também atribuo esta conquista.

À minha querida Laíce, pelo amor sincero, pela compreensão e principalmente pelo apoio nos momentos mais difíceis. Obrigado por me incentivar e me encorajar.

A meu irmão e grande amigo Hudson, e também a todos meus familiares, padrinhos, avós, tios e primos, pelo apoio, colaboração, torcida e carinho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal pelo profissionalismo, pelos ensinamentos, conselhos e incentivos.

Aos professores Dr. Heidge Fukumasu, Dra. Vera Leticie A. Ruiz, Dra. Naiá C. M. Rezende Lago e Dra. Rachel Z. Saba por se disporem a contribuir e enriquecer o trabalho compondo a banca de defesa.

Ao professor Dr. Luiz Augusto do Amaral por suas contribuições durante o exame de qualificação.

Ao professor Dr. Luis Antonio Mathias pelos ensinamentos estatísticos e por toda paciência em me atender.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, que contribuíram de diferentes formas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento à execução do projeto de pesquisa.

À UNESP e aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva, pelo suporte e atenção.

Aos técnicos, colegas e funcionários da FZEA/USP Pirassununga, pela atenção e paciência.

Aos meus amigos Carlos Eduardo, Gabriel e Joyce, pelo companheirismo e por tornar mais divertida a nossa difícil caminhada.

Aos amigos da república Tia Méri, e a dona Fátima, pela amizade e principalmente por me acolherem com muito carinho.

Aos colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por compartilharem o conhecimento comigo ao longo destes últimos anos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3. REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 2 - OCORRÊNCIA DE GENES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM MICRORGANISMOS DO GRUPO DO <i>Bacillus cereus</i> ISOLADOS DA CADEIA PRODUTIVA DE LEITE E EM PRODUTOS LÁCTEOS.....	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4. CONCLUSÃO.....	49
5. AGRADECIMENTOS.....	49
6. REFERÊNCIAS.....	50
CAPÍTULO 3 – EFICIÊNCIA DE DESINFETANTES SOBRE BIOFILMES DE <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto FORMADOS EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL EM CONTATO COM LEITE.....	57
RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1 Delineamento experimental.....	60
2.2 Obtenção e caracterização de isolados.....	62
2.3 Produção de inóculos.....	63
2.4 Produção de leite tinalizado.....	64
2.5 Contaminação experimental do leite.....	65

2.6 Protótipo experimental em aço inoxidável.....	65
2.7 Condicionamento dos cupons de aço inoxidável.....	66
2.8 Indução de biofilmes nas superfícies dos cupons de aço inoxidável	67
2.9 Higienização dos cupons pelo sistema “clean in place”, simulado em escala piloto.....	67
2.10 Quantificação da população bacteriana aderida às superfícies dos cupons.....	69
2.11 Análise da topografia da superfície dos cupons de aço inoxidável.....	70
2.12 Análise Estatística.....	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4. CONCLUSÃO.....	79
5. AGRADECIMENTOS.....	79
6. REFERÊNCIAS.....	79
Documento suplementar 1.....	85
Documento suplementar 2 (Parte 1)	86
Documento suplementar 2 (Parte 2)	87
Documento suplementar 2 (Parte 3)	88
Documento suplementar 2 (Parte 4)	89

VALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES DESINFETANTES SOBRE BIOFILMES DE *Bacillus cereus* EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL

RESUMO – As espécies do grupo do *Bacillus cereus* são comumente ocorrentes na cadeia produtiva de leite e derivados e frequentemente estão envolvidas em doenças transmitidas por alimentos. Constituem uma preocupação constante à indústria de lácteos, por conta de sua capacidade de formar biofilmes em superfícies sólidas, ocasionando a contaminação persistente dos produtos processados e representando risco à saúde pública. Objetivou-se neste estudo verificar a distribuição e ocorrência de linhagens e genes específicos relacionados à formação de biofilmes de *Bacillus cereus* isolados dos diversos estágios da cadeia produtiva de leite e produtos lácteos, classifica-los quanto à potencialidade em formar biofilmes, e ainda, avaliar a atuação e eficiência do ácido peracético e do hipoclorito de sódio junto ao sistema “clean in place”, simulado em escala piloto, sobre biofilmes formados em superfícies de aço inoxidável em contato com o leite. Para tanto, foram isolados microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* de propriedades leiteiras, industriais e produtos lácteos, identificados genes específicos (*sipW*, *tasA*, *Spo0A* e *PlcR*) por sequenciamento genômico e avaliada a capacidade de formar biofilmes em microplacas de poliestireno. Selecionou-se um isolado sabidamente produtor de biofilmes, e por meio de contaminação experimental, induziu-se a adesão em superfícies de cupons de aço inoxidável, em três circunstâncias distintas, incluindo contaminação por esporos, células vegetativas, e contaminação seguida de pasteurização. Na sequência, os cupons foram submetidos a ação do ácido peracético e do hipoclorito de sódio, aplicando-os no sistema “clean in place”, realizado em escala piloto. Dentre 69 isolados, 98,5% foram classificados como moderados produtores de biofilmes. Os isolados pertencem aos grupos filogenéticos II, III, IV, V e VI, e os genes em estudo apresentaram alta ocorrência entre os isolados, estando igualmente distribuídos ao longo de toda cadeia produtiva, inclusive nos produtos lácteos. A adesão dos microrganismos às superfícies dos cupons alcançou $6,3 \times 10^5$ a $3,1 \times 10^7$ UFC/cm², resultando entre $3,0 \times 10^4$ e $8,1 \times 10^6$ UFC/cm² ao final do processo de sanitização. Os resultados demonstraram que o controle de biofilmes é fundamental e igualmente importante nos diversos estágios da cadeia produtiva, mas especialmente nas operações de obtenção de leite, por possibilitar a redução da carga contaminante inicial e conseqüentemente promoção da segurança dos alimentos, já que uma vez instalados, estes microrganismos podem formar biofilmes e disseminar-se pela linha de processamento. A ação do ácido peracético e do hipoclorito de sódio demonstraram desempenhos semelhantes nas 3 circunstâncias estudadas, mas não foram suficientemente eficazes nas condições do presente estudo, quando usados no sistema “Clean in place” para a remoção de *B. cereus* s.s. aderidos a superfícies de aço inoxidável do tipo AISI 304 submersas em leite.

Palavras-chave: Produtos lácteos, segurança dos alimentos, sequenciamento genômico

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF DIFFERENT DISINFECTANTS ON *Bacillus cereus* BIOFILMS IN STAINLESS STEEL SURFACES

ABSTRACT - Species included in *B. cereus* group are widely distributed in dairy environment and were frequently involved in foodborne diseases. They are considered as a concern for dairy industries despite they pose a risk for public health, also despite the able to biofilm formation on stainless steel surfaces, causing the persistent contamination of processed dairy products. This study aimed to investigate if specific strains and genes for biofilm formation are significantly distributed and overpresented in distinct stages of dairy production chain, classifies the potential for biofilm formation, and evaluate the performance and efficiency of peracetic acid and sodium hypochlorite, on a pilot scale simulated clean in place, on biofilms in the stainless steel surfaces in contact with milk. *Bacillus cereus* microorganisms from dairy farms, industries and dairy products were identified, specific genes (*sipW*, *tasA*, *Spo0A* and *PlcR*) were identified by genomic sequencing and to form biofilms was performed using polystyrene microplates. Was selected one isolate known to produce biofilms, and by means of experimental contamination, adhesion was induced on stainless steel coupon surfaces, in three different circumstances, including spore contamination, vegetative cells, and contamination followed by pasteurization. In the sequence, the coupons were subjected to the action of peracetic acid and sodium hypochlorite, applying them to the clean in place system, performed on a pilot scale. Among 69 isolates, 98.5% were classified as moderate biofilm producers. The isolates belong to phylogenetic groups II, III, IV, V and VI, and a high prevalence of genes was shown, which were well distributed to dairy production chain including dairy products. The adhesion of the microorganisms to the surfaces of the coupons reached 6.3×10^5 to 3.1×10^7 CFU/cm², resulting between 3.0×10^4 and 8.1×10^6 CFU/cm² at the end of the sanitization process. The results showed that the control of biofilms is fundamental and equally important in the various stages of the production chain, but especially in the operations of obtaining milk, by enabling the reduction of the initial contaminant load and consequently promotion of food safety, since once installed, these microorganisms can form biofilms and assay themselves through the processing line. The peracetic acid and sodium hypochlorite were similar performance, but were not sufficiently effective to control biofilms on conditions of this study, when used on a "clean in place" for the removal of *B. cereus* s.s. adhered to stainless steel surfaces of type AISI 304 submerged in milk.

Keywords: Dairy products, food safety, genomic sequencing

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Os membros do gênero *Bacillus* estão entre as bactérias mais ocorrentes em fazendas leiteiras e unidades de processamento. São considerados um sério problema para a indústria de produtos lácteos, pois são microrganismos formadores de esporos altamente resistentes aos tratamentos térmicos aplicados ao leite, e que ainda utilizam estratégias bem-sucedidas para se disseminar e persistir em linhas de produção.

Além disso, os microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* têm alto potencial deteriorante e toxigênico, estando frequentemente envolvidos em doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Aliado a isso, o grupo do *Bacillus cereus* é capaz de formar biofilmes em superfícies sólidas, como a borracha, o poliestireno e o aço inoxidável. Quando ocorre nas linhas de processamento, os biofilmes geralmente se formam em locais de difícil limpeza, tornando-se importantes fontes de contaminação recorrente dos produtos, fato que o torna um potencial risco à saúde pública.

Uma vez instalado em linhas industriais, os biofilmes são dificilmente removidos. Neste sentido, estratégias que visam impedir o acesso destes microrganismos às linhas de produção são fundamentais em seu controle. Entretanto, trata-se de um microrganismo de distribuição ubíqua, e sendo assim, as fontes de contaminação das linhas são numerosas. Portanto, as medidas de controle devem ser eficazes para reduzir as fontes de recontaminação ocasionadas pelos biofilmes.

A formação de biofilmes envolve uma série de mecanismos complexos e conhecer o seu processo de produção e regulação é fundamental na busca de medidas de combate eficientes e conseqüentemente por soluções desta problemática. Os procedimentos de limpeza aplicados na indústria contam com uma gama de princípios com este fim, mas conhecer os efeitos ocasionados por estes desinfetantes a nível celular pode ser um grande passo na formulação de estratégias de controle mais eficazes.

Nesse contexto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a eficiência de diferentes desinfetantes frente a biofilmes do grupo do *Bacillus cereus* em superfícies de aço inoxidável. Os objetivos específicos foram:

- Investigar se linhagens de *B. cereus* e genes específicos envolvidos na formação de biofilmes destes microrganismos estão significativamente distribuídos e representados nos diversos estágios da cadeia produtiva de leite e em produtos lácteos.
- Avaliar a capacidade dos isolados de *B. cereus* formar biofilmes em placas de poliestireno e classifica-los em três categorias; fracos, moderados ou fortes formadores de biofilmes.
- Avaliar a atuação e eficiência do ácido peracético e do hipoclorito de sódio junto ao sistema “clean in place”, simulado em escala piloto, sobre biofilmes de *Bacillus cereus* s.s. formados em superfícies de aço inoxidável em contato com o leite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Bacillus*, pertencente ao filo *Firmicutes*, que compreende um grupo diverso de microrganismos Gram-positivos, em forma de bastão, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que podem formar esporos. Células vegetativas e esporos do gênero *Bacillus* podem ser isolados em vários ambientes (SCHLEIFLER; WHITMAN, 2009).

Estudos demonstram que essa variedade de nichos ecológicos inclui tecidos de insetos e nematódeos (JENSEN et al., 2003; RUAN et al., 2015), ou de plantas (EHLING-SCHULZ et al., 2015). A alta diversidade de habitats do gênero *Bacillus* é reflexo do polimorfismo genético desta espécie (HELGASON et al., 2004).

Segundo Mols e Abee (2011) os membros mais estudados do gênero e consequentemente mais bem conhecidos são *Bacillus subtilis*, usado em fermentações alimentares (TAMANG; WATANABE; HOLZAPFEL, 2016) e como probiótico (CUTTING, 2011; ELSHAGHABEE et al., 2017); *Bacillus thuringiensis*, o inseticida biológico mais utilizado no mundo, por produzir inclusões cristalinas de proteínas tóxicas para um grande número de insetos e nematódeos (PALMA et al.,

2014); *Bacillus cereus*, patógeno de notável envolvimento em DTAs (STENFORS ARNESEN et al., 2008) e *Bacillus anthracis*, uma potencial arma biológica devido à sua alta toxicidade, causador do antraz, doença grave aguda (HELGASON et al., 2014). Os membros do grupo *B. cereus* têm um impacto significativo na saúde humana, na agricultura e na indústria alimentar (RASKO et al., 2005).

O grupo do *Bacillus cereus*, também conhecido por *Bacillus cereus sensu lato* (s.l.), é composto por oito espécies distintas: *Bacillus cereus sensu stricto* (s.s.) (SMITH et al., 1952; SOMERVILLE; JONES, 1972), *Bacillus thuringiensis* (NAKAMURA, 1994; SMITH et al., 1952; SOMERVILLE; JONES, 1972), *Bacillus mycoides* (LECHNER et al., 1998; NAKAMURA, 1998; NAKAMURA; JACKSON, 1995), *Bacillus pseudomycoides* (NAKAMURA, 1998), *Bacillus anthracis* (LOGAN et al., 1985; SMITH et al., 1952; SOMERVILLE; JONES, 1972), *Bacillus weihenstephanensis* (LECHNER et al., 1998), *Bacillus cytotoxicus* (GUINEBRETIERE et al., 2013) e *Bacillus toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013), além de outras quatro espécies com proposta de inclusão, *Bacillus wiedmannii* sp. nov. (MILLER et al., 2016), *Bacillus bingmayongensis* sp. nov. (LIU et al., 2015), *Bacillus manliponensis* sp. nov. (JUNG et al., 2011) e *Bacillus gaemokensis* sp. nov. (JUNG et al., 2010). Estas espécies são classificadas por características fenotípicas (SCHLEIFER; WHITMAN, 2009).

Entretanto, a identificação e as relações filogenéticas das bactérias no grupo *Bacillus cereus* são controversas, pois devido a alta similaridade de seus genomas (LIU et al., 2015; WANG; ASH, 2015) a diferenciação das espécies do grupo não é precisa, mesmo utilizando métodos moleculares (HELGASON et al., 2000; CAAMAÑO-ANTELO et al., 2015). Não por acaso, o gênero *Bacillus* passou por mudanças taxonômicas consideráveis ao longo do tempo (ELSHAGHABEE et al., 2017).

Apesar disso, a taxonomia e identificação dos isolados dentro do grupo *B. cereus* é fundamentalmente importante, e têm sido amplamente estudados usando vários métodos genotípicos e fenotípicos (RASKO et al., 2005; LIU et al., 2015). No passado, a classificação das bactérias deste grupo em diferentes espécies ocorria de acordo com as sequências do gene 16S rRNA e características como a presença ou ausência de plasmídeos de virulência (*B. anthracis* e *B. thuringiensis*), morfologia

das colônias (*B. mycoides* e *B. pseudomycoides*), capacidade psicrófila ou termotolerante (*B. weihenstephanensis* e *B. cytotoxicus*) e outras características pouco definidas (*B. cereus*, associado à vômitos e intoxicações diarreicas). No entanto, devido ao fato de várias espécies do grupo estarem intimamente relacionadas, dificilmente o grupo apresentou um tipo de classificação satisfatória, e sem dúvida, os plasmídios desempenham um papel crítico na discriminação das diferentes espécies deste grupo, já que eles podem ser facilmente transferidos ou perdidos ao longo da história evolutiva (LIU et al., 2015; KOVAC et al., 2016).

Dentre os métodos genotípicos utilizados no intuito de diferenciar membros do grupo estão as análises de genes únicos (*i.e.*, *gyrB* e *plcR*) (CHEN; TSEN, 2002; KO et al., 2004), polimorfismo do comprimento de fragmento amplificado (AFLP) (HILL et al., 2004) e análise tradicional de seqüências de múltiplos locus (tMLSA) (SOROKIN et al., 2006; KO et al., 2004; SOUFIANE; BAIZET; CÔTÉ, 2013). Entretanto, apesar de fornecerem informações importantes sobre a diversidade genética e as relações filogenéticas dentro do grupo, estes métodos não puderam produzir classificações convincentes (LIU et al., 2015). Neste contexto, as relações filogenéticas e taxonômicas das bactérias do grupo *B. cereus* ainda estão em discussões intensas e muitas vezes até controversas (HELGASON et al., 2000; RASKO et al., 2005; ZWCIK et al., 2012; OKINAKA; PEARSON; KEIM, 2006; SOUFIANE; BAIZET; CÔTÉ, 2013; CAAMAÑO-ANTELO et al., 2015).

Guinebretiére et al. (2008) construíram e propuseram uma estrutura “ecotípica” dividida em sete grupos filogenéticos, determinados utilizando padrões de fluorescência de polimorfismo do comprimento de fragmento amplificados, seqüências de genes ribossomais, seqüência parcial do gene *panC*, assinaturas da seqüência de DNA “psicrotolerante”, além de dados fenotípicos e descritivos de psicrotolerância. Foram identificados sete grupos filogenéticos principais, sendo: Grupo I, *B. pseudomycoides*; Grupo II, *B. cereus* e *B. thuringiensis*; Grupo III, *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*; Grupo IV e Grupo V, *B. cereus* e *B. thuringiensis*; Grupo VI, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*; e por fim, Grupo VII, composto exclusivamente pelo *B. cereus*. Esta classificação tem importantes conseqüências práticas, atribuindo ao grupo III o maior risco à

intoxicação alimentar, relatado como citotóxico (GUINEBRETIERE et al., 2008; GUINEBRETIERE et al., 2010).

O grupo do *B. cereus* é comumente ocorrente em propriedades leiteiras e em plantas de processamento, e por conta disso, constituem uma grande preocupação para a indústria de laticínios por seu envolvimento nas ocorrências de DTAs (SIMÕES et al., 2010; KUMARI; SARKAR, 2016).

Trata-se de um dos agentes mais frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares (FRICKER et al., 2007; BENNETT et al., 2013; MESSELHÄUSSER et al., 2014; TEWARI; ABDULLAH, 2015), provocando sintomas eméticos ou diarreicos. Os primeiros ocasionados pela ingestão de toxinas secretadas no alimento, um peptídeo cíclico não ribossômico altamente tóxico e resistente a temperaturas de cozimento, e o segundo induzido pela ingestão dos microrganismos contidos nos alimentos, que se multiplicam no intestino e produzem enterotoxinas (EHLING-SCHULZ et al., 2015).

B. cereus s.s. é a espécie de maior importância dentro do grupo em relação à segurança dos alimentos, estando envolvido em 19% dos surtos reportados nos Estados Unidos entre 1998 e 2008 (BENNETT et al., 2013).

Uma das características que denotam a importância do controle do *Bacillus cereus* no início da cadeia leiteira é a capacidade de sobrevivência aos processos de pasteurização (EVELYN et al., 2015). Diversos trabalhos relatam a presença do *Bacillus cereus* s.s. toxigênico em produtos comerciais termicamente tratados na indústria, inclusive ao tratamento térmico por Ultra Alta Temperatura (UAT) (VIDAL et al., 2016).

Em estudo realizado por Reis et al. (2013) foram isoladas cepas diarreicas de um total de 260 amostras de leite UAT, leite pasteurizado e leite em pó, vendidos em estabelecimentos comerciais e de diferentes marcas. Destes, foram obtidos 63 isoladas de leite e produtos lácteos, dos quais 20 (31,7%) apresentaram capacidade toxigênica.

Vidal-Martins et al. (2005) pesquisaram microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* em 300 amostras de leite (36 amostras de leite cru, 55 de pasteurizado e 27 de UAT) e obtiveram isolados em 12, 24 e 24 delas, respectivamente, sendo que 50,0% dos isolados de amostras de leite cru, 20,8% de pasteurizado e 75,0% de

UAT demonstraram atividade toxigênica. Há também relatos de isolamento de *B. cereus* com atividade toxigênica em amostras de leite em pó (REYES, 2007) e leite fermentado (WONG et al., 1988).

Sabe-se, porém, que outras espécies além do *B. cereus* s.s. também são consideradas como produtoras de toxinas, como o *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* (PRÜß et al., 1999; SWIECICKA; VAN DER AUWERA GA; MAHILLON, 2006; RÉJASSE et al., 2012; HARIRAM; LABBÉ, 2015), demonstrando a complexidade em relação ao real risco à saúde pública em relação ao leite e produtos lácteos (KOVAC et al., 2016). O risco à saúde pública pode ser ainda maior considerando o consumo de produtos do mercado informal (YOBOUET et al., 2014).

É importante ressaltar que o grupo do *B. cereus* possui importância para a cadeia produtiva não somente pelo risco de toxinfecções, mas também por acarretar problemas de deterioração e redução da vida de prateleira dos produtos, por produzirem enzimas extracelulares como lipases, proteases, lecitinases e fosfolipases (JONGHE et al., 2010; SIMÕES et al., 2010; KUMARI; SARKAR, 2016).

Em decorrência disso, podem ser observados diversos defeitos tecnológicos como rancificação, sabores indesejados como o amargo e redução do rendimento industrial (KUMARI; SARKAR, 2016). Além da alteração de sabor, a ação das proteases e lipases pode ocasionar outros problemas como a perda de consistência e gelatinização ao longo da “shelf life” do leite (CHEN et al, 2003). Apesar das formas vegetativas serem eliminadas pelos tratamentos térmicos aplicados ao leite, as enzimas proteolíticas que atuam sobre a caseína podem permanecer viáveis mesmo ao tratamento de ultra alta temperatura (UAT) (NÖRNBERG et al, 2009). Estima-se que a indústria de produtos lácteos tenha perdas de até 30% de seus produtos, ocasionados por deteriorações deste tipo (SAMARZIJA et al., 2012).

Dentre os fatores associados a contaminação de produtos lácteos pelo grupo do *B. cereus*, destaca-se sua capacidade em se aderir e formar biofilmes em superfícies sólidas, que acarreta problemas e consequências consideráveis à indústria (SALUSTIANO et al., 2009; KUMARI; SARKAR, 2016; RIBEIRO et al., 2017).

Os biofilmes são comunidades bacterianas altamente estruturadas, aderidas a superfícies bióticas ou abióticas, que permitem que as bactérias cooperem entre si no intuito de se protegerem e sobreviverem a condições e ambientes hostis (SIMÕES et al., 2010; PASVOLSKY et al., 2014). Essas comunidades complexas são preponderantes para que o grupo do *B. cereus* seja capaz de colonizar diferentes ambientes. Juntamente com a capacidade de esporular, elas conferem à bactéria uma alta resistência a vários fatores de estresse e uma alta capacidade adesiva em vários substratos, incluindo o aço inoxidável, material amplamente utilizado nas indústrias de produtos lácteos (KUMARI; SARKAR, 2016; MAJED et al., 2016).

Não por acaso, o aço inoxidável é um dos materiais mais utilizados na indústria de alimentos, já que corresponde aos requisitos esperados dos materiais que entram em contato com alimentos: exige-se um material que por si só, não altere a natureza química, microbiológica e organoléptica dos produtos; deve ser um material fácil de limpar para garantir a higiene dos produtos alimentares e; deve ser resistente, incluindo neste caso, os processos de corrosão e envelhecimento (MARCHAND et al., 2012). Este último fator, contribui fortemente para a preferência da indústria láctea ao aço inoxidável, somado a suas características físicas, coeficiente de expansão, condutividade térmica e facilidade de uso (BREMER et al., 2009). O processamento do leite requer material resistente à corrosão em condições alcalinas e/ ou ácidas (BOULANGÉ-PETERMANN et al., 1997), e por conta disso a indústria de laticínios emprega o aço inoxidável há mais de 6 décadas em quase todos os segmentos da cadeia de produtos lácteos (MARCHAND et al., 2012).

Porém, sua microtopografia é composta por ranhuras e fendas (SCHMIDT et al., 2012), que possibilitam a formação de biofilmes fortemente aderidos a este tipo de substrato (MAJED et al., 2016).

Por outro lado, ainda é difícil definir materiais alternativos para competir com o aço inoxidável na indústria do leite, devido às tecnologias de processamento. No entanto, apesar do uso limitado há materiais que podem e são aplicados em algumas operações, como os plásticos, freqüentemente usados em correias transportadoras, e as borrachas, tais como a borracha de monômero de etileno e propileno-dieno (EPDM) e a borracha de nitrilo-butílica (NBR), que se encontram entre

os materiais de vedação mais utilizados em equipamentos de processamento de leite (FAILLE; CARPENTIER, 2009).

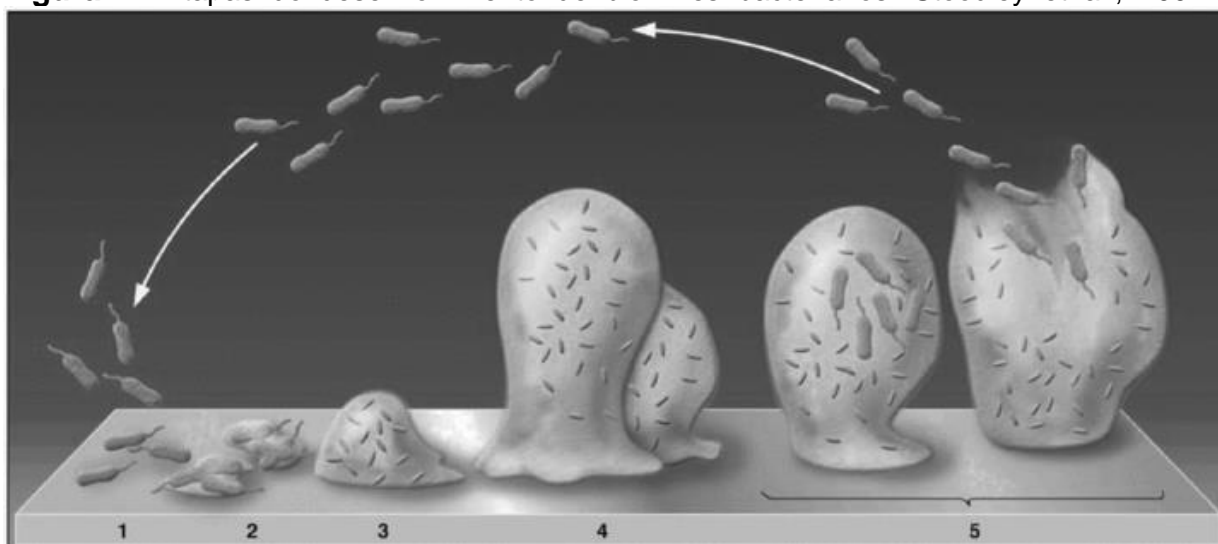
Hayrapetyan et al. (2015a) demonstraram a maior formação de biofilmes em superfícies de aço inoxidável comparativamente a outros materiais, como o poliestireno, possivelmente devido a quantidade de ferro livre disponível.

Nas plantas de processamento de produtos lácteos, os biofilmes podem se formar até mesmo em ferramentas de limpeza e manuseio, além de praticamente todas as superfícies em contato com o leite, como pasteurizadores, tanques de armazenamento, máquinas de envase e embaladeiras, representando também fontes de contaminação pós-pasteurização (ENEROTH et al., 2001; FAILLE et al., 2014; MAJED et al., 2016).

A transição do estado planctônico para o biofilme é desencadeada por uma variedade de fatores ambientais e fisiológicos, disponibilidade de nutrientes, estresse celular e inclui-se também a detecção de “quórum sensing”. Podem envolver uma única espécie bacteriana e/ou múltiplas, formar uma única simples camada ou mesmo estruturas tridimensionais (MARCHAND et al., 2012).

A formação de biofilmes ocorre fundamentalmente em etapas, como ilustrado no Figura 1.

Figura 1. Etapas do desenvolvimento de biofilmes bacterianos. Stoodley et al., 2002.



Etapa 1: Fixação inicial das células à superfície. Etapa 2: Produção de EPS resultando em anexo "irreversível" mais firmemente aderido. Etapa 3: Desenvolvimento precoce da arquitetura do biofilme. Etapa 4: Maturação da arquitetura do biofilme. Etapa 5: Dispersão de células individuais do biofilme.

Inicialmente as células entram em contato com uma superfície e promovem uma adesão. As células anexadas irão produzir uma matriz extracelular e se multiplicar, formando assim o que se denomina microcolônia. A partir desta pode-se evoluir para um biofilme maduro com uma estrutura complexa e tridimensional, que evolui tendendo a uma adesão que dificilmente será rompida. Na fase final da formação do biofilme, as células podem se desprender, seja de forma passiva por conta de fatores extrínsecos, como tensão por turbilhonamento ou mudanças drásticas de fluxo; ou por mecanismos inerentes aos próprios residentes do biofilme, como a disponibilidade de nutrientes por exemplo (STOODLEY et al., 2002; WIJAM et al., 2007; MAJED ET AL., 2016).

Dentro deste biofilme os microrganismos podem fisiologicamente se diferenciar em esporos altamente resistentes e adesivos, que aumentarão a resistência da bactéria aos antimicrobianos ou aos procedimentos de limpeza, conforme a necessidade e de acordo com as circunstâncias da estrutura tridimensional, como a difusão de nutrientes e limitação de oxigênio (STOODLEY et al., 2002; GHIGO, 2003; WEBB et al., 2003; MAJED ET AL., 2016).

Os biofilmes associados às indústrias de processamento de lácteos, geralmente se desenvolvem na dependência de uma camada de condicionamento para que ocorra a formação, ou seja, através do acúmulo de matéria orgânica sobre as superfícies metálicas, principalmente de compostos inorgânicos e orgânicos do leite, que possibilitam então a colonização bacteriana (MARCHAND, et al., 2012; RIBEIRO et al., 2017). Os filmes condicionantes possibilitam que os biofilmes se desenvolvam, mudam as superfícies conforme as propriedades físico-químicas do leite, e influenciam a taxa e a extensão da ligação microbiana, podendo afetar também a ordem dos eventos de adesão e formação de biofilmes (SIMÕES et al., 2010).

As populações que residem os biofilmes se apresentam com grande heterogeneidade, com diversos estágios celulares ou mesmo consorciadas a outras espécies bacterianas (MAJED et al., 2016). Estudos já demonstraram a diversidade de espécies ao longo de plantas de processamento, inclusive com predominância do gênero *Bacillus*, entre 37% e 44%. Os demais gêneros incluem *Lactobacillus*,

Streptococcus, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella* e *Proteus*. Inclui-se ainda espécies como *E. coli* e *Enterobacter aerogenes* (SHARMA; ANAND, 2002).

Os microrganismos deste grupo ganham vantagem competitiva sobre várias espécies por conta da habilidade em formar esporos e isso aumenta seu sucesso na instalação de biofilmes principalmente devido a redução da concorrência resultante do tratamento térmico aplicado ao leite. Devido à esporulação, o *Bacillus cereus* sobrevive à pasteurização e, após germinação, as células estão livres da competição com outras células vegetativas (SHARMA; ANAND, 2002).

Embora a pasteurização seja conhecida por inativar as células vegetativas, sabe-se que os esporos de *B. cereus* são altamente resistentes ao calor e geralmente não são afetados por fatores físicos, químicos e biológicos (GAILLARD et al., 1998; GONZÁLEZ et al., 1999).

O perfil da resistência ao calor em uma espécie bacteriana é um fenômeno complexo que depende do estado fisiológico de espécies específicas, do meio de aquecimento, dos fatores intrínsecos e extrínsecos (DESAI; VARADARAJ, 2010).

Estudos demonstram que a capacidade de sobrevivência destas cepas à pasteurização é de cerca de 70% da população presente (GRIFFITHS et al., 1989).

Mijacevic e Samardzija (1996) relatam que o tratamento térmico do leite destrói de 99,78% a 99,99% dos microrganismos presentes. Entretanto, outros estudos demonstraram que esporos do *Bacillus cereus* resistem ao tratamento UAT (135 a 150°C por dois a quatro segundos) (CHRISTIANSOON; BERTILSSON; SVENSSON, 1999).

A esporulação também ocorre dentro de biofilmes, às vezes em níveis muito altos, sugerindo um papel potencialmente significativo para os esporos derivados de biofilmes na contaminação dos alimentos com *B. cereus*, pois estes são altamente resistentes e adesivos (SCOTT et al., 2007; FAILLE et al., 2014). As proporções podem atingir 90% do total de células residentes viáveis (WIJMAN et al., 2007).

Se for permitida a secagem das áreas contaminadas antes dos procedimentos de limpeza, como por exemplo, em tanques ou tubos parcialmente preenchidos ou mesmo em superfícies abertas, o nível de esporulação seria ainda maior entre os residentes dos biofilmes. Entretanto, esporos obtidos de biofilmes

secos apresentaram menor resistência ao calor comparativamente aos biofilmes úmidos (HAYRAPETYAN et al., 2016).

O desprendimento de esporos de biofilmes no ambiente de processamento de alimentos é crítico, pois eles geralmente se acumulam em áreas difíceis de limpar, por exemplo, fendas, válvulas, juntas e fundos cegos (SHARMA; ANAND, 2002).

Por conta disso, a adesão às superfícies de equipamentos é considerada um dos principais fatores para a contaminação do leite e produtos lácteos, permitindo contaminações recorrentes e, dessa forma, tornando-os fontes importantes de contaminação (KUMARI; SARKAR, 2014; SHAHEEN et al., 2010).

Este tipo de contaminação desempenha papel fundamental na persistência e disseminação deste microrganismo, pois além de representar um grave risco para a saúde pública, o que torna seu controle um grande desafio (BRANDA et al., 2005; KUMARI; SARKAR, 2016; MAJED et al., 2016).

Além do risco de recontaminação, os biofilmes catalisam os processos químicos e bioquímicos das corrosões em tubulações e equipamentos, ocasionando redução da transferência de calor e conseqüentemente, reduzindo a eficiência dos processamentos térmicos (KUMARI; ANAND, 1998).

Dentre os aspectos moleculares e fisiológicos que desencadeiam e regulam a formação de biofilmes incluem várias macromoléculas extracelulares produzidas pelo maquinário celular e especificamente exigidas para a formação da matriz extracelular, além de elementos celulares envolvidos na formação de biofilmes, como flagelos ou proteínas de superfície celular, e a rede complexa de regulação gênica que a controla e que também está relacionada a outras funções celulares (MAJED et al., 2016).

Os flagelos são um elemento importante para a formação de biofilmes e fundamentais à dinâmica celular na estrutura dos mesmos, porém, não são preponderantes. No caso dos microrganismos do grupo do *B. cereus* são os flagelos que os possibilita alcançar condições adequadas à formação de biofilmes em ambientes estáticos submersos; carrear e aumentar a troca de nutrientes dentro do biofilme; e ainda, estender o alcance destes biofilmes, disseminando colônias (HOURY et al., 2010; MAJED et al., 2016).

Estudos comparando os genomas de *B. cereus* ATCC 14579 e ATCC 10987 indicaram que existem muitas diferenças entre essas cepas quanto a características importantes para a formação de biofilmes, incluindo diferenças em genes para síntese de cápsulas de polissacarídeos e genes possivelmente envolvidos na glicosilação de flagelos e flagelinas (RASKO et al., 2004). Neste sentido espera-se que haja uma diversidade de interações e mecanismos que regulem a intensidade da expressão de genes e sinais necessários à formação dos biofilmes dentro da espécie.

O grupo do *B. cereus* quando constituem biofilmes se diferem dos homólogos em estado planctônico em algumas propriedades da superfície celular (MAJED et al., 2016). Tran et al. (2010) demonstraram que uma peptidase de superfície celular, intitulada CwpFM, está envolvida na adesão a células epiteliais, formação de biofilmes, vacuolização de macrófagos e virulência.

Os biofilmes são incorporados em uma matriz autoproduzida cujos elementos estruturais são exopolissacarídeos, proteínas e ácido nucleico oriundo de lise celular bacteriana, denominado pela comunidade científica como DNA extracelular (STEINBERGER; HOLDEN, 2005; FLEMMING; WINGENDER, 2010). Este último é conhecido há muitos anos em espécies Gram negativas como a *P. aereginosa*, que produzem quantidades substanciais de lise celular (VILAIN et al, 2009) e a *Variovorax paradoxus*, e também em Gram positivas, incluindo *Rhodococcus erythropolis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pneumoniae* (STEINBERGER; HOLDEN, 2005; GARCIA; LÓPEZ, 2006; IZANO et al., 2008; MOSCOSO; QIN et al., 2007).

Numa analogia com a apoptose de eucariotos superiores, as comunidades bacterianas residentes nos biofilmes podem exercer pressão seletiva para a morte celular programada, eliminando indivíduos com danos celulares que possam comprometer a população, reduzindo a concorrência à nutrientes entre os indivíduos saudáveis que permanecem e favorecendo o benefício coletivo. Além disso, com a lise celular libera DNA genômico, que passa a ser um componente estrutural da matriz do biofilme, o que suporta a ideia de que a lise celular contribui para a estabilidade da estrutura global do biofilme (BAYLES, 2007).

A autólise e liberação de DNA desempenha papel importante também na orientação espacial dos biofilmes, modulando o comprimento das cadeias bacterianas (BAYLES, 2007; TRAN et al., 2010).

O DNA resultante da autólise de *B. cereus* é observado especificamente em biofilmes e tem sido relatado como sendo necessário para adesão em superfícies de poliestireno ou vidro. Entretanto, as possíveis interações entre o DNA e outros componentes da matriz do biofilme, e ainda, os mecanismos moleculares de regulação da produção deste DNA nos biofilmes ainda são pouco esclarecidos (MAJED et al., 2016).

Os mecanismos que envolvem a regulação gênica e controle da formação de biofilmes no grupo do *B. cereus* compõem um circuito complexo e dependente de uma série de elementos, incluindo fatores de transcrição e reguladores para os genes envolvidos. Esse circuito é bastante estudado em *B. subtilis* e *B. thuringiensis*, mas poucos genes envolvidos na formação de biofilmes têm sido caracterizados em *B. cereus* s.s. e os mecanismos específicos de sua rede reguladora são pouco esclarecidos (HAMON; LAZAZZERA, 2001; KEARNS, et al., 2005; PFLUGHOEFT, et al., 2011; FAGERLUND et al., 2014; LINDBÄCK et al., 2012; CARO-ASTORGA et al., 2015; GAO et al., 2015).

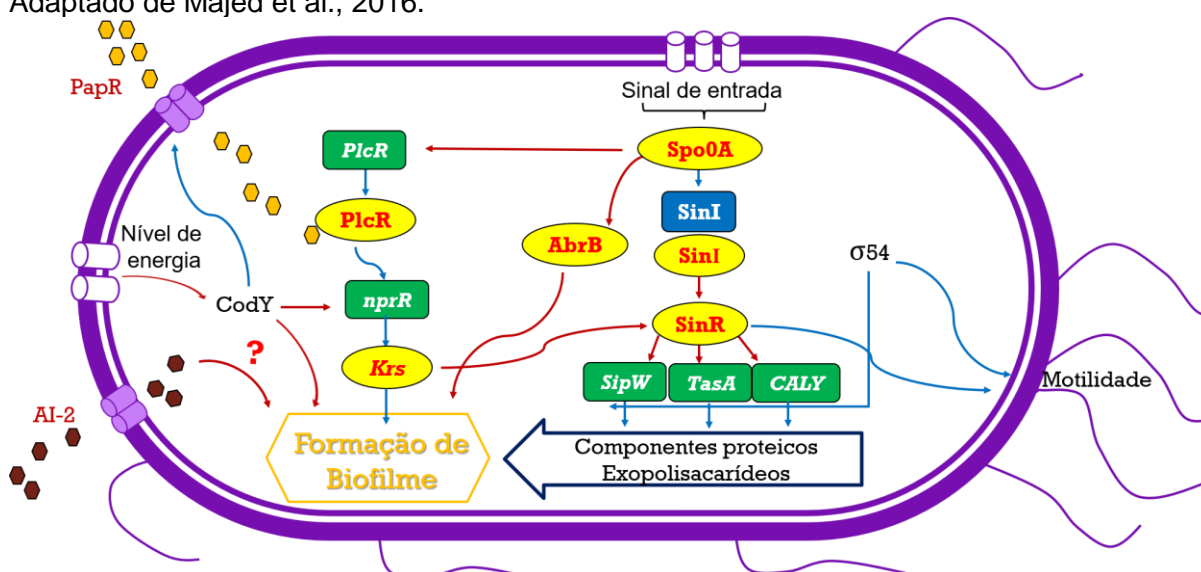
Em *B. subtilis* a matriz de biofilme contém três proteínas estruturais TasA, TapA e BslA. A proteína BslA formam um envelope hidrofóbico, enquanto TasA se reúne em fibras amilóides que se ligam à parede celular por TapA, resultando em uma rede de fibras que fortalecem o biofilme (ROMERO et al., 2011). Nesta espécie, os genes *tapA* e *tasA* estão incluídos no operon *tapA-sipW-tasA*, onde *sipW* codifica uma peptidase de sinal, que libera as duas proteínas TapA e TasA para o meio extracelular. Entretanto, não há “paralog” de *bslA* ou *tapA* no genoma *B. cereus* s.s., mas *tasA* tem dois “paralogs”. Um é *tasA*, incluído no operon *sipW-tasA*, e o outro é *CALY*, que está localizado ao lado de *sipW-tasA*. Entretanto *CALY* parece não se manter constante no *B. cereus* (CARO-ASTORGA et al., 2015).

Essencialmente a matriz de biofilmes de *B. cereus* s.s. contém proteínas estruturais codificadas pelo operon *sipW-tasA* que é reprimido pelo regulador SinR, que por sua vez é antagonizado por SinI. A transcrição de SinI é ativada pelo regulador mestre *Spo0A*, que também regula a esporulação. Vários sistemas de

detecção de quórum estão envolvidos no circuito e o regulador *PlcR* é necessário à produção da proteína kurstakin, essencial para promoção da formação de biofilmes em associação com a matriz produzida pela ação do operon *sipW-tasA* (MAJED et al., 2016).

Na Figura 1 é possível visualizar em um esquema representativo como essa rede de regulação controla a formação de biofilmes.

Figura 1. Esquema representativo dos mecanismos de transcrição e regulação gênica que envolvem a formação de biofilmes de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus*. Adaptado de Majed et al., 2016.



Círculos simbolizam proteínas; caixas azuis representam "open reading frames"; caixas verdes representam a transcrição; setas azuis indicam ativação e vermelhas indicam repressão. Os componentes proteicos que compõem a matriz são codificados pelo operon *sipW-tasA* e por CALY, ativados por σ_{54} e reprimidos por SinR. O SinR é antagonizado por SinI, cuja transcrição é ativada por Spo0A, o regulador mestre de esporulação, que ao reprimir o regulador AbrB resulta na formação de biofilmes. O regulador PlcR ativa a transcrição de *nprR*, que promove a produção de kurstakin, que por sua vez promove a formação de biofilmes. O autoindutor AI-2 desempenha um efeito inibitório na formação do biofilme.

Apesar de muito estudados em *B. subtilis*, muitos mecanismos ainda não são conhecidos em *B. cereus*, podendo haver diferenças importantes na regulação da formação de biofilmes (MAJED et al., 2016). O autoindutor AI2 reprime a formação de biofilmes em *B. cereus* por mecanismos ainda pouco esclarecidos (Auger et al., 2006), e em contrapartida, induz a formação de biofilme em *B. subtilis* (Duanis-Assaf

et al., 2015). Isso denota o fato de que os estudos são particularmente necessários para melhor entendimento destas características em *B. cereus*.

CodY é uma proteína que controla centenas de genes geralmente relacionados aos níveis de disponibilidade de nutrientes, atuando como um regulador que indentifica o nível energético celular (SONENSHEIN, 2005). Ele possibilita efetivar a transcrição de *PlcR* em fase estacionária (FRENZEL et al., 2012; LINDBÄCK et al., 2012) induzindo a produção de um transportador necessário para a importação do peptídeo PapR, que ativa PlcR em *B. thuringiensis* (SLAMTI et al., 2015). Na fase exponencial ele atua reprimindo a transcrição de *nprR* (DUBOIS et al., 2013).

Outro regulador também observado em *B. cereus* é o Sigma 54 (σ_{54}), que promove uma conexão entre a formação de biofilmes, fatores de virulência e flagelinas (HAYRAPETYAN et al., 2015b). Essas interconexões indicam que os biofilmes podem estar envolvidos nos estilos de vida patogênicos, comensais ou necrotróficos de *B. cereus sensu lato* (MAJED et al., 2016).

O gene *sipW* codifica uma peptidase de sinal, que libera a proteína TasA para o meio extracelular, permitindo que ela produza fibras amilóides essenciais à estruturação do biofilme. Estudos conduzidos por Caro-Astorga et al. (2015), possibilitaram demonstrar que a deleção de *sipW* inibiu a montagem do biofilme, comprometendo sua estrutura tridimensional.

A proteína TasA, codificada pelo operon *sipW-tasA*, possibilita a geração de biofilmes com grande capacidade de adesão. Estudos demonstram que a deleção do gene *tasA* ocasionam defeitos estruturais importantes no biofilme, resultando em biofilmes fracamente aderidos a superfícies sólidas (CARO-ASTORGA et al., 2015).

O gene *plcR* exerce importante papel na formação de biofilmes por bactérias do grupo dos *Bacillus cereus* (BJØRNSTAD, 2006; MAJED 2016). Entretanto, este gene também pode atuar em outras funções relacionadas à virulência além da formação de biofilme, dentre os quais, a esporulação (HSUEH, 2006; GOHAR et al. 2008), e ainda, controlando a expressão outras três categorias gerais: (i) as proteínas da superfície celular, (ii) degradação de enzimas e (iii) toxinas (AGAISSE, et al, 1999; KOLSTØ; LERECLUS, 2002).

Este gene proporciona alta capacidade de adaptação a condições adversas, e as taxas de esporulação em biofilmes são altamente variáveis e se regulam conforme a cepa, disponibilidade de recursos ou mesmo do substrato, sendo o aço inoxidável o mais favorável à esporulação deste grupo nos biofilmes (HAYRAPETYAN et al., 2015a).

As bactérias do género *Bacillus* são capazes de sintetizar várias famílias de lipopeptídeos. Em 2000, foi descoberto que *Bacillus thuringiensis* produzia o kurstakin, um lipopeptídeo previamente desconhecido. As análises genômicas revelam que o locus *krs*, que codifica as sintetases de kurstakin, é específico para o grupo de *B. cereus*, mas está distribuído de forma desigual dentro deste grupo. Os genes do locus *krs* formam um operon e a transcrição de *krs* requer o “quórum sensing” NprR e também é regulado por Spo0A, sugerindo que kurstakin, essencial à consolidação de biofilmes, está sujeita a integração de múltiplos sinais, além da regulação ambiental já demonstrada em estudos prévios (GÉLIS-JEANVOINE et al., 2017).

Os estudos que abordam as interações entre os genes envolvidos na formação de biofilmes de microrganismos do grupo do *B. cereus* são importantes para um melhor entendimento das particularidades e principalmente para possibilitarem prevenir a formação destes (WIJMAN et al., 2007).

Em instalações, os microrganismos do grupo *B. cereus* podem persistir por longos períodos, podendo inclusive suportar procedimentos de sanitização (MAJED et al., 2016). Este efeito protetor contra desinfetantes e antimicrobianos é fornecido pela matriz extracelular, e os tornam os biofilmes de difícil erradicação (SIMÕES et al., 2006).

Nas plantas de processamento industrial, a desinfecção das linhas (incluindo tubos, trocadores de calor, válvulas) é composta por procedimentos de limpeza envolvendo álcalis ou outros agentes de limpeza. Tais procedimentos de limpeza e sanitização são criados para garantir a desinfecção da superfície limpa e eliminação dos resíduos dos agentes de saneamento nos locais de difícil acesso (VLKOVA et al., 2008).

O “clean in place” (CIP) é um procedimento geralmente empregado em linhas industriais de leite para limpeza da superfície do interior de tanques,

pasteurizadores, tubulações, e equipamentos associados ao processamento, sem que haja a necessidade de desmontá-los (THOMAS; SATHIAN, 2014).

Na indústria de laticínios, os sistemas CIP geralmente envolvem passos de lavagem com o uso em sequência de cáusticos e ácidos, com capacidade de remover resíduos orgânicos (proteínas e gorduras) e inorgânicos (cálcio e outros minerais) (MAJED et al., 2016).

Os procedimentos operacionais padronizados de higienização adotados nas indústrias devem ser eficientes para remoção de biofilmes, o que é difícil devido à elevada resistência (SHAHEEN et al., 2010). Alguns trabalhos avaliaram a eficácia do sistema de CIP utilizado pelos laticínios, o qual foi considerado como ineficiente na remoção completa dos biofilmes (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006), portanto, a busca de novas soluções deve ser incentivada (MAJED et al., 2016).

A sanitização nas indústrias de processamento de leite é realizada com o objetivo de eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos deteriorantes a níveis seguros. Os desinfetantes utilizados nas indústrias de laticínios brasileiras são aqueles dispostos na Portaria Nº 15, de 23 de agosto de 1988 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que registra os produtos saneantes com ação antimicrobiana de acordo com suas normas regulamentares, aqueles com os princípios ativos dos grupos: quaternário de amônio; compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo; compostos orgânicos liberadores de cloro ativo; ácido peracético; peróxido de hidrogênio; e ainda iodo e seus derivados (BRASIL, 1988; 1993; 1999).

Pechook et al. (2015) apresentaram novas alternativas visando prevenir a adesão de biofilmes por meio da utilização de materiais super hidrofóbicos como parafina e cristais de cera, que reduzem o contato entre bactérias e superfícies. Outras alternativas também apresentam resultados promissores, tais como a utilização de tratamento térmico combinado com tratamento de alta pressão (SILVA, 2015) e também do dióxido de cloro gasoso em superfícies de aço inoxidável (NAM et al., 2014).

Por muitos anos os estudos se concentraram principalmente no estado bacteriano planctônico (flutuante, ou livre), mas acredita-se que este estado fisiológico não represente nem mesmo 1% dos microrganismos bacterianos, que em

uma proporção praticamente absoluta, se encontram geralmente em biofilmes (MOMBA et al., 2000). Não por acaso, houve um aumento significativo do interesse da comunidade científica pela formação de biofilmes de *B. cereus* sensu lato na última década (MAJED et al., 2016).

Neste sentido, considera-se a realização do presente estudo uma contribuição importante para melhor compreender as particularidades ligadas a estes microrganismos quanto à formação de biofilmes, bem como possibilitar preveni-los nas linhas de processamento. Além disso, o estudo permite avaliar a eficácia dos desinfetantes utilizados no Brasil no combate a este microrganismo causador de DTAs e de perdas econômicas para os laticínios.

3. REFERÊNCIAS

AGAISSE, H.; GOMINET, M.; ØKSTAD, O. A.; KOLSTØ, A. B.; LERECLUS, D. *PlcR* is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular microbiology**, v. 32, n. 35, p. 1043-1053, 1999.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

BAYLES, K. W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 721-726, 2007.

BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B. M.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**, v. 25, p. 588-596, 2008.

BENNETT, S. D.; WALSH, K. A.; GOULD, L. H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 3, p. 425-433, 2013.

BJØRNSTAD, T. J. **Biofilm formation in *Bacillus cereus* group bacteria – screening of strains and initial molecular studies**. 2006. 148f. Thesis for the Master's degree in Molecular Biosciences. Disponível em <<https://www.duo.uio.no/handle/10852/11500>> Acesso em: 22 Jan. 2015.

BOULANG´E-PETERMANN, L.; RAULT, J.; BELLON-FONTAINE, M. N.; Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography

and roughness. **Biofouling**, v. 11, p. 201-216, 1997.

BRANDA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20-26, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares anexas à presente. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1988. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_88.htm>. Acesso em: 12 Mar. 2015.

BRASIL. Portaria Nº 122/DTN, de 29 de novembro de 1993. Inclui na Portaria Nº 15, de 23/08/88, sub anexo 1, alínea I, o princípio ativo ÁCIDO PERACÉTICO, para uso das formulações de desinfetantes/esterilizantes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 131, n. 228, p.18255, Seção 1, 1993.

BRASIL, Resolução Nº 211, de 18 de junho de 1999. Altera o texto do subitem 3 do item IV da Portaria Nº 15 de 23 de agosto de 1988, que passa a ter a seguinte redação: “desinfetantes para indústrias em superfícies onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios, podendo utilizar, exclusivamente, os princípios ativos dos grupos C, D, E, F e H do SUBANEXO 1 e também a substância PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 136, n. 116-E, p. 34, Seção 1, 1999.

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. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 254-262, 2006.

BREMER PJ, SEALE B, FLINT S, PALMER J. Biofilms in dairy processing. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, IV, editors. Biofilms in the food and beverage industries. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head Publishing Limited. p 396–431. 2009.

CAAMAÑO-ANTELO, S.; FERNÁNDEZ-NO, I. C.; BÖHME, K.; EZZAT-ALNAKIP, M.; QUINTELA-BALUJA, M.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; CALO-MATA, P. Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. **Food Microbiology**, v. 46, p. 288-298, 2015.

CARO-ASTORGA, J.; PÉREZ-GARCÍA, A.; DE VICENTE, A.; ROMERO, D. A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

CHEN, M. L.; TSEN, H. Y. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of

their annealing sites. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 5, p. 912-919, 2002.

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

CHRISTIANSSON A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.305-314, 1999.

CUTTING S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847-867, 2000.

DEVATKAL, S.; SOMERVILLE, J.; THAMMAKULKRAJANG, R.; BALASUBRAMANIAM, V. M. Microbiological efficacy of pressure assisted thermal processing and natural extracts against *Bacillus amyloliquefaciens* spores suspended in deionized water and beef broth. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 183-191, 2015.

DUBOIS, T.; PERCHAT, S.; VERPLAETSE, E.; GOMINET, M.; LEMY, C.; AUMONT-NICAISE, M. Activity of the *Bacillus thuringiensis* NprR-NprX cell-cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation. **Molecular microbiology**, v. 88, p.48–63, 2013.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

ELSHAGHABEE, F. M.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. *Bacillus* as Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017.

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

FAGERLUND, A.; DUBOIS, T.; ØKSTAD, O. A.; VERPLAETSE, E.; GILOIS, N.; BENNACEUR, I.; PERCHAT, S.; GOMINET, M.; AYMERICH, S.; KOLSTØ, A. B.; LERECLUS, D.; GOHAR, M. SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87532, 2014.

FAILLE C; CARPENTIER B. Food contact surfaces, surface soiling and biofilm formation. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, IV, editors. Biofilms in the food and beverage industries. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head Publishing Limited. p 304–30, 2009.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.

FRENZEL, E.; DOLL, V.; PAUTHNER, M.; LUCKING, G.; SCHERER, S.; EHLING-SCHULZ, M. CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. **Molecular Microbiology**, 85,67–88, 2012.

FRICKER, M., MESSELHÄUßER, U., BUSCH, U., SCHERER, S., EHLING-SCHULZ, M. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.6, p. 1892-1898, 2007.

GAO, T.; FOULSTON, L.; CHAI, Y.; WANG, Q.; LOSICK, R. Alternative modes of biofilm formation by plant-associated *Bacillus cereus*. **Microbiologyopen**, v. 4, n. 3, p. 452-464, 2015.

GÉLIS-JEANVOINE, S.; CANETTE, A.; GOHAR, M.; CARADEC, T.; LEMY, C.; GOMINET, M.; JACQUES, P.; LERECLUS, D.; SLAMTI, L. Genetic and functional analyses of *krs*, a locus encoding kurstakin, a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis*. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 4, p. 356-368, 2017.

GHIGO, J. M. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? **Research in Microbiology**, v. 154, n. 1, p. 1-8, 2003.

GOHAR, M.; FAEGRI, K.; PERCHAT, S.; RAVNUM, S.; ØKSTAD, O. A.; GOMINET, M.; KOLSTØ, A. B.; LERECLUS, D. The *PlcR* virulence regulon of *Bacillus cereus*. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2793, 2008.

GUINEBRETIERE, M. H.; THOMPSON, F. L.; SOROKIN, A.; NORMAND, P.; DAWYNDT, P.; EHLING-SCHULZ, M.; SVENSSON, B.; SANCHIS, V.; NGUYEN-THE, C.; HEYNDRIKX, M.; DE VOS, P. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 851-865, 2008.

GUINEBRETIERE, M. H.; VELGE, P.; COUVERT, O.; CARLIN, F.; DEBUYSER, M. L. The food poisoning power of *Bacillus cereus* Group strains varies according to phylogenetic affiliation (groups I-VII), not to species affiliation. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3388-3391, 2010.

GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; DE SARRAU, B.; DE BUYSER, M. L.; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E.; LERECLUS, D.; DE VOS, P.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 31-40, 2013.

HAMON, M. A.; LAZAZZERA, B. A. The sporulation transcription factor *Spo0A* is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 42, p. 1199-1209, 2001.

HARIRAM, U.; LABBE, R. Spore prevalence and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates from US retail spices. **Journal of food protection**, v. 78, n. 3, p. 590-596, 2015.

HAYRAPETYAN, H.; MULLER, L.; TEMPELAARS, M.; ABEE, T.; GROOT, M. N. 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, 2015a.

HAYRAPETYAN, H.; TEMPELAARS, M.; NIEROP GROOT, M.; ABEE, T. *Bacillus cereus* ATCC14579 RpoN (Sigma54) Is a pleiotropic regulator of growth, carbohydrate metabolism, motility, biofilm formation and toxin production. **PLoS ONE** 10:e0134872, 2015b.

HAYRAPETYAN, H.; SIEZEN, R.; ABEE, T.; GROOT, M. N. Comparative genomics of iron-transporting systems in *Bacillus cereus* strains and impact of iron sources on growth and biofilm formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

HELGASON, E.; ØKSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN, H. A.; FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA, I.; KOLSTØ, A. B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2627-2630, 2000.

HILL, K. K.; TICKNOR, L. O.; OKINAKA, R. T.; ASAY, M.; BLAIR, H.; BLISS, K. A.; LAKER, M.; PARDINGTON, P. E.; RICHARDSON, A. P.; TONKS, M.; BEECHER, D. J.; KEMP, J. D.; KOLSTØ, A. B.; WONG, A. C. L.; KEIM, P.; JACKSON, P. J. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1068-1080, 2004.

HOURY, A.; GOHAR, M.; DESCHAMPS, J.; TISCHENKO, E.; AYMERICH, S.; GRUSS, A.; BRIANDET, R. Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 32, p. 13088-13093, 2012.

HSUEH, Y. H.; SOMERS, E. B.; LERECLUS, D.; WONG, A. C. L. Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by *PlcR*, a pleiotropic regulator. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5089-5092, 2006.

HU, J. Y.; FAN, Y.; LIN, Y. H.; ZHANG, H. B.; ONG, S. L.; DONG, N.; XU, J. L.; NG, W. J.; ZHANG, L. H. Microbial diversity and prevalence of virulent pathogens in biofilms developed in a water reclamation system. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 9, p. 623-629, 2003.

IZANO, E. A.; AMARANTE, M. A.; KHER, W. B.; KAPLAN, J. B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 2, p. 470-476, 2008.

JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; KÄMPFER, P.; KOLSTØF, A. B.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J. F.; CODOÑER, F. M.; ROSSELLÓ-MÓRA, M. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 383-391, 2013.

JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 595, 2010.

JUNG, M. Y.; PAEK, W. K.; PARK, I. S.; HAN, J. R.; SIN, Y.; PAEK, J.; RHEE, M. S.; KIM, H.; SONG, H. S.; CHANG, Y. H. *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 867-871, 2010.

JUNG, M. Y.; KIM, J. S.; PAEK, W. K.; LIM, J.; LEE, H.; KIM, P. I.; MA, J. Y.; KIM, W.; CHANG, Y. H. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1027-1032, 2011.

KEARNS, D. B.; CHU, F.; BRANDA, S. S.; KOLTER, R.; LOSICK, R. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 739-749, 2005.

KO, K. S.; KIM, J. W.; KIM, J. M.; KIM, W.; CHUNG, S. I.; KIM, I. J.; KOOK, Y. H. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *PlcR* gene. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 5253-5261, 2004.

KOLSTØ, A. B.; LERECLUS, D. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the *PlcR* regulon. **Proteomics**, v. 2, p. 784-791, 2002.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology**, v. 42, n. 1, p. 9-27, 1998.

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

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

LANGSRUD, S.; SIDHU, M. S.; HEIR, E.; HOLCK, A. L. Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 283-290, 2003.

LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K. P.; PRÜB, B. M.; KAPLAN, T.; WIEBNER-GUNKEL, E.; STEWART, G. S. A. B.; SCHERER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International**

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 48, n. 4, p. 1373-1382, 1998.

LINDBÄCK, T.; MOLS, M.; BASSET, C.; GRANUM, P. E.; KUIPERS, O. P.; KOVÁCS, Á. T. CodY, a pleiotropic regulator, influences multicellular behaviour and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 2233-2246, 2012.

LIU, Y.; LAI, Q.; GÖKER, M.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; WANG, M.; SUN, Y.; WANG, L.; SHAO, Z. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific reports**, v. 5, p. 14082, 2015.

LOGAN, N. A.; LEBBE, L.; HOSTE, B.; GORIS, J.; FORSYTH, G.; HEYNDRICKX, M.; MURRAY, B. L.; SYME, N.; WYNN-WILLIAMS, D. D.; DE VOS, P. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1741-1753. 2000.

LUU-THI, H.; KHADKA, D. B.; MICHIELS, C. W. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 183-188, 2014.

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams; Wilkins Co., 1976. 312p.

MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2745-2754, 2007.

MAJED, R.; FAILLE, C.; KALLASSY, M.; GOHAR, M. *Bacillus cereus* Biofilms - Same, Only Different. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

MARLOW, V. L.; CIANFANELLI, F. R.; PORTER, M.; CAIRNS, L. S.; DALE, J. K.; STANLEY-WALL, N. R. The prevalence and origin of exoprotease-producing cells in the *Bacillus subtilis* biofilm. **Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 56-66, 2014.

MCAULEY, C. M.; MCMILLAN, K.; MOORE, S. C.; FEGAN, N.; FOX, E. M. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7402-7412, 2014.

MESSELHÄUSSER, U., FRENZEL, E., BLÖCHINGER, C., ZUCKER, R., KÄMPF, P., EHLING-SCHULZ, M. Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007–2013). **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

METTLER, E.; CARPENTIER, B. Location, enumeration and identification of the microbial contamination after cleaning EPDM gaskets introduced into a milk pasteurization line. **Le Lait**, v. 4, n. 77, p. 489-503, 1997.

MILLER, R. A.; KENT, D. J.; WATTERSON, M. J.; BOOR, K. J.; MARTIN, N. H.; WIEDMANN, M. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8492-8504, 2015.

MOLS, M.; ABEE, T. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 1387-1394, 2011.

MOSCOSO, MIRIAM; GARCÍA, ERNESTO; LÓPEZ, RUBENS. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 22, p. 7785-7795, 2006.

MOSSEL, D. A. A.; KOOPMAN, M. J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 650-653, 1967.

NAKAMURA, L. K. DNA relatedness among *Bacillus thuringiensis* serovars. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 125-129, 1994.

NAKAMURA, L. K.; JACKSON, M. A. Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 46-49, 1995.

NAKAMURA, L. K. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 1031-1035, 1998.

NAM, H.; SEO, H. S.; BANG, J.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* spores attached to and in a biofilm on stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 122-127, 2014.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PASVOLSKY, R.; ZAKIN, V.; OSTROVA, I.; SHEMESH, M. Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 181, p. 19-27, 2014.

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

PFLUGHOEFT, K. J.; SUMBY, P.; KOEHLER, T. M. *Bacillus anthracis* sin locus and regulation of secreted proteases. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 631-639, 2011.

PRÜß, B. M.; DIETRICH, R.; NIBLER, B.; MÄRTLBAUER, E.; SCHERER, S. The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus*

cereus Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.12, p. 5436-5442, 1999.

QIN, Z.; OU, Y.; YANG, L.; ZHU, Y.; TOLKER-NIELSEN, T.; MOLIN, S.; QU, D. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2083-2092, 2007.

RASKO, D. A.; ALTHERR, M. R.; HAN, C. S.; RAVEL, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 303-329, 2005.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 27 nov. 2016.

RANIERI, M. L.; HUCK, J. R.; SONNEN, M.; BARBANO, D. M.; BOOR, K. J. 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.

RASKO, D. A.; RAVEL, J.; ØKSTAD, O. A.; HELGASON, E.; CER, R. Z.; JIANG, L.; SHORES, K. A.; FOUTS, D. E.; TOURASSE, N. J.; ANGIUOLI, S. V.; KOLONAY, J.; NELSON, W. C.; KOLSTØ, A. B.; FRASER, C. M.; READ, T. D. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 977-988, 2004.

RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, p. 881-941, 2000.

REJASSE, A.; GILOIS, N.; BARBOSA, I.; HUILLET, E.; BEVILACQUA, C.; TRAN, S.; SANCHIS, V. Temperature-dependent production of various PlcR-controlled virulence factors in *Bacillus weihenstephanensis* strain KBAB4. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2553-2561, 2012.

REYES, J. E.; BASTIAS, J. M.; GUTIÉRREZ, M. R.; RODRÍGUEZ, M. D. L. O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 1-6, 2007.

ROSSI, A. C. R. **Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto quaternário de amônio utilizado na indústria de laticínios**. 2008. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

SALEH-LAKHA, S.; LEON-VELARDE, C. G.; CHEN, S.; LEE, S.; SHANNON, K.; FABRI, M.; DOWNING, G.; KEOWN, B. A. Study To Assess the Numbers and Prevalence of *Bacillus cereus* and Its Toxins in Pasteurized Fluid Milk. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 7, p. 1085-1089, 2017.

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

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACIC, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, p. 77-95, 2012.

SCHLEIFER, K.; WHITMAN, W. B. Bergey's manual of systematic bacteriology: The Firmicutes. 2 ed. New York: Springer; 2009.

SCHMIDT, R. H.; ERICKSON, D. J.; SIMS, S.; WOLFF, P. Characteristics of food contact surface materials: Stainless steel. **Food Protection Trends**, v. 32, n. 10, p. 574-584, 2012.

SCOTT, S. A.; BROOKS, J. D.; RAKONJAC, J.; WALKER, K. M.; FLINT, S. H. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, p. 109-117, 2007.

SETLOW, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 172-180, 2007.

SHAHEEN, R.; SVENSSON, B.; ANDERSSON, M. A.; CHRISTIANSSON, A.; SALKINOJA-SALONEN, M. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 347-355, 2010.

SHARIF, F. A.; ALAEDDINOGLU, N. G. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Industrial Microbiology; Biotechnology**, v. 3, p. 227-229, 1988.

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

SHEPPARD, S. K.; JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. A gene-by-gene approach to bacterial population genomics: whole genome MLST of *Campylobacter*. **Genes**, v. 3, n. 2, p. 261-277, 2012.

SILVA, M. P.; PEREIRA, C. A.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Methods of destroying bacterial spores. **Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education**, v. 1, p. 490-496, 2013.

SILVA, F. V. High pressure processing of milk: Modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores at 38-70° C. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 141-148, 2015.

SIMMONDS, P.; MOSSEL, B. L.; INTARAPHAN, T.; DEETH, H. C. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 11, p. 2070-2075, 2003.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; MACHADO, I.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 4, p. 338-345, 2006.

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

SLAMTI, L., LEMY, C., HENRY, C., GUILLOT, A., HUILLET, E., LERECLUS, D. CodY regulates the activity of the virulence quorum sensor plcr by controlling the import of the signaling peptide papr in *Bacillus thuringiensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p.1501, 2015.

SMITH, N. R.; GORDON, R. E.; CLARCK, F. E. **Aerobic Spore-forming Bacteria**. Washington: U.S. Department of Agriculture Miscellaneous Publication, 1952.

SOMERVILLE, H. J.; JONES, M. L. DNA competition studies within the *Bacillus cereus* group of bacilli. **Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 257-265, 1972.

SONENSHEIN, A. L. CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 2, p. 203-207, 2005.

SOROKIN, A.; CANDELON, B.; GUILLOUX, K.; GALLERON, N.; WACKEROW-KOUZOVA, N.; EHRLICH, S. D.; BOURGUET, D; SANCHIS, V. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1569-1578, 2006.

SOUFIANE, B.; BAIZET, M.; CÔTÉ, J. C. Multilocus sequence analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars navarrensis, bolivia and vazensis and *Bacillus weihenstephanensis* reveals a common phylogeny. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 195-205, 2013.

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.

STADHOUDERS, J. The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. **Bulletin-International Dairy Federation**, v. 275, p. 15-18, 1992.

STEINBERGER, R. E.; HOLDEN, P. A. Extracellular DNA in single-and multiple-species unsaturated biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5404-5410, 2005.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.

SVENSSON, B.; ENEROTH, A.; BRENDEHAUG, J.; MOLIN, G.; CHRISTIANSSON, A. Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 3, p. 455-460, 2000.

SWIECICKA, I.; VAN DER AUWERA, G. A.; MAHILLON, J. Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. **Microbial ecology**, v. 52, n. 3, p. 544-551, 2006.

TAMANG, J. P.; WATANABE, K.; HOLZAPFEL, W. H. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

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

TEWARI, A.; ABDULLAH, S. *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 5, p. 2500-2511, 2015.

TRAN, S. L.; GUILLEMET, E.; GOHAR, M.; LERECLUS, D.; RAMARAO, N. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 10, p. 2638-2642, 2010.

VAN MEERVENNE, E.; DE WEIRDT, R.; VAN COILLIE, E.; DEVLIEGHERE, F.; HERMAN, L.; BOON, N. Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer? **Pathogens and disease**, v. 70, p. 332-338, 2014.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JR., O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. Mesophilic heterotrophic microorganisms and spore forming bacteria from *Bacillus cereus* group in ultra high temperature milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

VIDAL, A. M. C.; ROSSI JR., O. D.; ABREU, I. L.; BÜRQUER, K. P.; CARDOSO, M. V.; GONÇALVES, A. C. S.; ROSSI, G. A. M.; D'ABREU, L. F. Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 286-292, 2016.

VILAIN S., PRETORIUS J. M., THERON J., BROZEL V. S. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2861-2868, 2009.

WANG, A.; ASH, G. J. Whole genome phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). **Scientific reports**, v. 5, p. 13644, 2015.

WARDA, A. K.; DEN BESTEN, H. M.; SHA, N.; ABEE, T.; GROOT, M. N. N. Influence of food matrix on outgrowth heterogeneity of heat damaged *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 201, p. 27-34, 2015.

WEBB, J. S., M. GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 578-585, 2003.

WESCHE, A. M.; GURTLER, J. B.; MARKS, B. P.; RYSER, E. T. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 1121-1138, 2009.

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

WIJMAN, J. G.; DE LEEUW, P. P.; MOEZELAAR, R.; ZWIETERING, M. H.; ABEE, T. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1481-1488, 2007.

WONG, H. C.; 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.

YAN, F.; YU, Y.; WANG, L.; LUO, Y.; GUO, J. H.; CHAI, Y. The *comER* gene plays an important role in biofilm formation and sporulation in both *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p.1025, 2016.

CAPÍTULO 2 - OCORRÊNCIA DE GENES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM MICRORGANISMOS DO GRUPO DO *Bacillus cereus* ISOLADOS DA CADEIA PRODUTIVA DE LEITE E EM PRODUTOS LÁCTEOS

RESUMO - As espécies do grupo do *B. cereus* são comuns na cadeia produtiva de leite e produtos lácteos. Devido ao seu envolvimento em doenças transmitidas por alimentos (DTAs) somado à sua capacidade de formar biofilmes em superfícies sólidas e ocasionarem recontaminação persistente dos produtos durante o processamento, representam risco à saúde pública e constituem uma preocupação constante à indústria de lácteos. Investigou-se neste estudo se genes relacionados à formação de biofilmes e linhagens específicas de *Bacillus cereus* estão significativamente distribuídos nos diversos estágios da cadeia produtiva de leite e produtos lácteos, e ainda, classifica-los em três categorias; fracos, moderados ou fortes produtores de biofilmes. Foram obtidos 69 isolados do grupo do *Bacillus cereus*, oriundos de 466 amostras colhidas em diversos estágios da cadeia produtiva, confirmados fenotipicamente e por sequenciamento genômico. A avaliação fenotípica da capacidade de formação de biofilmes foi realizada em microplacas de poliestireno, onde apenas um isolado (oriundo de teteiras) foi classificado como fraco produtor de biofilme e todos os demais (98,5%) foram classificados como moderados produtores de biofilme. Os resultados demonstraram alta ocorrência dos genes *sipW*, *tasA*, *Spo0A* e *PlcR* em isolados igualmente distribuídos ($p > 0,05$) ao longo de toda cadeia produtiva, inclusive nos produtos lácteos. Os isolados obtidos pertenceram aos grupos filogenéticos II, III, IV, V e VI, com 81,82% dos isolados oriundos de produtos lácteos processados (principalmente requeijões) pertencentes ao grupo III, de maior risco à saúde pública, pois são descritos como altamente citotóxicos. Microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* com genes relacionados à formação de biofilmes estão igualmente distribuídos na cadeia produtiva de leite e em produtos lácteos, e pertencem a uma grande diversidade de linhagens, incluindo o grupo filogenético III, de maior risco à saúde pública, e o controle de biofilmes é fundamental e igualmente importante nos diversos estágios da cadeia produtiva, mas especialmente nas operações de obtenção de leite, por possibilitar a redução da carga contaminante inicial e consequentemente promoção da segurança dos alimentos.

Palavras-Chave: Matriz extracelular, segurança dos alimentos, sequenciamento genômico

PREVALENCE OF GENES RELATED TO BIOFILM FORMATION IN MICROORGANISMS BELONGING TO *B. cereus* GROUP ISOLATED FROM DAIRY PRODUCTION CHAIN

ABSTRACT - The species included in *B. cereus* group are widely distributed in dairy environment. Due their involvement in foodborne outbreaks, the capacity for biofilm formation on stainless steel surfaces, the ability to cause persistent recontamination of dairy products during processing, and pose the public health into risk, they are considered as a concern for dairy industries. This study aimed to investigate if specific strains and genes for biofilm formation are significantly distributed and overpresented in distinct stages of dairy production chain. A set of 69 isolates belonging to *B. cereus* group confirmed phenotypically and by genomic sequencing were obtained in several stages of this production chain. Phenotypical analysis was performed using polystyrene microplates and only one isolate (teat cups) was classified as a weak biofilm producer while all others isolates (98.5%) were classified as moderate biofilm producers. A high prevalence of *sipW*, *tasA*, *Spo0A* and *PlcR* genes was shown, which were well distributed ($p>0.05$) to dairy production chain including dairy products. The isolates obtained belonged to the phylogenetic groups II, III, IV, V and VI, with a high number of isolates from dairy products included in group III, which is considered as the one with the highest risk for public health because they are described as highly cytotoxic agents. The genes related to biofilms formation by *B. cereus* group were equally distributed through dairy production chain, with strains belonging to several groups, including group III, which is considered as a risk for public health.

Keywords: Extracellular matrix, food safety, genomic sequencing

1. INTRODUÇÃO

O grupo do *Bacillus cereus* é o mais ocorrente em propriedades leiteiras e plantas de processamento de leite, e se trata de um dos mais importantes grupos de microrganismos deteriorantes da cadeia produtiva de leite e derivados. São de grande preocupação para a indústria de laticínios por estarem associados a incidências de DTAs (SIMÕES et al., 2010; KUMARI; SARKAR, 2016). Também conhecido por *Bacillus cereus* sensu lato (s.l.), esse grupo é composto por oito espécies distintas: *Bacillus cereus* sensu stricto (s.s.), *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cytotoxicus* (Guinebretiére et al., 2013) e *Bacillus toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013), além de outras quatro espécies com proposta de inclusão, *Bacillus wiedmannii* sp. nov (MILLER et al., 2015), *Bacillus bingmayongensis* sp. nov. (LIU et al., 2015), *Bacillus manliponensis* sp. nov. (JUNG et al., 2011) e *Bacillus gaemokensis* sp. nov. (JUNG et al., 2010). Estas espécies são classificadas por características fenotípicas (SCHLEIFER; WHITMAN, 2009).

Entretanto, esta diferenciação não é precisa, mesmo utilizando métodos moleculares (HELGASON et al., 2000; CAAMAÑO-Antelo et al., 2015) devido a alta similaridade de seus genomas (LIU et al., 2015; WANG; ASH, 2015). Guinebretiére et al. (2008) propuseram uma divisão em sete grupos filogenéticos, determinados por genotipagem da sequência do gene *panC*, sendo: Grupo I, *B. pseudomycoides*; Grupo II, *B. cereus* e *B. thuringiensis*; Grupo III, *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*; Grupo IV e Grupo V, *B. cereus* e *B. thuringiensis*; Grupo VI, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*; e por fim, Grupo VII, composto exclusivamente pelo *B. cereus*. Esta classificação tem importantes conseqüências práticas, atribuindo ao grupo III o maior risco à intoxicação alimentar, relatado como citotóxicos (GUINEBRETIERE et al., 2008; GUINEBRETIERE et al., 2010).

As espécies do grupo do *B. cereus* possuem uma habilidade de aderência e formação de biofilmes em superfícies sólidas, como o aço inoxidável, acarretando problemas e perdas econômicas consideráveis à indústria devido a deterioração de produtos lácteos e por comprometer as trocas de calor e eficiência dos equipamentos, além de possibilitar a recontaminação persistente dos produtos

durante o processamento (SALUSTIANO et al., 2009; KUMARI; SARKAR, 2016). Os biofilmes desempenham um papel fundamental nessa persistência e distribuição ubíqua, por se tratar de uma estrutura tridimensional estável que fornece proteção às bactérias residentes, inclusive a agentes sanitizantes, tornando o controle efetivo destes microrganismos uma tarefa desafiadora (BRANDA et al., 2005; KUMARI; SARKAR, 2016; MAJED et al., 2016).

O processo de formação de biofilmes é regulado em resposta a vários aspectos ambientais, e ocorre fundamentalmente pela produção de uma matriz polimérica extracelular composta por proteínas, exopolissacarídeos e DNA extracelular (FLEMMING; WINGENDER, 2010). De forma sucinta, o desenvolvimento do biofilme resulta da adesão bem sucedida e subsequente crescimento de microrganismos em superfícies (MARCHAND et al., 2012).

Os mecanismos que envolvem a regulação e controle da formação de biofilmes no grupo do *B. cereus* compõem um circuito complexo e dependente de uma série de elementos, incluindo fatores de transcrição e reguladores para os genes envolvidos. Esse circuito é bastante estudado em *B. subtilis* e *B. thuringiensis*, mas poucos genes envolvidos na formação de biofilmes têm sido caracterizados em *B. cereus* s.s. e os mecanismos específicos de sua rede reguladora são pouco esclarecidos (HAMON; LAZAZZERA, 2001; KEARNS et al., 2005; PFLUGHOEFT et al., 2011; LINDBÄCK et al., 2012; FAGERLUND et al., 2014; CARO-ASTORGA et al., 2015; GAO et al., 2015).

Essencialmente a matriz de biofilmes contém proteínas estruturais codificadas pelo operon *sipW-tasA* que é reprimido pelo regulador SinR, que por sua vez é antagonizado por SinI. A transcrição de SinI é ativada pelo regulador mestre *Spo0A*, que também regula a esporulação. Vários sistemas de detecção de quórum estão envolvidos no circuito e o regulador *PlcR* é necessário à produção da proteína kurstakin, essencial para promoção da formação de biofilmes em associação com a matriz produzida pela ação do operon *sipW-tasA* (MAJED et al., 2016).

Houve um aumento significativo do interesse da comunidade científica por pesquisas sobre formação de biofilmes em *B. cereus* sensu lato na última década (MAJED et al., 2016). Apesar disso, ainda há poucas que evidenciem o papel dos

biofilmes junto a epidemiologia do grupo do *B. cereus* na cadeia produtiva de leite e produtos lácteos.

Neste sentido, investigou-se neste estudo se genes relacionados à formação de biofilmes e linhagens específicas de *Bacillus cereus* estão significativamente distribuídos nos diversos estágios da cadeia produtiva de leite e produtos lácteos, e ainda, classifica-los em três categorias; fracos, moderados ou fortes produtores de biofilmes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas entre julho e novembro de 2016 um total de 466 amostras colhidas da cadeia produtiva de leite e produtos lácteos (331 destas oriundas de 52 propriedades leiteiras, 58 amostras de 2 indústrias e 77 de produtos lácteos comerciais obtidos no comércio varejista) da região de Pirassununga, São Paulo, Brasil.

As amostras foram colhidas em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na obtenção do leite cru e também de caminhões de transporte e de equipamentos utilizados durante o processamento do leite. Adicionalmente, amostras de produtos lácteos comerciais disponíveis em varejo, como queijos, iogurtes, requeijões, creme de leite UAT, leite UAT, bebida láctea UAT, leite condensado, leite pasteurizado e leite em pó foram obtidas de lotes distintos e diferentes marcas comerciais. As amostras foram coletadas utilizando-se de suabes estéreis, quando se tratava de superfícies, e frascos estéreis para as amostras de leite cru.

Inicialmente foi realizado pré-enriquecimento, inserindo os suabes em Caldo Triptona de Soja (TSB) (Oxoid, Hampshire, UK) adicionado de Polimixina B (20µg/mL) (STADHOUDERS, 1992) e incubado a 30°C durante 24 horas. Para as amostras de leite foi realizado o mesmo procedimento com 1mL da amostra. Posteriormente, uma alçada foi transferida para placas contendo Ágar Manitol Gema de Ovo e Polimixina B (MOSSEL et al., 1967) pela técnica de esgotamento e incubadas a 30°C por 24 a 48 horas. Foram selecionadas três a cinco colônias sugestivas e transferidas para tubos com Ágar Triptona de Soja (TSA) (Oxoid,

Hampshire, UK) inclinados e incubadas durante 24 horas a 30°C. Os isolados foram caracterizados por coloração de Gram e posteriormente foram submetidos a testes bioquímicos e classificados como pertencentes ao grupo do *B. cereus* quando apresentaram as seguintes características aos testes bioquímicos: catalase (+), fermentação anaeróbica da glicose (+), Voges-Proskauer (+), crescimento rizóide (-), hemólise de sangue de carneiro (+), produção de cristais (-), motilidade (+/-) e redução do nitrato a nitrito (+/-) (MACFADIN, 1976; SHARIF; ALAEDDINOGLU, 1988; APHA, 2001).

Os isolados foram submetidos à avaliação fenotípica de formação de biofilme em microplacas de poliestireno com 96 poços conforme técnica descrita por Gao et al. (2015) com adaptações. Para tanto, os isolados foram cultivados em caldo infusão cérebro-coração (BHI) a 30°C por 24 horas, diluídos em 1:1000 em caldo TSB e 200 µL transferidos aos poços da microplaca, onde foram incubados estaticamente a 30°C durante 24 horas. Para controle negativo, utilizou-se poços com apenas caldo TSB. O conteúdo de cada poço foi cuidadosamente removido e lavado com 200 µL de tampão PBS por 3 vezes. As placas foram secas em estufa a 60°C por 15 minutos e em seguida, coradas com cristal violeta 1% por 15 minutos. Em seguida os poços foram lavados com água destilada por 30 segundos e secos em estufa a 60°C por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1mL de etanol 95% v.v para dissolver o cristal violeta das placas e seladas com Parafilm®. O ensaio ocorreu em triplicata.

Para quantificar a formação de biofilme, realizou-se a leitura da densidade óptica (OD) a 570nm em leitor de placas de ELISA. O valor de corte se deu pela média dos controles negativos somados 3 vezes o desvio padrão (OD_c). Os isolados foram classificados em não produtores de biofilmes ($OD \leq OD_c$), e ainda em fracos ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$), moderados ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$), e fortes produtores de biofilme ($OD > 4 \times OD_c$) conforme Barbosa et al. (2013).

Afim de preparar as amostras para a extração de DNA, uma alçada das culturas mantidas nos tubos de TSA foi transferida para tubos com caldo TSB e incubados por 24 horas a 30°C preparando-as para a extração de DNA. Posteriormente, uma alíquota de 1,5 mL de cada cultura em TSB foi submetida a extração de DNA utilizando o Kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO) para bactérias Gram positivas, conforme as instruções do fabricante. A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria em sistema Nanodrop.

Foram preparadas bibliotecas de DNA (libraries) utilizando Illumina Nextera® XT Library Prep Kit (v3) de acordo com o protocolo do fabricante. De forma sucinta, esse processo envolve a fragmentação de 1 µg de DNA genômico por fragmentação enzimática, ligação de adaptadores nas porções finais dos fragmentos e a realização da PCR utilizando o conjunto de primers Illumina 3 primer set. AMPure® XP esferas paramagnéticas (*paramagnetic beads*) (Beckman Coulter, Inc., USA) foram utilizadas para realizar a limpeza do DNA depois de cada etapa, para remoção de pequenos fragmentos de DNA. As bibliotecas foram então normalizadas para o sequenciamento no aparelho Illumina MiSeq.

As sequências contíguas (*contigs*) foram montadas utilizando o SPAdes (BANKEVICH et al., 2012). Os genes individuais foram alinhados à cepa referência de *B. cereus* (ATCC 14579) utilizando os parâmetros padrões de BLAST da plataforma BIGSdb (JOLLEY; MAIDEN, 2010). O algoritmo BLAST foi utilizado para escanear todos os genomas para os genes ortólogos em cada locus do genoma de referência. Um ortólogo foi definido utilizando identidade superior a 70% e 50% de alinhamento do comprimento do fragmento. O software MAFFT foi utilizado para alinhar os genes ortólogos em uma abordagem gene por gene, e essas informações foram concatenadas em sequências contíguas para o genoma de cada isolado (SHEPPARD et al., 2012). A pesquisa de genes, exportação das sequências e alinhamentos gene a gene foram realizados através do MUSCLE (EDGAR, 2004). Foi investigada a presença de genes *sipW*, *tasA*, *Spo0A* e *PlcR*, envolvidos na formação de biofilmes (CARO-ASTORGA et al., 2015; MAJED et al., 2016).

Posteriormente, os isolados foram categorizados em três grupos baseados na origem de isolamento: 1) Equipamentos e utensílios; 2) Leite cru e superfície de tanque de refrigeração; e 3) Produtos lácteos; e também foram classificados entre os sete grupos filogenéticos propostos por Guinebretiére et al. (2008) de acordo com a sequência do gene *panC* através da ferramenta online (<https://www.tools.symprevius.org/Bcereus/english.php>).

Os dados do sequenciamento genômico dos 69 isolados obtidos na cadeia produtiva de leite e produtos lácteos (Documento Suplementar 1) estão depositados no NCBI GenBank e Short Read Archive (SRA) associado ao BioProjeto: PRJNA390851. Os genomas também estão disponíveis no FigShare (10.6084/m9.figshare.5120020). Os detalhes completos e os números de acesso individuais dos isolados utilizados como população “background” podem ser encontrados no Documento Suplementar 2.

A ocorrência de cada gene foi avaliada nos 69 isolados, entre os grupos baseados na origem de isolamento e entre a classificação por grupos filogenéticos aplicando-se o teste exato de Fisher à 5% de significância, usando o software R® (R CORE TEAM, 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 466 amostras analisadas, foram obtidos 69 isolados puros e caracterizados fenotípicamente como pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus*, confirmados bioquimicamente e por sequenciamento genômico. Em 397 amostras não foi possível detectar a presença do microrganismo ou não se obteve a cultura de colônias puras.

Dos 69 isolados, um conjunto de 38 destes foi obtido de 26 propriedades leiteiras, sete (7) deles obtidos de superfícies de tanques de resfriamento, um (1) de balde para ordenha manual, cinco (5) de latões de leite, quatro (4) de tubulações de equipamentos de ordenha, cinco (5) de teteiras, dez (10) obtidas de outros equipamentos e utensílios utilizados na obtenção do leite cru, e ainda, seis (6) amostras de leite cru. Outros nove (9) isolados foram obtidos em dois laticínios distintos, sendo dois (2) isolados oriundos da boca do tanque do caminhão utilizado para transporte do leite, três (3) obtidas de equipamentos, um (1) das tubulações de leite e três (3) deles oriundos de utensílios utilizados durante o processamento. Os demais 22 isolados foram obtidos de produtos lácteos comerciais disponíveis em varejo, sendo um (1) de queijo Minas frescal, um (1) de bebida láctea UAT, um (1) de creme preparado com queijo, um (1) de cappuccino instantâneo e por fim, 18 obtidos de queijos fundidos tipo requeijão.

Os isolados obtidos de propriedades leiteiras oriundos de leite cru, tanque de refrigeração, de equipamentos e de utensílios utilizados na obtenção do leite cru, representam 55,07% (38) dos isolados. Todas essas amostras influenciam diretamente na qualidade da matéria prima, fato que merece atenção, pois condições higiênicas pouco satisfatórias do ambiente de ordenha possibilita a agregação de carga microbiana contaminante (YOBOUET et al., 2014), problema recorrente nas propriedades leiteiras brasileiras (MAGNUSSON et al., 2007; VISSERS et al., 2007).

Como se sabe, as taxas de isolamento deste microrganismo podem ser reduzidas com práticas de higiene efetivas durante a obtenção de leite (Cui et al., 2016). Neste sentido, a necessidade de adoção de práticas preventivas durante os procedimentos de obtenção do leite cru são fundamentais para reduzir a contaminação e promover a segurança alimentar (MAGNUSSON et al., 2007; MASIELLO et al., 2014; KUMARI & SARKAR, 2014).

A avaliação de formação de biofilmes em placas de poliestireno demonstrou que 68 isolados (98,5%) podem ser classificados como moderados formadores de biofilmes e apenas um isolado foi classificado como fraco produtor de biofilme.

Kumari e Sarkar (2014) analisaram a ocorrência de microrganismos do grupo do *B. cereus* em 144 produtos lácteos, e obtiveram grande proporção (90,4%) de produtores de biofilmes, destes 78 isolados (54%) classificados como fracos, 13 (9%) moderados e 12 (8%) como fortes formadores de biofilme. Os autores acreditam que por conta da resistência e consequente dificuldade de sua eliminação das linhas de processamento, os biofilmes foram preponderantes para a contaminação destes produtos.

No entanto, 29% dos isolados daquele estudo foram classificados como não formadores de biofilmes. Isso diverge totalmente dos resultados observados no presente estudo, onde todos os isolados eram capazes de formar biofilmes, atribuindo maior potencial contaminante aos isolados deste estudo.

Neste sentido, a carga microbiana oriunda da matéria prima é fundamental no controle de biofilmes na indústria, reforçando a necessidade de intensificar as melhorias nos procedimentos de obtenção de leite cru das propriedades da região em estudo.

A ocorrência dos genes em estudo foi relacionada e avaliada com base na origem de isolamento (Tab. 1) e no grupo filogenético (Tab. 2).

Tabela 1. Ocorrência dos genes relacionados com a formação de biofilme (*sipW*, *tasA*, *Spo0A* e *PlcR*) em isolados do grupo do *B. cereus* obtidos de equipamentos e utensílios, leite cru ou tanque de resfriamento, e produtos lácteos na região de Pirassununga, São Paulo, Brasil, em 2016.

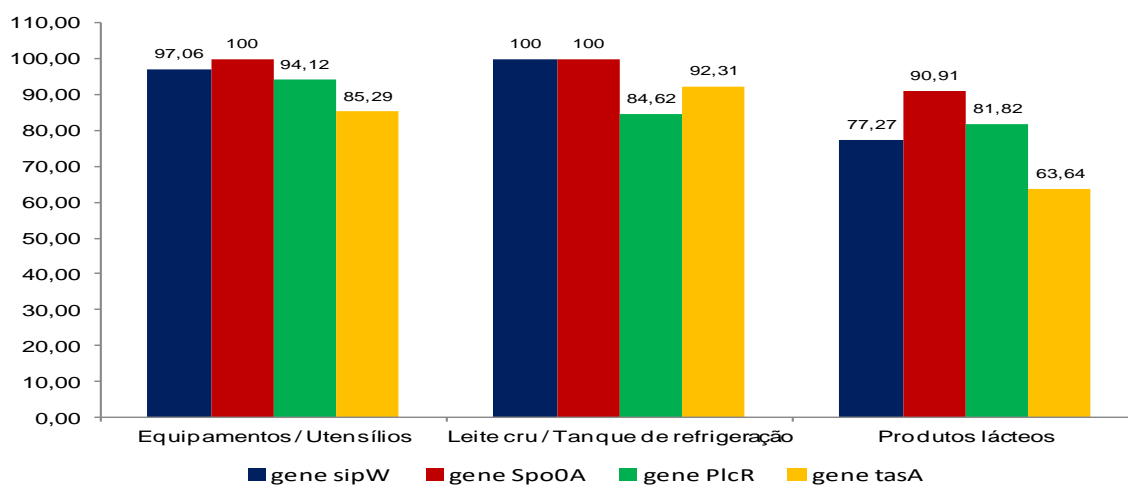
	Equipamentos/ Utensílios		Leite cru/ Tanque de refrigeração		Produtos lácteos		Total	
	+ (%)	I.C. 95%	+ (%)	I.C. 95%	+ (%)	I.C. 95%	+ (%)	I.C. 95%
<i>sipW</i>	33 (97,06)	85,1-99,5	13 (100,00)	77,2-100	17 (77,27)	56,6-89,9	62 (89,9)	80,5-95,0
<i>Spo0A</i>	34 (100,00)	89,8-100	13 (100,00)	77,2-100	20 (90,91)	0,81-21,8	66 (95,6)	88,0-98,5
<i>tasA</i>	29 (85,29)	69,8-93,5	12 (92,31)	66,7-98,6	14 (63,6)	42,9-80,3	55 (79,71)	70,5-85,0
<i>PlcR</i>	32 (94,12)	80,9-98,4	11 (84,62)	57,8-95,7	18 (81,82)	61,5-92,7	61 (88,4)	78,75-94,0
Total	34 (100,00)	-	13 (100,00)	-	22 (100,00)	-	69 (100,00)	-

* + = número de isolados positivos; % = frequência; I. C. 95% = intervalo de confiança a 95%

Não houve diferença na ocorrência de nenhum dos genes em estudo entre os três grupos categorizados quando aplicado o Teste exato de Fisher ($p > 0,05$), demonstrando que não há diferença da ocorrência destes genes entre a origem dos isolados deste estudo e consequentemente, há alta ocorrência de isolados capazes de formar biofilmes ao longo de toda a cadeia produtiva de leite e produtos lácteos.

O gráfico da Figura 1. demonstra que as ocorrências de *Spo0A* e *sipW* em 100% de isolados concentram-se nos isolados agrupados em equipamentos e utensílios utilizados na obtenção ou armazenamento de leite cru.

Figura 1. Distribuição das frequências dos genes relacionados à formação de biofilmes em *Bacillus cereus* s.s. agrupados conforme a origem dos isolados oriundos da região de Pirassununga, SP, Brasil.



O grupo do *B. cereus* pode ser introduzido na cadeia produtiva veiculado por várias fontes durante a obtenção e processamento, mas especialmente por equipamentos inadequadamente limpos e/ou sanitizados (SIMMONDS *et al.*, 2003; RYU; BEUCHAT, 2005).

Sabe-se que a capacidade de formar biofilmes depende de uma série de fatores, dentre os quais, o substrato (HAYRAPETYAN *et al.*, 2015). Apesar de serem capazes de formar biofilmes em superfícies como o poliestireno, vidro e borracha (GAO *et al.*, 2015; METTLER; CARPENTIER, 1997), o aço inoxidável é o mais favorável, onde ocorre maior número de células anexadas e biomassa total (HAYRAPETYAN *et al.*, 2015). Portanto, os isolados deste estudo potencialmente promovem biofilmes mais intensos em superfícies de aço inoxidável.

O fato das ocorrências de *Spo0A* e *sipW* em 100% de isolados, e as maiores frequências dos genes de forma geral, concentrarem-se nos isolados oriundos de equipamentos e utensílios utilizados na obtenção ou armazenamento de leite cru denota a importância das medidas de higiene e sanitização das operações de obtenção de leite, pois tratam-se de equipamentos e utensílios confeccionados em aço inoxidável.

O gene *sipW* codifica uma peptidase de sinal, que permite uma estruturação mais consistente dos biofilmes, proporcionado pela liberação de proteínas codificadas por *tasA* (Caro-Astorga *et al.*, 2015), presente em 85,29% e 92,31% dos isolados da mesma origem. Biofilmes bem estruturados permitem maior proporção de esporulação, podendo chegar a taxas de até 90% dos microrganismos ali presentes (WIJMAN *et al.*, 2007).

Tanto o gene *Spo0A*, presente em 100% dos isolados originados de equipamentos/utensílios e leite cru/tanque de refrigeração, quanto o *PlcR*, frequente em 94,12% e 84,62% dos isolados da mesma origem respectivamente, pode atuar em outras funções relacionadas à virulência além da formação de biofilme, como a esporulação (HSUEH, 2006; GOHAR *et al.* 2008; MAJED *et al.*, 2016). O gene *PlcR* proporciona alta capacidade de adaptação a condições adversas, e as taxas de esporulação em biofilmes são altamente variáveis conforme a estirpe, disponibilidade de recursos ou mesmo do substrato, sendo o aço inoxidável o mais favorável à esporulação deste grupo nos biofilmes (HAYRAPETYAN *et al.*, 2015).

As fortes propriedades de adesão dos esporos de *B. cereus* em biofilmes dificultam sua remoção das superfícies (KUMARI; SARKAR, 2014; MARCHAND et al., 2012). No entanto, boas práticas de higiene em propriedades leiteiras durante a obtenção do leite cru podem reduzir a contaminação do leite cru por esporos, inclusive no tanque de resfriamento (MAGNUSSON et al., 2007; VISSERS et al., 2007). Isso é preocupante uma vez que as propriedades leiteiras, onde os resultados indicam grandes potencial de ocorrer, os procedimentos de higienização tem se mostrado negligente no Brasil.

Características que contribuem para a contaminação do leite com esporos de *B. cereus* s.s. são frequentemente observadas em propriedades leiteiras brasileiras, como a presença de fezes no ambiente da ordenha, utilização de camas (MAGNUSSON et al., 2007) e uso de silagem (VISSERS et al., 2007) de forma inapropriada.

Uma vez que a carga microbiana inicial do leite cru pode prejudicar as indústrias por conta de deterioração e principalmente, por representar risco à saúde pública, os cuidados que envolvem o processo de obtenção e fabricação de leite e produtos lácteos devem ser muito rigorosos. Neste sentido, deve abranger desde a forma como o gado é mantido e ordenhado nas propriedades até as boas condições de equipamentos de processamento das usinas leiteiras (MARCHAND, 2012).

A formação de biofilme de forte adesão em equipamentos e plantas de processamento é extremamente preocupante, pois além de mais difíceis de serem eliminados, tornam seus residentes mais resistentes a higienização (SREY et al., 2013), e ainda favorecem a transferência de plasmídeos aumentando a troca genética entre bactérias, incluindo genes de resistência a antibióticos (VAN MEERVENNE et al., 2014). Os perfis de resistência a antibióticos de isolados de *B. cereus* são preocupantes para a saúde pública (CUI et al., 2016).

Estudos demonstram que contaminações podem se dar em toda a linha de processamento, incluindo pasteurizador, máquinas de envase e embaladeiras (ENEROTH et al., 2001).

Vale ressaltar que os biofilmes não são apenas uma fonte potencial de contaminação pois também acarretam um aumento considerável da taxa de corrosão de tubulações e equipamentos, ocasionando redução da transferência de

calor e conseqüentemente, reduzindo a eficiência dos processamentos térmicos (KUMAR; ANAND, 1998). Assim, para se evitar e combater a contaminação de equipamentos por biofilmes, especialmente devido às tendências de utilização de equipamentos e plantas cada vez mais complexas e automatizadas, é importante que sejam adotados e exigidos parâmetros microbiológicos cada vez mais rigorosos (PASVOLSKY et al., 2014).

Em 6 isolados foram detectados somente um (isolados 31, 47, 83 e 84) ou dois (isolados 33 e 37) dos genes pesquisados. Destes, um isolado oriundo de latão de leite, e os demais de requeijão.

Estudos têm demonstrado que a pasteurização induz à lesões bacterianas subletais e podem ainda, ocorrer danos ao DNA por consequência de estresse térmico, resultando em quebra de cadeias, provavelmente devido à estimulação da atividade de endonucleases, ou perda de Mg^{2+} , requerido pela DNA Ligase para reparo de danos (WESCHE et al., 2009; SILVA et al., 2013; DEVATKAL et al., 2015). Estes microrganismos possuem mecanismos capazes de reparar esse tipo de dano, porém há influência da composição de nutrientes (WARDA et al., 2015). Além disso, há danos que podem degradar pequenas proteínas e podem comprometer o mecanismo de proteção ao DNA celular presente em bactérias formadoras de esporos (SETLOW, 2007).

Wijman et al. (2007) analisaram 52 cepas de *B. cereus* de várias origens, incluindo isolados de origem alimentar, e observaram que o grau de formação de biofilmes variou consideravelmente. Foram avaliados meios, tempos e temperaturas diferentes.

Contudo, assim como no presente estudo, todos os microrganismos mostraram-se capazes de formar biofilmes, variando o grau conforme cada circunstância. Os autores concluíram que apesar dos fatores extrínsecos exercerem forte influencia nesta característica, a capacidade de formação de biofilmes é altamente dependente das particularidades de cada bactéria, por conta da plasticidade do genoma deste microrganismo.

Neste sentido, o conhecimento da diversidade e distribuição das linhagens de *B. cereus* nos diferentes estágios da cadeia produtiva pode ser fundamental para o controle e prevenção da disseminação deste microrganismos.

O resultados da avaliação dos genes quanto ao grupo filogenético estão descritos à seguir (Tab. 2).

Tabela 2. Ocorrência dos genes relacionados com a formação de biofilme (*sipW*, *Spo0A*, *tasA* e *PlcR*) nos grupos filogenéticos do grupo do *B. cereus* (Guinebretiére et al., 2008), isolados em diversos estágios da cadeia produtiva de leite e produtos lácteos, na região de Pirassununga, São Paulo, Brasil, em 2016.

	II		III		IV		V		VI	
	+	I.C.95%	+	I.C.95%	+	I.C.95%	+	I.C.95%	+	I.C.95%
<i>sipW</i>	2 (100)	34,2-100	29 (85,29)	69,9-93,5	22 (100)	85,1-100	8 (100)	67,6-100	1 (100)	20,6-100
<i>Spo0A</i>	2 (100)	34,2-65	32 (94,12)	80,9-98,4	22 (100)	85,1-100	8 (100)	67,6-100	1 (100)	20,6-100
<i>tasA</i>	1 (50,00)	9,4-95,5	24 (70,59)	53,8-83,2	21 (95,5)	78,2-99,2	8 (100)	67,6-100	1 (100)	20,6-100
<i>PlcR</i>	2 (100)	34,2-100	30 (88,24)	73,4-95,3	19 (86,3)	66,7-95,2	8 (100)	67,6-100	1 (100)	20,65-100
Total	2 (100)	-	34 (100)	-	22 (100)	-	8 (100)	-	1 (100)	-

* + = número de isolados positivos; N = número de isolados; P= ocorrência; I. C. 95% = intervalo de confiança a 95%

As semelhanças genéticas entre as diferentes espécies que pertencem ao grupo do *B. cereus* vêm sendo descritas na literatura (HELGASON et al., 2000; CAAMAÑO-ANTELO et al., 2015). Nenhum isolado pertencente aos grupos filogenéticos I ou VII foi detectado neste estudo, nos quais as espécies *B. pseudomycooides* e *B. cytotoxicus* estão incluídas (GUINEBRETIERE et al., 2008; GUINEBRETIERE et al., 2010). Somente um isolado detectado pertenceu ao grupo filogenético VI, composto por *B. weihenstephanensis*, *B. mycooides* e *B. thuringiensis*.

Os resultados demonstram que os isolados obtidos da cadeia produtiva de leite e em produtos lácteos pertencem a diferentes grupos filogenéticos. Não houve diferença na ocorrência de nenhum dos genes em estudo, entre os cinco grupos filogenéticos detectados quando utilizado o Teste exato de Fisher ($p>0,05$).

Isolados obtidos de amostras de leite cru e tanques de resfriamento, e aqueles obtidos de amostras de equipamentos e utensílios de propriedades leiteiras e laticínios estão distribuídos em diferentes agrupamentos pertencentes aos grupos filogenéticos II, III, IV, V e VI (GUINEBRETIERE et al., 2008).

Dentre os produtos lácteos foi observado 18 (81,82%) dos isolados pertencentes ao grupo filogenético III, destes, 15 (83,33%) queijos fundidos tipo requeijão. Esse grupo filogenético é considerado como o de maior risco em causar doenças de origem alimentar (GUINEBRETIERE et al., 2008). Os isolados incluídos

nesse grupo são geralmente citotóxicos e alguns com elevada citotoxicidade, representando risco à saúde pública (GUINEBRETIERE et al., 2008; GUINEBRETIERE et al., 2010). A ocorrência de *B. cereus* s.s. toxigênico em leite cru, leite pasteurizado, derivados lácteos e laticínios vem sendo descrita no Brasil (Vidal-Martins et al., 2006; Salustiano et al., 2009; Reis et al., 2013).

A presença de isolados pertencentes ao grupo filogenético III em produtos termicamente tratados, como o requeijão, pode estar relacionada com a grande capacidade dos esporos desses isolados resistirem ao tratamento térmico pelo calor (LUU-THI et al., 2014). Como se sabe, a pasteurização induz a esporulação, mas os esporos podem subsequentemente sobreviver a esse processo e posteriormente contaminar os produtos lácteos (BARTOSZEWICS et al., 2008; MILLER et al., 2015).

4. CONCLUSÃO

Bactérias do grupo do *Bacillus cereus* com genes relacionados à formação de biofilmes estão igualmente distribuídos na cadeia produtiva de leite e em produtos lácteos, e pertencem a uma grande diversidade de linhagens, incluindo o grupo filogenético III, de maior risco à saúde pública. Devido a dimensão de seu potencial contaminante, o controle de biofilmes é fundamental e igualmente importante nos diversos estágios da cadeia produtiva, mas especialmente nas operações de obtenção de leite, por possibilitar a redução da carga contaminante inicial e consequentemente promoção da segurança dos alimentos.

5. AGRADECIMENTOS

O autor agradece a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (Processo 2015/20874-0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de doutorado (Processo 2014/166512-1).

6. REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; PYSHKIN, A. V. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, v.19, n. 5, p. 455-477, 2012.

BARBOSA, J., BORGES, S., CAMILO, R., MAGALHÃES, R., FERREIRA, V., SANTOS, I. Teixeira, P. Biofilm formation among clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes*. **International journal of microbiology**, 2013.

BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B.M.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**, v.25, p.588-596, 2008.

BRANDA, S.S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends microbiology**, v.13, p.20-26, 2005.

CAAMAÑO-ANTELO, S.; FERNÁNDEZ-NO, I. C.; BÖHME, K., EZZAT-ALNAKIP, M., QUINTELA-BALUJA, M.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; CALO-MATA, P. Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus spp.* based on three housekeeping genes. **Food microbiology**, 46, 288-298, 2015.

CARO-ASTORGA, J.; PÉREZ-GARCÍA, A.; DE VICENTE, A.; ROMERO, D. A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms. **Frontiers microbiology**, v.5, 2015.

DEVATKAL, S.; SOMERVILLE, J.; THAMMAKULKRAJANG, R.; BALASUBRAMANIAM, V.M. Microbiological efficacy of pressure assisted thermal processing and natural extracts against *Bacillus amyloliquefaciens* spores

suspended in deionized water and beef broth. **Food and Bioproducts Processing**, v.95, p.183-91, 2015.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high 1072 throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.1792-1797, 2004.

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

FAGERLUND, A.; DUBOIS, T.; ØKSTAD, O. A.; VERPLAETSE, E.; GILOIS, N., BENNACEUR, I.; LERECLUS, D. SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. **PLoS One**, v.9, n.1, p. e87532, 2014.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.623–633, 2010.

GAO, T.; FOULSTON, L.; CHAI, Y.; WANG, Q.; LOSICK, R. Alternative modes of biofilm formation by plant-associated *Bacillus cereus*. **Microbiologyopen**, v.4, n.3, p. 452-464, 2015.

GUINEBRETIERE, M. H.; THOMPSON, F. L.; SOROKIN, A.; NORMAND, P.; DAWYNDT, P.; EHLING-SCHULZ, M.; DE VOS, P. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology**, v.10, n.4, p. 851-865. 2008.

GUINEBRETIERE, M. H.; VELGE, P.; COUVERT, O.; CARLIN, F.; DEBUYSER, M. L. The food poisoning power of *Bacillus cereus* Group strains varies according to phylogenetic affiliation (groups I-VII), not to species affiliation. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3388-3391, 2010.

GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; DE SARRAU, B.; DE BUYSER, M. L.; DE VOS, P. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.63, n.1, p.31-40, 2013.

GOHAR, M., FAEGRI, K., PERCHAT, S., RAVNUM, S., ØKSTAD, O. A., GOMINET, M., LERECLUS, D. The *PlcR* virulence regulon of *Bacillus cereus*. **PLoS One**, v.3, n.7, p.e2793, 2008.

HAMON, M.A.; LAZAZZERA, B.A. The sporulation transcription factor *Spo0A* is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v.42, p.1199-1210, 2001.

HAYRAPETYAN H., MULLER L., TEMPELAARS M., ABEE T., NIEROP GROOT M. Análise comparativa da formação de biofilmes por isolados de referência de *Bacillus cereus* e isolados de alimentos não domesticados e efeito de ferro livre. **International Journal of Food Microbiology**, v.200, p.72-79, 2015.

HELGASON, E.; OKSTAD, O.A.; CAUGANT, D.A.; JOHANSEN, H.A.; FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA, I.; KOLSTØ, A.B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2627-2630, 2000.

HSUEH, Y.H.; SOMERS, E.B.; LERECLUS, D.; WONG, A.C.L. Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by *PlcR*, a pleiotropic regulator. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.7, p.5089-5092, 2006.

JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; CODOÑER, F. M. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and applied microbiology**, v.36, n.6, p.383-391, 2013.

JOLLEY, K.A.; MAIDEN, M.C. BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinformatics**, v.11, n.1, p.595, 2010.

JUNG, M. Y.; PAEK, W. K.; PARK, I. S.; HAN, J. R.; SIN, Y.; PAEK, J.; CHANG, Y. H. *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. **The Journal of Microbiology**, 48(6), 867-871, 2010.

JUNG, M. Y.; KIM, J. S.; PAEK, W. K.; LIM, J.; LEE, H.; KIM, P. I.; CHANG, Y. H. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n.6, p.1027-1032, 2011.

KEARNS, D. B.; CHU, F.; BRANDA, S. S.; KOLTER, R.; LOSICK, R. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 55, n. 3, p. 739-749, 2005.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, n.1, p. 9-27, 1998.

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

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

LINDBÄCK, T.; MOLS, M.; BASSET, C.; GRANUM, P. E.; KUIPERS, O. P.; KOVÁCS, Á. T. CodY, a pleiotropic regulator, influences multicellular behaviour and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*. **Environmental Microbiology**, v.14, p.2233-2246, 2012.

LIU, Y.; LAI, Q.; GÖKER, M.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; WANG, M.; SUN, Y.; SHAO, Z. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific reports**, v.5, 2015.

LUU-THI, H.; KHADKA, D.B.; MICHIELS, C.W. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.189, p.183-188, 2014.

MACFADIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore: **The Willians and Willians**, 1976. 312p.

MAJED, R.; FAILLE, C.; KALLASSY, M.; GOHAR, M. *Bacillus cereus* Biofilms - Same, Only Different. **Frontiers microbiology**, v.7, 2016.

METTLER, E.; CARPENTIER, B. Location, enumeration and identification of the microbial contamination after cleaning EPDM gaskets introduced into a milk pasteurization line. **Le Lait**, v.77, p.489-503, 1997.

MILLER, R. A.; KENT, D. J.; WATTERSON, M. J.; BOOR, K. J.; MARTIN, N. H.; WIEDMANN, M. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. **Journal of dairy science**, v. 98, n.12, p. 8492-8504, 2015.

MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v.15, n.3, p.650-653, 1967.

PASVOLSKY, R.; ZAKIN, V.; OSTROVA, I.; SHEMESH, M. Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.181, p.19-27, 2014.

PEÑA, W. E. L.; DE ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F.; ALVARENGA, V. O.; JUNIOR, S. R.; GRANATO, D.; SOUZA SANT'ANA, A. 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.

PFLUGHOEFT, K.J.; SUMBY, P.; KOEHLER, T.M. *Bacillus anthracis* sin locus and regulation of secreted proteases. **Journal of Bacteriology**, v.193, p.631-639, 2011.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acessado em: 27 nov. 2016.

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

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

SCHLEIFER, K; WHITMAN, W.B. Bergey's manual of systematic bacteriology: The Firmicutes. 2.ed. New York: **Springer**; 2009.

SETLOW, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. **Trends microbiology**, v.15, n.4, p.172-180, 2007.

SHARIF, F.A.; ALAEDDINOGLU, N.G. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.3, p.227-229, 1988.

SHEPPARD, S.K.; JOLLEY, K.A.; MAIDEN, M.C. A gene-by-gene approach to bacterial population genomics: whole genome MLST of *Campylobacter*. **Genes**, v.3, n.2, p.261-277, 2012.

SILVA, M.P.; PEREIRA, C.A.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Methods of destroying bacterial spores. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. v.1, p.490-496, 2013.

SIMMONDS, P.; MOSSEL, B.L.; INTARAPHAN, T.; DEETH, H.C. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. **Journal of Food Protection**, v.66, n.11, p.2070-2075, 2003.

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

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.

STADHOUDERS, J. The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. Bull. **International Dairy Federation**, v.275, p.15-18, 1992.

VAN MEERVENNE, E.; DE WEIRDT, R.; VAN COILLIE, E.; DEVLIEGHERE, F.; HERMAN, L.; BOON, N. Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer? **Pathogens and Disease**, v.70, p.332-338, 2014.

WANG, A.; ASH, G.J. Whole genome phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). **Scientific Reports**, v.5, p.13644, 2015.

WARDA, A.K.; DEN BESTEN, H.M.; SHA, N. et al. Influence of food matrix on outgrowth heterogeneity of heat damaged *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology**, v.201, p.27-34, 2015.

WESCHE, A.M.; GURTLER, J.B.; MARKS, B.P.; RYSER, E.T. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v.72, n.5, p.1121-1138, 2009.

CAPÍTULO 3 – EFICIÊNCIA DE DESINFETANTES SOBRE BIOFILMES DE *Bacillus cereus* sensu stricto FORMADOS EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL EM CONTATO COM LEITE

RESUMO - As espécies do grupo do *Bacillus cereus* possuem a habilidade de se aderir e formar biofilmes em superfícies sólidas, dentre as quais o aço inoxidável, amplamente utilizado pela indústria de alimentos. Os biofilmes possibilitam a recontaminação persistente dos produtos durante o processamento, e o procedimento “clean in place” (CIP) é bastante empregado pelas indústrias na intenção de controlá-los. Neste sentido, objetivou-se avaliar a atuação e eficiência do ácido peracético e do hipoclorito de sódio junto ao sistema “clean in place”, simulado em escala piloto, sobre biofilmes de *Bacillus cereus* s.s. formados em superfícies de aço inoxidável em contato com o leite. Foi utilizado um isolado de *B. cereus* reconhecidamente produtor de biofilmes por análises genômicas, para a indução de biofilme em aço inoxidável do tipo AISI 304. Utilizando-se de um protótipo experimental, foi induzida a formação de biofilmes em superfícies de aço inoxidável submersas em leite tindalizado experimentalmente contaminado com células vegetativas, esporos, e ainda, contaminado e pasteurizado, constituindo três situações distintas. Posteriormente foram submetidos ao processo de higienização, com solução alcalina e ácida, seguida de sanitização com ácido peracético e hipoclorito de sódio. A adesão dos microrganismos à superfície dos cupons alcançou $6,3 \times 10^5$ a $3,1 \times 10^7$ UFC/cm², resultando entre $3,0 \times 10^4$ e $8,1 \times 10^6$ UFC/cm² ao final do processo de sanitização. Os resultados demonstraram não haver diferença significativa entre a adesão de superfícies nas 3 categorias estudadas, e também não houve diferença entre os desinfetantes utilizados. A ação do ácido peracético e do hipoclorito de sódio demonstraram desempenhos semelhantes, mas não foram suficientemente eficazes nas condições do presente estudo, quando usados no sistema “Clean in place” para a remoção de *B. cereus* s.s. aderidos a superfícies de aço inoxidável do tipo AISI 304 submersas em leite.

Palavras-Chave: Ácido peracético, hipoclorito de sódio, recontaminação, segurança dos alimentos

EFFICIENCY OF DIFFERENT DISINFECTANTS ON *Bacillus cereus sensu stricto* BIOFILMS ON STAINLESS STEEL SURFACES IN CONTACT WITH MILK

ABSTRACT - The species included in *B. cereus* group have the ability to adhere and form biofilms on solid surfaces, including stainless steel, which is widely used in food industries. Biofilms allow food persistent recontamination during processing and "Clean in place" (CIP) system is highly used by industries in order to control them. Thus, this study aimed to evaluate the efficacy of peracetic acid and sodium hypochlorite against biofilms induced on stainless steel surfaces. One isolated admitted as biofilm producer by genomic analyses and with toxigenic and spoilage potential obtained from milking equipment was selected for biofilm induction on stainless steel AISI 304. For this, tindalized milk was used, contaminated with vegetative cells and the *B. cereus* spores, and the rest, were contaminated and pasteurized, constituting three categories. They were submitted to biofilm induction and posteriorly to the same hygienic process using alkaline and acid solutions, followed by disinfectants (peracetic acid and sodium hypochlorite). Microorganisms' adhesion on surfaces reached 6.3×10^5 to 3.1×10^7 CFU/cm². The results did not have a significant difference between adhesion on surfaces on the three studied categories, and also did not existed difference on both disinfectants used. The peracetic acid and sodium hypochlorite have similar performance, but were not sufficiently effective to control biofilms on conditions of this study, when used on a "clean in place" for the removal of *B. cereus* s.s. adhered to stainless steel surfaces of type AISI 304 submerged in milk.

Keywords: Peracetic acid, sodium hypochlorite, recontamination, food safety

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* estão entre os deteriorantes mais importantes da cadeia produtiva leiteira e também entre aqueles envolvidos em doenças transmitidas por alimentos. Por comprometerem a qualidade e a segurança microbiológica do leite e de produtos lácteos, constituem-se uma grande preocupação à indústria de laticínios (EHLING-SCHULZ et al., 2004; SIMÕES et al., 2010; KUMARI; SARKAR, 2016).

As bactérias do grupo do *B. cereus* possuem a habilidade de se aderir e formar biofilmes em superfícies sólidas, como o aço inoxidável (SALUSTIANO et al., 2009; KUMARI; SARKAR, 2016). A formação de biofilmes é um processo complexo, constituído por uma série de eventos moleculares e fisiológicos, constituído por vários estágios incluindo a adesão, formação de micro colônias, estruturação tridimensional e maturação (WATNICK, 2000). Na indústria, ocasionalmente podem persistir resíduos de leite nas superfícies de equipamentos em aço inoxidável, constituindo uma película denominada filme condicionante, que tornam estas superfícies mais propícias à adesão bacteriana e consequente formação de biofilmes (MACHADO, 2005).

Relatos da presença de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* em produtos comerciais prontos para consumo são frequentes (VIDAL-MARTINS et al., 2005; REYES, 2007; GRACIAS et al., 2011; BENNETT et al., 2013; REIS et al., 2013; KUMARI; SARKAR, 2014; MONTANHINI et al., 2015; SINGH et al., 2016; VIDAL et al., 2016) e os biofilmes desempenham papel fundamental na persistência destes microrganismos nas linhas de processamento, por se tratar de estruturas estáveis que protegem as bactérias residentes contra a ação de agentes desinfetantes, dificultando seu controle e possibilitando a recontaminação persistente dos produtos (BRANDA et al., 2005; SALUSTIANO et al., 2009; MAJED et al. 2016; KUMARI; SARKAR, 2016). Este efeito protetor à desinfetantes e antimicrobianos é fornecido por uma matriz extracelular, que dificulta seu controle e eliminação (SIMÕES et al., 2006).

O sistema “Clean in place” (CIP) é comumente empregado pelas indústrias para controlar biofilmes em linhas de processamento de leite. Trata-se de um

procedimento de higienização e sanitização padronizado que inclui a limpeza regular das tubulações e equipamentos com soluções ácidas e alcalinas aplicadas a altas temperaturas (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; BREMER et al., 2006). É utilizado fundamentalmente no intuito de garantir a desinfecção de superfícies limpas e a eliminação de resíduos orgânicos pela ação dos desinfetantes em locais de difícil acesso (SHI; ZHU, 2009). No entanto, contaminações e deterioração de produtos ocasionadas por biofilmes ainda são problemas recorrentes (OSTROV et al., 2016).

Houve um aumento significativo do interesse da comunidade científica por pesquisas sobre formação de biofilmes dos microrganismos do grupo do *B. cereus* na última década (MAJED et al., 2016). Poucos estudos, porém, investigam a eficiência dos processos usuais de combate aos biofilmes do grupo do *B. cereus*, principalmente àqueles ligados à superfícies de aço inoxidável. Entretanto, nestes estudos fica evidente a importância de determinar a eficiência das soluções e desinfetantes utilizadas nos procedimentos CIP na remoção das bactérias ligadas à superfícies de aço inoxidável, material amplamente usado em equipamentos da indústria de laticínios (PARKAR et al., 2003; BREMER et al., 2006).

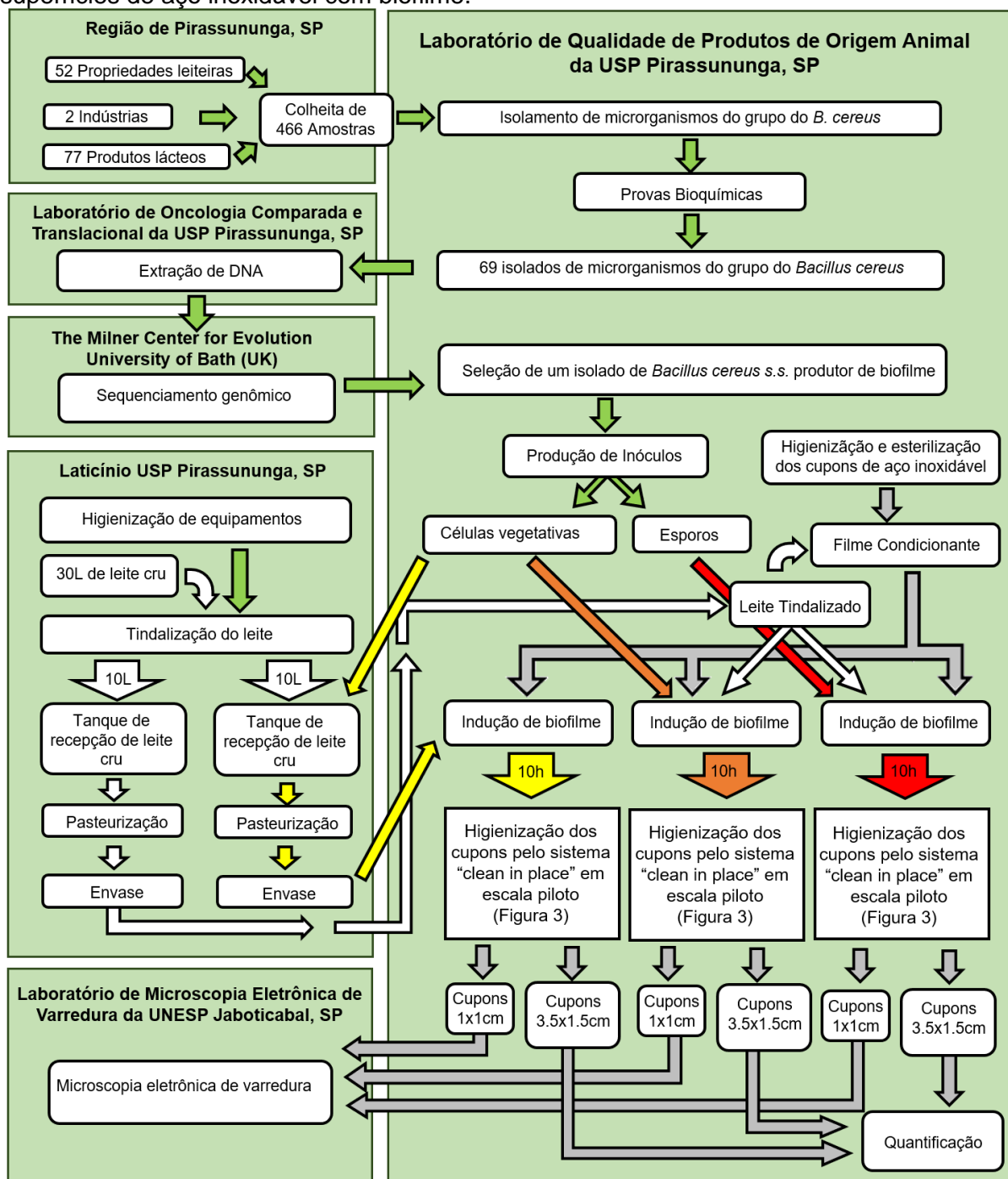
Neste sentido, o presente estudo objetivou avaliar a atuação e eficiência dos desinfetantes de princípios ativos à base de ácido peracético e de compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo junto ao sistema “Clean in place”, em tempo e concentração recomendados pelo fabricante, sobre biofilmes de *Bacillus cereus* s.s. formados em superfícies de aço inoxidável que tiveram contato com o leite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

O Fluxograma esquematizado na Figura 1 ilustra o delineamento experimental deste estudo. Nas sessões seguintes, cada etapa deste ensaio será descrita de forma elucidativa.

Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental para a produção de leite tindalizado, seguida de contaminação experimental, indução de biofilmes, e posterior higienização das superfícies de aço inoxidável com biofilme.



De forma sucinta, foram isolados microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* a partir de amostras colhidas em indústrias, propriedades leiteiras e produtos

lácteos comerciais, na região de Pirassununga, São Paulo, Brasil. Depois de caracterizados, selecionou-se um isolado sabidamente formador de biofilme para a sequência dos ensaios.

Para garantir que a formação de biofilmes fosse restrita à este isolado, foi produzido leite livre de outros microrganismos do grupo do *Bacillus cereus*. Para tal foi utilizada a técnica de tindalização, conforme metodologia adaptada de KIM et al. (2012), e o leite resultante deste processo é denominado a partir daqui como leite tindalizado (LT). Este foi experimentalmente contaminado com o isolado escolhido em três circunstâncias distintas; a primeira pela inoculação de esporos (LTE), a segunda por células vegetativas (LTC), e a terceira também por células vegetativas, entretanto, esta foi seguida de pasteurização (LTP). Com o auxílio de um protótipo experimental de aço inoxidável (Fig. 2), induziu-se a formação de biofilmes a partir das três contaminações.

Posteriormente foi realizado o processo de higienização CIP (Fig. 3) utilizando 2 desinfetantes diferentes, constituindo 2 tratamentos. As superfícies de aço inoxidável foram analisadas quanto a carga microbiana aderida no decorrer do processo de higienização e também visualizadas em microscopia eletrônica ao final do processo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 x 2 (natureza da contaminação x desinfetantes), com três repetições.

2.2 Obtenção e caracterização de isolados

Foram obtidas 466 amostras colhidas da cadeia produtiva de leite e produtos lácteos (331 amostras oriundas de 52 propriedades leiteiras, 58 amostras de indústrias e 77 de produtos lácteos comerciais obtidos no comércio varejista) na região de Pirassununga, São Paulo, Brasil.

No Laboratório de Qualidade de Produtos de Origem Animal (Quali-POA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP) realizou-se inicialmente um pré-enriquecimento em Caldo Tripton de Soja (TSB) (Oxoid, Hampshire, UK) adicionado de Polimixina B (20µg/mL)

(STADHOUDERS, 1992) que foi incubado a 30°C durante 24 horas. Posteriormente, foi transferida uma alçada para placas de Petri contendo Ágar Manitol Gema de Ovo e Polimixina B (MYP) (MOSSEL et al., 1967) pela técnica de esgotamento e incubadas a 30°C por 24 a 48 horas. Entre três e cinco colônias sugestivas eram transferidas para tubos com Ágar Triptona de Soja (TSA) (Oxoid, Hampshire, UK) inclinados e incubadas durante 24 horas a 30°C.

Os isolados foram caracterizados e confirmados fenotípicamente como *Bacillus cereus*, por coloração de Gram e com os seguintes resultados em análises bioquímicas; catalase (+), fermentação anaeróbica da glicose (+), Voges-Proskauer (+), crescimento rizoide (-), hemólise de sangue de carneiro (+), produção de cristais (-), motilidade (+/-) e redução do nitrato a nitrito (+/-) (MACFADIN, 1976; SHARIF; ALAEDDINOGLU, 1988; APHA, 2001). das quais 69 isolados *Bacillus cereus* s.s. oriundos de Todos isolados foram armazenados em caldo infusão cérebro-coração (BHI) com glicerol a -20°C até o momento do uso.

As culturas foram submetidas a extração de DNA utilizando o Kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e posteriormente foram enviadas ao “The Milner Center for Evolution” para a realização de sequenciamento genômico, na “University of Bath” no Reino Unido (UK). Os dados do sequenciamento genômico dos 69 isolados obtidos na cadeia produtiva de leite e produtos lácteos (Documento Suplementar 1) estão depositados no NCBI GenBank e Short Read Archive (SRA) associado ao BioProjeto: PRJNA390851.

Baseado nas análises genômicas, dentre os 69 isolados foi selecionado o isolado ID 644 (Documento Suplementar 1), reconhecidamente produtor de biofilmes e com potencial deteriorante e toxigênico, para a indução de biofilme e realização das análises deste estudo.

2.3 Produção de inóculos

Foram produzidos e padronizados dois tipos de inóculos, constituídos de células vegetativas e de esporos de *Bacillus cereus* s.s.

Para o primeiro tipo, o isolado mantido em estoque foi reativado em caldo infusão cérebro-coração (BHI), transferindo-se 10µL da cultura para 5mL de caldo

BHI e incubado a 30°C por 12h. No momento do uso, uma alíquota de 1mL da cultura era submetida a contagem populacional.

Para o segundo, 10µL da cultura mantida em estoque foram transferidos para tubos com ágar triptona soja (TSA) inclinado e incubados por sete dias a 30°C. Posteriormente, os esporos foram lavados da superfície do ágar com 5mL de água destilada estéril, transferidos assepticamente a um tubo estéril e centrifugado por 20 minutos. Logo após, o sobrenadante foi descartado e ressuspenso em água destilada, ocorrendo em seguida uma nova centrifugação, esse processo se repetiu por 3 vezes.

Na sequência, a suspensão foi submetida a choque térmico a 80°C por um minuto em banho-maria, seguido de resfriamento pelo mesmo período para inativação das células vegetativas (GIFFEL et al., 1997). A suspensão de esporos foi submetida a coloração de Wirtz-Conklin para confirmação da ausência de células vegetativas (BIER, 1975). No momento do uso, uma alíquota de 1mL da suspensão era submetida a contagem populacional.

2.4 Produção de leite tindalizado

Para produção de leite tindalizado foi utilizada uma iogurteira industrial (iogurteira Mec Milk®) com controle de temperatura, pertencente ao laticínio da Prefeitura do Campus USP Fernando Costa em Pirassununga – PUSP-P. Inicialmente esta foi submetida a limpeza mecânica, seguida de higienização com hidróxido de sódio, ácido nítrico e ácido peracético 0,05% a 25°C por 1 hora. Com o auxílio de suabes, era realizada amostragem da superfície interna do equipamento para controlar a eficiência do processo de higienização. O procedimento de higienização era aplicado também à tubulação e ao tanque de recepção de leite cru do equipamento pasteurizador.

A tindalização se deu aquecendo o leite a 80°C por 10 minutos, seguido por resfriamento até 30°C mantendo-o por 30 minutos para induzir a germinação bacteriana, finalizando após um novo aquecimento a 95°C por 20 minutos. O processo de tindalização se completava após 3 repetições de todo o ciclo descrito, conforme KIM et al. (2012) com adaptações.

Foram tindalizados 30L de leite cru que ao final do processo, eram bombeados pela tubulação até o tanque de recepção de leite cru do pasteurizador. Destes, 10L eram pasteurizados e envasados em saquinhos de polietileno com capacidade de 1L. Posteriormente o LT era transportado ao laboratório e mantido em refrigeração até o momento das análises seguintes.

2.5 Contaminação experimental do leite

A contaminação experimental do leite se deu em três circunstâncias distintas; a primeira pela inoculação de esporos ao leite tindalizado (LTE), a segunda por inoculação de células vegetativas ao leite tindalizado (LTC), e na terceira com a contaminação do leite tindalizado com células vegetativas, seguida de pasteurização (LTP).

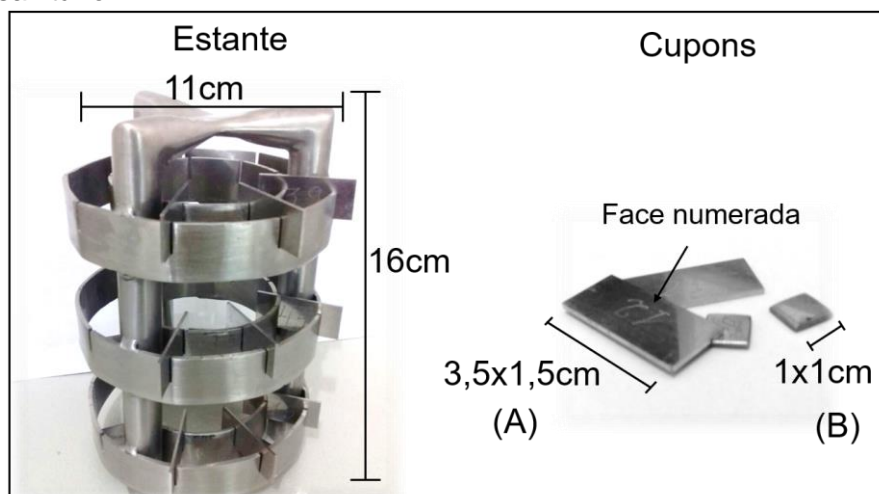
A contaminação do LTP se deu no laticínio da USP. Após a tindalização, 10L de leite eram bombeados ao tanque de recepção de leite cru, onde eram vertidos 15mL de inóculo de células vegetativas de *B. cereus* s.s. ao leite (30°C), que depois de homogeneizado, seguia para pasteurização e envase. O LTP era transportado ao laboratório, onde permanecia em refrigeração até o momento das análises seguintes.

As contaminações de LTC e LTE foram realizadas no momento das análises de indução de biofilmes, sempre em câmara de segurança biológica no Laboratório de Qualidade de Produtos de Origem Animal (Quali-POA), aplicando 2mL dos respectivos inóculos para cada litro de LT,

2.6 Protótipo experimental em aço inoxidável

Foi produzido um protótipo experimental (Figura 2) que consistiu no substrato para a adesão de *B. cereus* s.s. nos ensaios de indução de biofilmes e posterior higienização pelo procedimento CIP.

Figura 2. Protótipo experimental utilizado neste estudo, confeccionado em aço inoxidável do tipo AISI 304 com polimento sanitário.



O protótipo foi produzido em escala piloto, sendo composto por cupons com dimensões de 3,5x1,5cm e 1x1cm (denominados a partir daqui como cupons A e B, respectivamente) e uma estante com capacidade de acomodar 30 cupons, adaptado do modelo utilizado por Oliveira et al. (2010). O protótipo foi confeccionado em aço inoxidável do tipo AISI 304 com polimento sanitário. Os cupons foram numerados em uma das faces, possibilitando padronizar e manter a face amostral no contrafluxo.

A higienização se dava com abrasão mecânica com bucha e detergente neutro, seguida solução de hidróxido de sódio a 1% e imersão em álcool 70%, seguido de esterilização em autoclave, conforme (Ribeiro-Furtini, 2005).

2.7 Condicionamento dos cupons de aço inoxidável

Trata-se da preparação das superfícies para a adesão bacteriana, criando um filme condicionante semelhante ao encontrado nas superfícies de aço inoxidável do ambiente industrial. Para tal, após higienização e esterilização prévia, o protótipo experimental contendo 21 cupons (18 cupons A e 3 cupons B) foi mantido em recipiente estéril do tipo béquer de vidro, onde foi acrescentado um litro de LT.

O protótipo permaneceu no recipiente imerso em leite, mantido sob um agitador magnético por uma hora em agitação¹ a temperatura ambiente. Todo o processo foi realizado em câmara de segurança biológica.

Ao final do processo, 3 cupons A foram submetidos à quantificação bacteriana, por meio da técnica de esfregaço de superfície com suabes, como controle de esterilidade. Posteriormente o restante dos cupons eram ascépticamente transferidos para placas de Petri estéreis forradas com papel de filtro, mantendo a superfície amostral voltada para cima, e secos em estufa a 60°C por 2 horas.

2.8 Indução de biofilmes nas superfícies dos cupons de aço inoxidável

Um total de 18 cupons (15 cupons A e 3 cupons B) com filmes condicionantes foram submetidos ao contato com leite para a indução de biofilmes. Para tanto, foi acrescentado um litro de LT a um recipiente do tipo béquer contendo o protótipo experimental e ocorreu então a contaminação experimental deste leite (LTC e LTE), em temperatura ambiente, permanecendo incubado sob agitação por 10 horas para a indução de biofilme.

A indução de biofilmes em LTP, diferiu-se do procedimento descrito por ser acrescentado 1L do LTP, contaminado antes da pasteurização e envase do leite, ao recipiente contendo o protótipo experimental e não sendo necessária, portanto, a contaminação do leite. Passada a incubação, realizava-se um enxague em água destilada por 1 minuto em temperatura ambiente e na sequência retirava-se a primeira amostragem de cupons com adesão bacteriana (CA) (3 cupons A) para a quantificação populacional. Todas as amostragens seguiam para quantificação da população bacteriana aderida, conforme sessões a seguir.

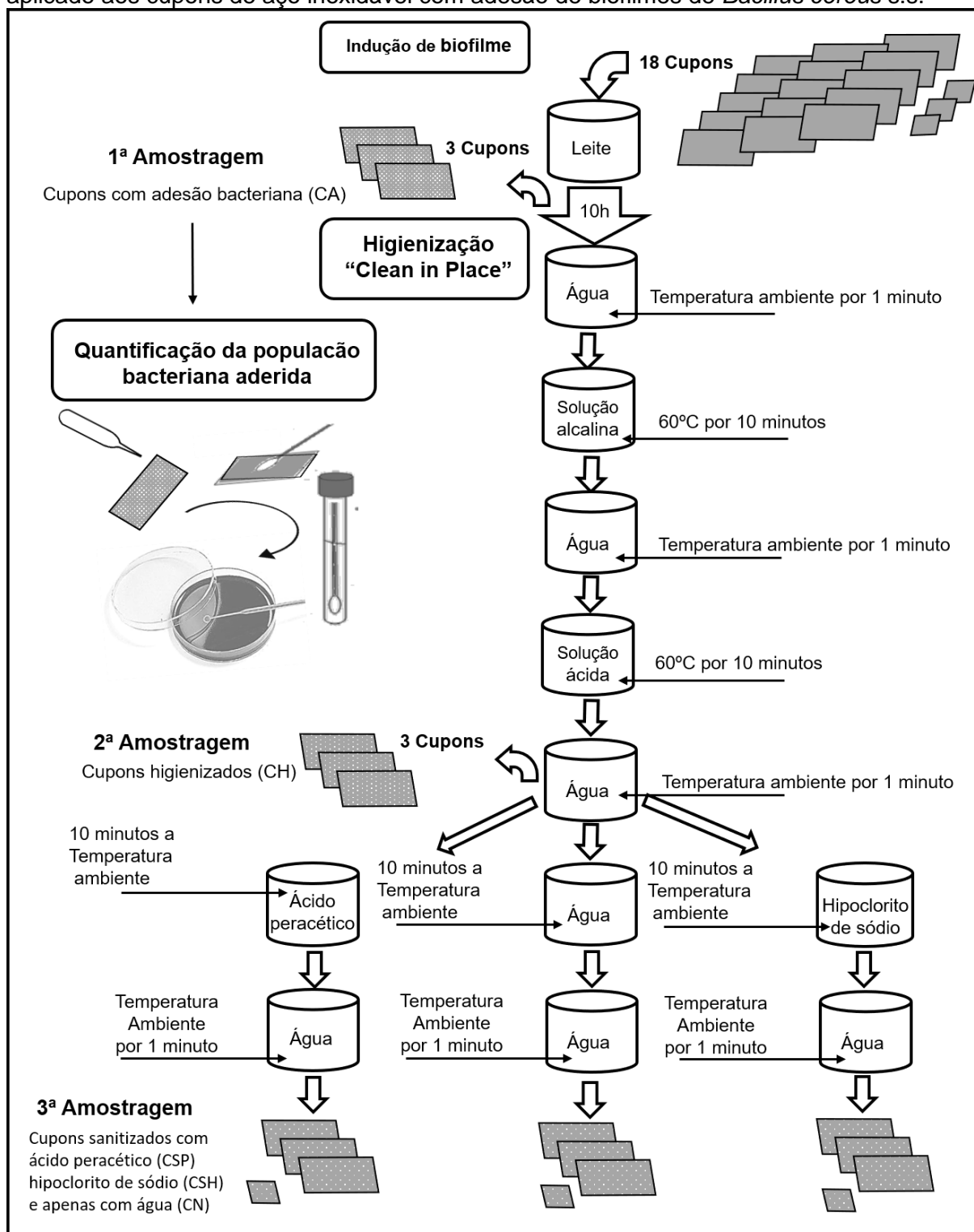
2.9 Higienização dos cupons pelo sistema “clean in place”, simulado em escala piloto

Um total de 15 cupons (12 cupons A e 3 cupons B) com adesão de biofilmes foram submetidos ao procedimento de higienização, que se deu em sete etapas

¹ Segundo nível do marcador de agitação do equipamento: Agitador Magnético com Aquecimento BT 41/AL (Rotação: 50 a 2600 RPM)

diferentes, cada uma com uma das soluções usualmente utilizadas nos procedimentos de higienização CIP adotados em laticínios, conforme esquematizado na Figura 3.

Figura 3. Fluxograma representativo do procedimento de higienização “clean in place” aplicado aos cupons de aço inoxidável com adesão de biofilmes de *Bacillus cereus* s.s.



Foram utilizados béqueres de vidro onde o protótipo experimental era mantido submerso e em agitação sob um agitador magnético dotado de aquecimento. Todo o processo foi realizado em câmara de segurança biológica.

A higienização se iniciou com água a temperatura ambiente por um minuto, seguida de solução alcalina (hidróxido de sódio a 2%) a 60°C por 10 minutos, água destilada a temperatura ambiente por um minuto, solução ácida (ácido nítrico a 2%) a 60°C por 10 minutos e novo enxague em água destilada a temperatura ambiente. Nesta etapa era colhida a segunda amostragem de cupons A higienizados (CH).

O processo CIP foi concluído após a sanitização com solução de ácido peracético a concentração de 0,1% e hipoclorito de sódio 0,02%, ambos em temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de enxague com água destilada a temperatura ambiente por um minuto. Para controle negativo, foi realizado o mesmo procedimento de sanitização, porém apenas com água.

Ao final desta etapa realizava-se a terceira e última amostragem retirando-se cupons A, sempre em triplicatas, e o cupon B que era reservado individualmente em placa de Petri estéreis com papel filtro, onde permanecia a 30°C por 24 horas em estufa.

Todo processo de higienização foi exatamente o mesmo para os três tipos de biofilmes, induzidos a partir das três contaminações diferentes, LTC e LTE e LTP.

2.10 Quantificação da população bacteriana aderida às superfícies dos cupons

Para quantificar a carga microbiana dos inóculos e também de leites, retiravam-se uma alíquota de 1mL no momento do uso. Preparava-se diluições seriadas em água peptonada (H₂O_p) e na sequência, 0,1 mL eram transferidos para placas de ágar TSA e ágar MYP, pela técnica de plaqueamento em superfície. As placas eram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas.

Para quantificar a população bacteriana aderida às superfícies de aço inoxidável, os cupons eram enxaguados com o auxílio de pipetas Pasteur e em seguida, por meio de esfregaço, realizava-se a coleta de amostra da superfície dos cupons com suabes estéreis.

O enxague da primeira amostragem se deu com tampão fosfato, para a remoção de resíduos de leite, seguido de enxagues adicionais com água destilada, solução salina peptonada com *tween* 80 (H₂Osp-*Tween*) e novamente água destilada. A partir da segunda amostragem os cupons foram enxaguados com água destilada, H₂Osp-*Tween* e novamente em água destilada.

A amostragem da superfície dos cupons se dava em três deles, utilizando um suabe estéril para cada cupom, e estes eram mergulhados e agitados em um único tubo contendo 9mL água peptonada tamponada 0,1% (H₂Op), realizava-se as diluições seriadas e na sequencia plaqueamento em ágar TSA e ágar MYP a 30°C por 24 a 48 horas.

2.11 Análise da topografia da superfície dos cupons de aço inoxidável

Após 24h de incubação os cupons B eram levados ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP, Jaboticabal, submetidos a solução fixadora (Karnovsky modificado: 2,5% glutaraldeído, 2,5% formaldeído, em 0,05 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 e 0,001M CaCl₂) por pelo menos 72 horas.

Em seguida, lavados em tampão fosfato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% *overnight*. Após lavagem, eram desidratados em gradiente crescente de etanol (25%, 50%, 70% e 90% e 100%), seco em ponto crítico e metalizados com ouro (BOSSOLA; RUSSEL, 1998). Posteriormente foram obtidas imagens topográficas da superfície dos cupons em microscópio eletrônico Zeiss EVO MA-10.

2.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos em contagem populacional foram analisados por meio de ANOVA e Teste t a 5% de significancia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 69 isolados oriundos de 466 amostras colhidas na cadeia produtiva de leite e produtos lácteos. Dos 69 isolados, um conjunto de 38 destes foi obtido de 26 propriedades leiteiras, nove (9) isolados foram obtidos em dois laticínios distintos, e outros 22 isolados foram obtidos de produtos lácteos comerciais disponíveis em varejo, sendo um (1) de queijo Minas frescal, um (1) de bebida láctea UAT, um (1) de creme preparado com queijo, um (1) de cappuccino instantâneo e por fim, 18 obtidos de queijos fundidos tipo requeijão.

Diversos trabalhos relatam a presença do *Bacillus cereus* em produtos comerciais tratados termicamente na indústria, como o leite pasteurizado e leite UAT (VIDAL-MARTINS et al., 2005; REYES, 2007; BENNETT et al., 2013; REIS et al., 2013; KUMARI; SARKAR, 2014; MONTANHINI et al., 2015; VIDAL et al., 2016), leite em pó (REYES, 2007) e leite fermentado (WONG et al., 1988).

Dentre os fatores associados a contaminação de produtos lácteos pelo grupo do *B. cereus*, sua capacidade em se aderir e formar biofilmes em superfícies sólidas (KUMARI; SARKAR, 2014; MARCHAND et al., 2012) aliada a capacidade de sobreviver aos processos de pasteurização (EVELYN et al., 2015), são preponderantes neste aspecto, acarretando problemas e consequências consideráveis à indústria (SALUSTIANO et al., 2009; KUMARI; SARKAR, 2016; RIBEIRO et al., 2017).

Frequentemente são observados atributos que contribuem para a contaminação do leite com esporos de *B. cereus* s.s. em propriedades leiteiras brasileiras, como a presença de fezes no ambiente de ordenha, e a utilização inadequada de camas e de silagem (VISSERS et al., 2007; MAGNUSSON et al., 2007). A carga microbiana do leite cru pode prejudicar as indústrias por permitir a entrada e disseminação destes microrganismos nas linhas de processamento por meio dos biofilmes (SIMÕES et al., 2010; KUMRI; SARKAR, 2014).

Neste sentido, controlar a carga microbiana oriunda da matéria prima é fundamental para controlar também os biofilmes na indústria, reforçando a necessidade de intensificar as melhorias nos procedimentos de obtenção de leite cru das propriedades da região em estudo.

Após a realização da tindalização, neste estudo adaptada de KIM et al. (2012), as análises de quantificação de microrganismos demonstraram que o processo foi capaz de reduzir a população de *Bacillus cereus* a níveis indetectáveis, mesmos sendo capazes de resistir aos processos térmicos. Os resultados foram satisfatórios, fato digno de nota, tendo visto que na última década diversas pesquisas têm surgido com o objetivo de reduzir ou eliminar esporos de *Bacillus cereus* do leite (EVELYN et al., 2015; ESPEJO et al, 2014; LØVDAL et al., 2011).

Foram inoculados entre $2,4 \times 10^9$ e $7,2 \times 10^{10}$ UFC/L microrganismos ao leite durante a contaminação experimental, resultando ao final de 10 horas de incubação, em populações entre $1,1 \times 10^8$ e $7,6 \times 10^9$ UFC/mL de leite.

Após a indução de biofilmes, por 10 horas de incubação em leite, os cupons com adesão bacteriana apresentaram entre $6,3 \times 10^5$ e $3,1 \times 10^7$ UFC/cm² nas três contaminações diferentes. Wirtanen et al. (1996) denominam como biofilmes apenas as adesões que superem 10^5 UFC/cm², enquanto Andrade; Bridgeman e Zottola (1998) os caracterizam em mais de 10^7 UFC/cm². Estudos descrevem que o desenvolvimento de biofilmes em equipamentos de laticínios pode ocorrer entre 8 e 12 horas (SCOTT et al., 2007; BREMER et al., 2009), com populações de até 10^6 UFC/cm² em pasteurizadores (BREMER et al., 2009).

Neste sentido os resultados demonstram que, nas condições de estudo, 10 horas são suficientes para ocorrer a formação de biofilmes por esporos e células vegetativas de *B. cereus* s.s. em superfícies de aço inoxidável apresentando, portanto, adesão proporcional nas três condições de contaminação ($p > 0,05$) quando submetidos à ANOVA a 5% de significância, representados na Tabela 1.

Tabela 1. População média de *Bacillus cereus* s.s. em biofilmes aderidos a superfície de aço inoxidável do tipo AISI 304, em contato com leite tindalizado experimentalmente contaminado, e submetidas a sanitização.

	Quantidade de <i>Bacillus cereus</i> (Log ₁₀) UFC/cm ²				
	CA	CH	CN	CSP	CSH
LTP	$3,4 \times 10^7$ (7,5)	$1,1 \times 10^7$ (7,0)	$8,1 \times 10^6$ (6,9)	$5,8 \times 10^6$ (6,8)	$4,6 \times 10^6$ (6,7)
LTE	$6,3 \times 10^5$ (5,8)	$3,6 \times 10^5$ (5,6)	$1,5 \times 10^5$ (5,2)	$2,5 \times 10^5$ (5,4)	$3,0 \times 10^4$ (4,5)
LTC	$3,1 \times 10^7$ (7,5)	$8,1 \times 10^6$ (6,9)	$8,7 \times 10^6$ (6,9)	$8,5 \times 10^5$ (5,9)	$5,5 \times 10^4$ (4,7)

LTP: Leite tindalizado contaminado e pasteurizado; LTE: Leite tindalizado contaminado com esporos; LTC: Leite tindalizado contaminado com células vegetativas; CA: Cupom com adesão; CH: Cupom higienizado; CN: Controle negativo; CSP: Tratamento com ácido peracético; CSH: Tratamento com hipoclorito de sódio.

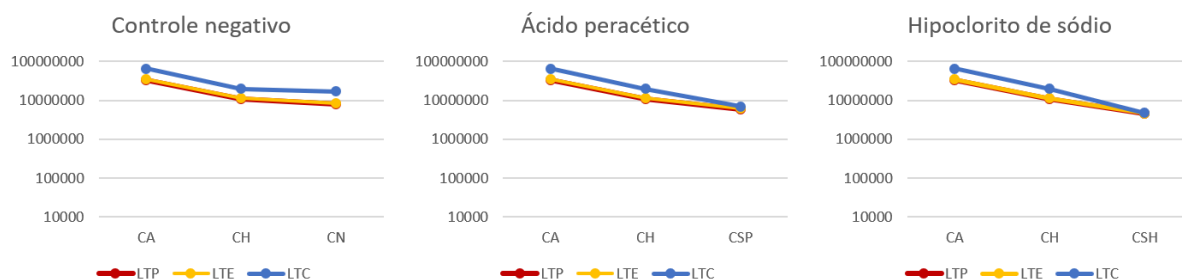
Os resultados indicam que nas condições do estudo, a pasteurização não influenciou o processo de adesão.

Sabe-se que estes microrganismos podem sobreviver à pasteurização industrial do leite cru e que posteriormente, os esporos se aderem às superfícies e germinam formando biofilmes (ENEROTH et al., 2001; SCOTT et al., 2007; GARNY et al., 2008; FAILLE et al., 2014; GOPAL et al., 2015). Os resultados convergem neste sentido, no entanto, outros estudos têm demonstrado que a pasteurização pode induzir lesões bacterianas subletais, ocasionadas por danos ao DNA, por consequência do estresse térmico (WESCHE et al., 2009; SILVA et al., 2013; DEVATKAL et al., 2015). Apesar disso não foi observada diferença na formação de biofilmes pelo *B. cereus* s.s. quando esta se deu após o processo de pasteurização ($p > 0,05$). Aparentemente este tipo de dano não altera a capacidade ou mecanismos necessários para a formação de biofilmes.

Porém, pode ser que isso seja resultante da capacidade de recuperação deste tipo de microrganismo, proporcionado por mecanismos de reparação de danos celulares e moleculares, já descritos em outros estudos (SETLOW, 2007; WARDA et al., 2015), e fatores importantes como tempo e temperatura de incubação, as condições e composição do meio, que são descritos como determinantes na formação do biofilme de *B. cereus* (WIJMAN et al., 2008). Neste sentido as condições podem ter sido favoráveis à recuperação dos danos e consequentemente não influenciaram nos resultados.

Não houve diferença significativa na redução da carga microbiana aderida aos cupons de aço inoxidável ao final do processo de higienização, apresentando eficácia semelhante entre os desinfetantes utilizados neste estudo, contra biofilmes de *B. cereus* s.s., representada na Figura 2.

Figura 2. Gráficos representando a redução logarítmica da carga microbiana aderida às superfícies de aço inoxidável, nos três tipos de contaminação, após a aplicação do processo “clean in place”.



LTP: Leite tindalizado contaminado e pasteurizado; LTE: Leite tindalizado contaminado com esporos; LTC: Leite tindalizado contaminado com células vegetativas; CA: Cupom com adesão; CH: Cupom higienizado; CN: Controle negativo; CSP: Tratamento com ácido peracético; CSH: Tratamento com hipoclorito de sódio.

Sabe-se que as bactérias podem sobreviver e produzir biofilmes no interior dos tubos, mesmo após um procedimento CIP aplicado adequadamente (SHI; ZHU, 2009). Entretanto, Wirtanen et al., (2002) destaca que os processos de limpeza e desinfecção de superfícies podem ser considerados eficientes quando promovam uma redução da população entre 1-3 log, que não foi alcançada neste estudo. Neste sentido, o ácido peracético e o hipoclorito de sódio não se mostraram eficientes para contra biofilmes de *B. cereus* s.s. nas condições deste estudo.

Estes resultados estão em conformidade com os estudos que afirmam não haver esterilidade de equipamentos, mesmo após a sanitização padrão usada para produtos lácteos (KUKHTYN et al., 2017).

Foram registradas micrografias eletrônicas de adesão do *B. cereus* s.s. à superfície de aço inoxidável, e a produção de matriz extracelular, Figura 3A e B, respectivamente, oriundos de leite contaminado com células vegetativas, obtidos por microscopia eletrônica de varredura.

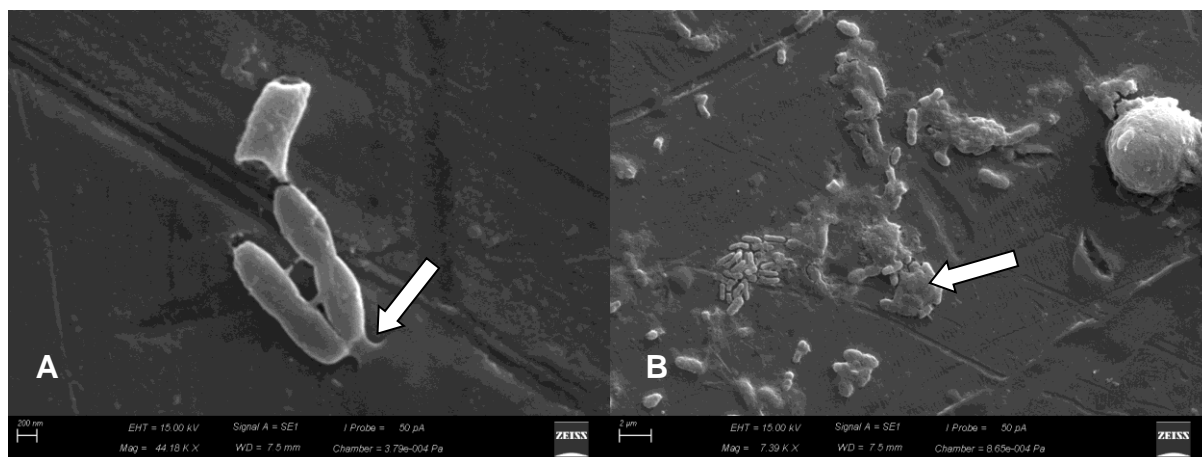


Figura 3. (A)* Adesão e (B)** formação de matriz extracelular de *Bacillus cereus* s.s. em superfície de aço inoxidável do tipo AISI 304, obtidos de leite contaminado com células vegetativas. *Imagem ampliada 44.180 vezes. **Imagem ampliada 7.390 vezes.

Estudos indicam maior adesão dos esporos comparados às células vegetativas (PARKAR et al., 2001; FAILLE et al., 2001; BRANDA et al., 2004; SZABÓ et al., 2017), no entanto isso não foi observado nos resultados deste estudo, onde não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre adesão nas três categorias estudadas.

Essa divergência pode estar relacionada ao fato destes biofilmes terem sido induzidos em ambiente totalmente restrito aos esporos de *B. cereus* s.s.

As interações multiespécies apresentam muitos benefícios entre cepas ou espécies, que incluem co-agregação de grupos bacterianos concomitantemente (RICKARD et al., 2003), conjugação (GHIGO, 2001) e a proteção de uma ou várias espécies da erradicação quando o biofilme é exposto a compostos antimicrobianos (COWAN et al., 2000; LERICHE; BRIANDET; CARPENTIER, 2003). Essa proteção pode ser derivada de uma variedade de fatores, incluindo a complementação enzimática (SHU et al., 2003) e a distribuição espacial organizada das células no biofilme (COWAN et al., 2000; LERICHE; BRIANDET; CARPENTIER, 2003). Estes e outros mecanismos produzem efeitos sinérgicos que resultam em biofilmes cooperativos até mesmo entre estirpes que não conseguiriam formar biofilmes sozinhos (BURMØLLE et al., 2006).

Embora os biofilmes formados por mais de uma espécie de bactérias apresentem maiores vantagens metabólicas em ambientes naturais, biofilmes formados por apenas uma espécie de bactéria tendem a colonizar mais eficazmente

os substratos e superfícies de equipamentos em indústrias de laticínios (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003).

Foi possível observar a evolução de biofilmes em estágios mais estruturados (Figura 4A e B). De acordo com Mittelman (1998), a evolução de biofilmes maduros pode levar várias semanas, mas pode ocorrer em horas dependendo do sistema em desenvolvimento.

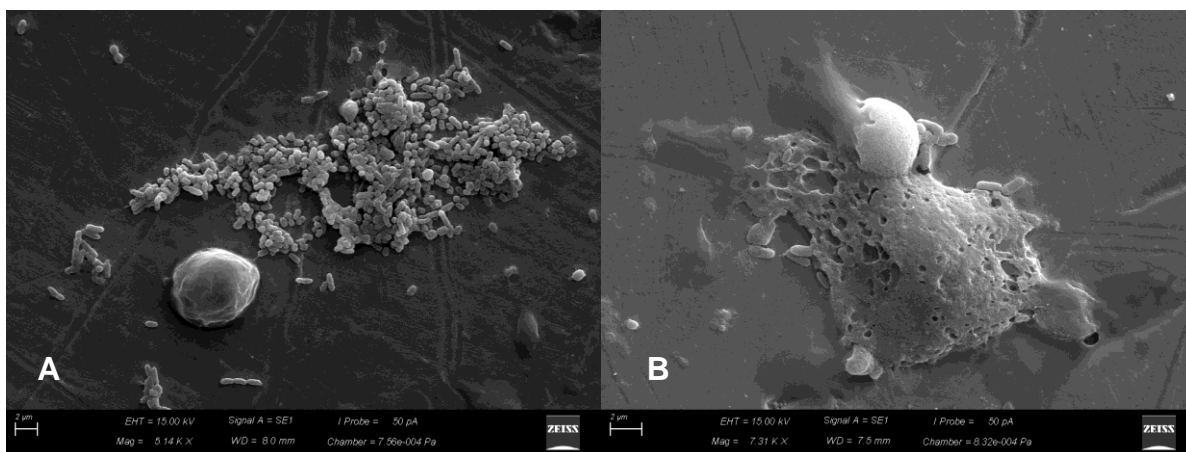


Figura 4. (A)* Biofilme em processo de proliferação celular e estruturação tridimensional e (B)** biofilme já estruturado com canais de transporte de nutrientes e O₂, formados por *Bacillus cereus* s.s. em superfície de aço inoxidável do tipo AISI 304, obtidos de leite contaminado com células vegetativas. * Imagem ampliada 5.140 vezes. ** Imagem ampliada 7.310 vezes.

Apesar de não diferir, a formação de biofilmes por esporos é mais preocupante por conta de sua resistência à agentes químicos e aos tratamentos térmicos. Os esporos são resistentes à desinfecção e outros métodos de inativação em relação às células vegetativas (YOUNG; SETLOW, 2003).

O ácido peracético é considerado eficaz no combate à esporos (MOHAN et al., 2012; BUHR et al., 2013; WEHMEYER et al., 2015). Entretanto, no presente estudo não houve diferença na remoção destes.

Estudos têm demonstrado que apesar da resistência dos esporos, o ácido peracético pode inativá-los, provavelmente alterando as camadas externas dos esporos, mais precisamente a membrana interna, de modo que quando germinem, ocorra rompimento da membrana (SETLOW et al., 2007; BUHR et al. 2013; PARK et al., 2014; LEGGETT et al., 2015). No entanto, o mecanismo de inativação de esporos por ácido peracético não é conhecido com exatidão.

É possível que concentrações mais elevadas de ácido peracético sejam mais eficazes contra esporos, porém, usar grandes concentrações de desinfetantes em ambientes industriais ainda é um desafio, pois pode favorecer o processo de corrosão (SZABÓ et al., 2017). Outra alternativa que podem favorecer o aumento da eficiência do ácido peracético é combina-lo com componentes gasosos, como o monóxido de carbono (WHITE et al., 2006).

Como se sabe, o processo de higienização é dividido em limpeza e sanitização, sendo que o primeiro remove resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, e o segundo reduz a carga microbiana (WIRTANEN et al., 2002; VLKOVÁ et al., 2008). Estudos atrelam a maior eficiência dos desinfetantes à ausência de materiais orgânicos como gorduras, açúcares e proteínas (WIRTANEN, 2004), demonstrando que além dos desinfetantes, os detergentes ácido e alcalino também desempenham papel importante no controle destes microrganismos por atuarem como limitantes de filmes condicionantes.

Em indústrias de processamento lácteos a adesão bacteriana e consequente formação de biofilmes é mais propícia quando há filmes condicionantes, ocasionados principalmente por leite residual, que possibilita o acúmulo de compostos orgânicos e inorgânicos do leite (MACHADO, 2005; RIBEIRO et al., 2017). Mesmo após o processo CIP foram observados resíduos de componentes do leite neste estudo (Figura 5A e B).

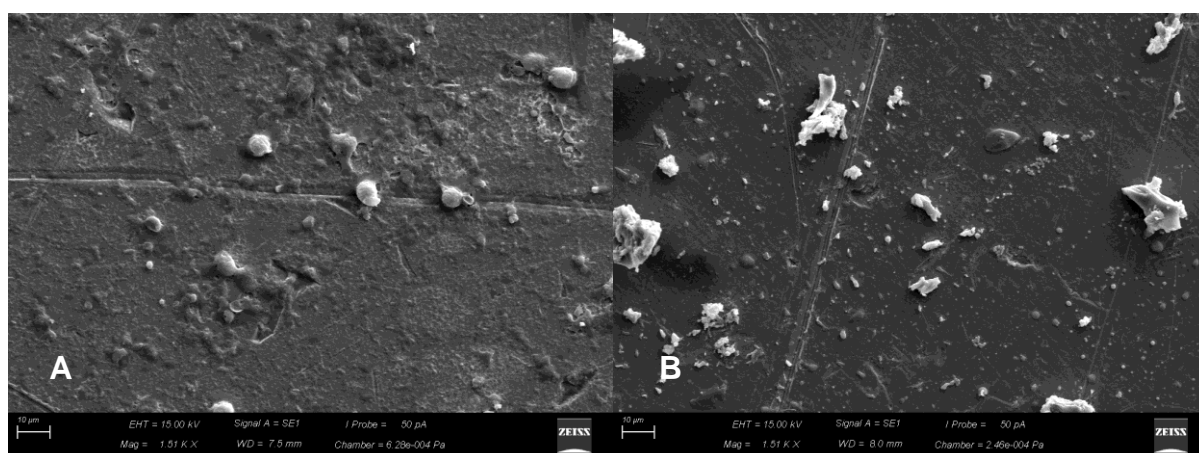


Figura 5. (A* e B**) Resíduos de componentes orgânicos e inorgânicos do leite em superfície de aço inoxidável do tipo AISI 304, obtidos de leite tinalizado. *Imagem ampliada 1.510 vezes. ** Imagem ampliada 1.510 vezes.

A ação dos agentes de limpeza na remoção de resíduos de leite das superfícies antes da sanitização é fundamental para o controle microbiológico (SALUSTIANO et al., 2010). *Bacillus cereus* parecem necessitar de certos componentes do leite antes da adesão (Shaheen et al., 2010).

Assim, para se evitar e combater a contaminação de equipamentos por biofilmes, especialmente com as tendências de uso e aprimoramento de equipamentos e plantas industriais cada vez mais complexos e automatizados, é importante que sejam adotados e exigidos parâmetros microbiológicos cada vez mais rigorosos (PASVOLSKY et al., 2014).

As soluções ácidas são muito importantes no controle de resíduos minerais e na prevenção de depósitos destes compostos em superfícies de equipamentos, que podem resultar em processos de corrosão e consequentes pontos que possibilitem formar biofilmes (PENG; TSAI; CHOU, 2002).

A membrana dos esporos também os confere resistência ao hipoclorito (SABLI et al., 1996). Em contrapartida, os esporos tratados com hipoclorito têm dificuldades em germinar, apesar de que aqueles que resistem aos tratamentos com hipoclorito não apresentam danos visíveis ao DNA (YOUNG; SETLOW, 2003). Possivelmente tanto os receptores de nutrientes, como o de enzimas líticas do córtex celular dos esporos, são gravemente danificados pelo tratamento com hipoclorito. Os autores acreditam que o hipoclorito prejudica as membranas destes microrganismos pela oxidação de ácidos graxos ou pela oxidação de proteínas de membrana, podendo inclusive ocorrer ambos (YOUNG; SETLOW, 2003).

Apesar dos resultados não demonstrarem evidências de diferenciação da redução da carga microbiana aderida, provavelmente este fato pode tender a uma maior eficácia do hipoclorito frente ao ácido peracético. Entretanto, é preciso uma avaliação mais minuciosa acerca disso. Neste sentido, entender os danos celulares ocasionados por estes desinfetantes pode ser uma contribuição importantes ao controle destes microrganismos altamente resistentes à fatores físicos e químicos.

A variabilidade da eficácia na eliminação de bactérias planctônicas ou biofilmes aderentes à superfícies é uma característica evidente das operações do sistema CIP em alguns estudos (WIJMAN et al., 2008; FAILLE et al., 2001; MARCHAND et al., 2012). Isso se deve a uma gama de fatores que podem

influenciar a eficácia do CIP, incluindo a natureza, tempo e composição do biofilme; composição e concentração do agente de limpeza; tempo e temperatura do agente de limpeza; turbilhonamento da solução de limpeza entre outros. Por conta disso, o regime CIP ideal pode variar entre as indústrias de processamento e também em pontos específicos ao longo do tempo dentro de uma determinada planta (MARCHAND et al., 2012).

4. CONCLUSÃO

A ação do ácido peracético e do hipoclorito de sódio demonstraram desempenhos semelhantes, mas não foram suficientemente eficazes nas condições do presente estudo, quando usados no sistema “Clean in place” para a remoção de *B. cereus* s.s. aderidos a superfícies de aço inoxidável do tipo AISI 304 submersas em leite.

5. AGRADECIMENTOS

O autor agradece a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (Processo 2015/20874-0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de doutorado (Processo 2014/166512-1).

6. REFERÊNCIAS

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods.4.ed. Washington: American. **Public Health Association**, 2001.

BENNETT, Sarah D.; WALSH, Kelly A.; GOULD, L. Hannah. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 3, p. 425-433, 2013.

BIER, O. Bacteriologia e imunologia: em suas aplicações à medicina e a higiene. 16.ed. **São Paulo: Melhoramentos**, 1975. p. 842-843.

BRANDA, S.S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends microbiology**, v.13, p.20-26, 2005.

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. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, n.3, p.254-262, 2006.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2 ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.

BUHR, T. L.; WELLS, C. M.; YOUNG, A. A.; MINTER, Z. A.; JOHNSON, C. A.; PAYNE, A. N.; MCPHERSON, D. C. Decontamination of materials contaminated with *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis* AI Hakam spores using PES-Solid, a solid source of peracetic acid. **Journal of applied microbiology**, v.115, n.2, p. 398-408, 2013.

BURMOLLE, M.; WEBB, J.S.; RAO, D.; HANSEN, L.H.; SORENSEN, S.J.; KJELLEBERG, S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilm. **Applied and environmental microbiology**, v.72, n. 6, p. 3916–23, 2006.

COWAN, S. E.; GILBERT, E.; LIEPMANN, D.; KEASLING, J. D. Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n.10, p. 4481-4485, 2000.

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

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

EVELYN, E.; SILVA, FILIPA V.M. Thermosonication versus thermal processing of skim milk and beef slurry: modeling the inactivation kinetics of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores. **Food Research International**, v. 67, p. 67-74, 2015.

GARNY, K.; HORN, H.; NEU, T. R. Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 31, n. 6, p. 619-629, 2008.

GHIGO, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. **Nature**, v. 412, p. 442-445, 2001.

GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; LONGVELD, L. P. M.; ROMBOUTS, F. M. The role of heat exchangers in the contamination of milk with *Bacillus cereus* in dairy processing plants. **International Journal of Dairy Technology**, v.50, n2, p.43-47, 1997.

GOPAL, N.; HILL, C., ROSS, P. R.; BERESFORD, T. P.; FENELON, M. A.; COTTER, P. D. The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

HOLAH, J. T. Industrial monitoring: hygiene in food processing. In **Biofilms—Science and Technology**, Springer, p. 645-659, 1992.

KIM, H.; KIM, H.; BANG, J.; KIM, Y.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Reduction of *Bacillus cereus* spores in sikhye, a traditional Korean rice beverage, by modified tyndallization process with and without carbon dioxide injection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, p.218-223,2012.

KLEMM, P.; HANCOCK, V.; SCHEMBRI, M.A.; Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology Reports**, 2010.

KUKHTYN, M.; BERHILEVYCH, O.; KRAVCHENIUK, K.; SHYNKARUK, O.; HORYUK, Y. Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. 2017.

LEGGETT, M. J.; SCHWARZ, J. S.; BURKE, P. A.; MCDONNELL, G.; DENYER, S. P.; MAILLARD, J. Y. Resistance to and killing by the sporicidal microbicide peracetic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.70, v.3, 773-779, 2014.

LERICHE, V.; BRIANDET, R.; CARPENTIER, B. Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. **Environmental Microbiology**, v. 5, n.1, p. 64-71, 2003.

MACHADO, S. M. O. Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactant cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis. **Dissertação (Mestrado Engenharia Biológica)** - Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Minho. 2005.

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

MONTANHINI, M. T. M.; NETO, R. MONTANHINI; BERSOT, L. S. Enterotoxigenic potential of *Bacillus cereus* strains isolated from dairy products at different incubation temperatures. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, 2015.

MOHAN A.; DUNN J.; HUNT M.C.; SIZER, C.E.; Inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores using surface-active peracids and characterization of formed free radicals using electron spin resonance spectroscopy. **Journal of Food Science**;v, 74, p. M411–M4117, 2012.

MORGENROTH, E. Detachment: an often-overlooked phenomenon in biofilm research and modeling. **Biofilms in wastewater treatment**, p. 246-290, 2003.

OH, M. H.; HAM, J.S.; COX, J. M. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Food Microbiology**, n.152, p.1-8, 2012.

OSTROV, I., HAREL, A., BERNSTEIN, S., STEINBERG, D., & SHEMESH, M. Development of a method to determine the effectiveness of cleaning agents in removal of biofilm derived spores in milking system. **Frontiers in microbiology**, 7. 2016.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M., ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of Cymbopogon sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v.21, n.4, p.549-553, 2010.

PASVOLSKY, R.; ZAKIN, V.; OSTROVA, I.; SHEMESH, M. Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. **International Journal Food Microbiology**, v.181, p.19-27, 2014.

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International journal of food microbiology*, v. 77, n. 1, p. 11-18. 2002.

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

RICKARD, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDER, P. E.; HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in microbiology**, v.11, n.2, 94-100, 2003.

ROSSI, A. C. R. **Estudo de biofilms e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto quaternário de amônio utilizado na indústria de laticínios.** 2008. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SABLI, M.Z.H., SETLOW, P.; WAITES, W.M. (1996) The effect of hypochlorite on spores of *Bacillus subtilis* without small acid soluble proteins. **Letters in Applied Microbiology**, 22, 405–407.

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

SAUER, K.; RICKARD, A. H.; DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe**, Washington, v. 2, n. 7, p. 347-353, 2007.

SCOTT, S. A.; BROOKS, J. D.; RAKONJAC, J.; WALKER, K. M.; FLINT, S. H. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. **International journal of dairy technology**, v. 60, n. 2, p. 109-117, 2007.

SETLOW, B.; KORZA, G.; BLATT, K. M.; FEY, J. P.; SETLOW, P. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation by and resistance to supercritical CO₂ plus peracetic acid. **Journal of applied microbiology**, v.120, n.1, 57-69, 2016.

SETLOW P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **Journal of Applied Microbiology**, 101:514–25. 2006.

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

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends Food Science Technology**, n. 20, pp. 407-413, 2009.

SHU, M.; BROWNGARDT, C. M.; CHEN, Y. Y. M.; BURNE, R. A. Role of urease enzymes in stability of a 10-species oral biofilm consortium cultivated in a constant-depth film fermenter. **Infection and immunity**, v. 71, n. 12, p. 7188-7192, 2003.

SZABO, J. G.; MEINERS, G.; HECKMAN, L.; RICE, E. W.; HALL, J. Decontamination of *Bacillus* spores adhered to iron and cement-mortar drinking water infrastructure in a model system using disinfectants. **Journal of environmental management**, 187, 1-7, 2017.

VIDAL-MARTINS, A. A., ROSSI JR., O. D., REZENDE-LAGO, N. C. Mesophilic heterotrophic microorganisms and spore forming bacteria from *Bacillus cereus* group in ultra-high temperature milk. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

VIDAL, A. M. C.; ROSSI JR., O. D.; ABREU, I. L.; BÜRQUER, K. P.; CARDOSO, M. V.; GONÇALVES, A. C. S.; ROSSI, G. A. M.; D'ABREU, L. F. Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 286-292, 2016.

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

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? **Food Thecnology**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 107-114, 1994.

YOUNG, S. B.; SETLOW, P. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 54-67, 2003.

WATNICK, P.; KOLTER, R.; Biofilm city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 2675–2679, 2000.

WESCHE, A. M.; GURTLER, J. B.; MARKS, B. P.; RYSER, E. T. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 1121-1138, 2009.

WIRTANEN G. Hygiene control in Nordic dairies, **ESPOO:VTT Publication**. v. 545. p 147–62, 2004.

WIRTANEN, G.; SALO, S. Disinfection in food processing—efficacy testing of disinfectants. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 2, n. 2, 293-306. 2003.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.7, p.727-733, July 1996.

YOUNG, S. B.; SETLOW, P. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 54-67, 2003.

DOCUMENTO SUPLEMENTAR 1

N	ID	Cepa	Cód. NCBI	Detalhes	N	ID	Cód. NCBI	Cepa	Detalhes
1	637	Gabriel_01	Em registro	Teteira	36	677	Em registro	Gabriel_54	Utensílio - fazenda de leite
2	638	Gabriel_02	Em registro	Tubulação de ordenha - fazenda	37	678	Em registro	Gabriel_55	Teteira
3	640	Gabriel_07	Em registro	Tubulação de ordenha - fazenda	38	679	Em registro	Gabriel_56	Teteira
4	641	Gabriel_08	Em registro	Tubulação de ordenha - fazenda	39	680	Em registro	Gabriel_57	Utensílio - fazenda de leite
5	642	Gabriel_09	Em registro	Tubulação de ordenha - fazenda	40	681	Em registro	Gabriel_58	Tanque de refrigeração
6	643	Gabriel_10	Em registro	Tubulação - laticínio	41	682	Em registro	Gabriel_59	Teteira
7	644	Gabriel_11	Em registro	Equipamentos - laticínio	42	683	Em registro	Gabriel_60	Latão de leite - fazenda
8	645	Gabriel_12	Em registro	Equipamentos - laticínio	43	684	Em registro	Gabriel_61	Utensílio - caminhão transp.
9	646	Gabriel_13	Em registro	Caminhão transportador	44	685	Em registro	Gabriel_62	Leite cru
10	647	Gabriel_15	Em registro	Caminhão transportador	45	686	Em registro	Gabriel_63	Tanque de refrigeração
11	649	Gabriel_17	Em registro	Queijo Minas	46	687	Em registro	Gabriel_64	Tanque de refrigeração
12	650	Gabriel_18	Em registro	Bebida láctea UAT	47	688	Em registro	Gabriel_65	Utensílio - fazenda de leite
13	652	Gabriel_23	Em registro	Utensílios - laticínios	48	689	Em registro	Gabriel_66	Leite cru
14	653	Gabriel_24	Em registro	Utensílios - laticínios	49	690	Em registro	Gabriel_67	Utensílio - fazenda de leite
15	655	Gabriel_27	Em registro	Utensílio - fazenda de leite	50	691	Em registro	Gabriel_68	Utensílio - fazenda de leite
16	656	Gabriel_28	Em registro	Creme preparado com queijo	51	692	Em registro	Gabriel_69	Leite cru
17	658	Gabriel_30	Em registro	Cappuccino	52	693	Em registro	Gabriel_71	Leite cru
18	659	Gabriel_31	Em registro	Requeijão	53	694	Em registro	Gabriel_72	Leite cru
19	660	Gabriel_32	Em registro	Requeijão	54	696	Em registro	Gabriel_74	Leite cru
20	661	Gabriel_33	Em registro	Requeijão	55	697	Em registro	Gabriel_75	Leite cru
21	662	Gabriel_34	Em registro	Requeijão	56	698	Em registro	Gabriel_76	Utensílio - fazenda de leite
22	663	Gabriel_35	Em registro	Requeijão	57	699	Em registro	Gabriel_78	Utensílio - fazenda de leite
23	664	Gabriel_36	Em registro	Requeijão	58	700	Em registro	Gabriel_79	Utensílio - fazenda de leite
24	665	Gabriel_37	Em registro	Requeijão	59	701	Em registro	Gabriel_81	Requeijão
25	666	Gabriel_38	Em registro	Requeijão	60	702	Em registro	Gabriel_82	Requeijão
26	667	Gabriel_39	Em registro	Equipamentos - laticínio	61	703	Em registro	Gabriel_83	Requeijão
27	668	Gabriel_41	Em registro	Latão de leite - fazenda	62	704	Em registro	Gabriel_84	Requeijão
28	669	Gabriel_43	Em registro	Tanque de refrigeração	63	705	Em registro	Gabriel_85	Requeijão
29	670	Gabriel_45	Em registro	Utensílio - fazenda de leite	64	706	Em registro	Gabriel_86	Requeijão
30	671	Gabriel_46	Em registro	Balde de ordenha - fazenda	65	707	Em registro	Gabriel_87	Requeijão
31	672	Gabriel_47	Em registro	Latão de leite - fazenda	66	708	Em registro	Gabriel_88	Requeijão
32	673	Gabriel_48	Em registro	Latão de leite - fazenda	67	709	Em registro	Gabriel_89	Requeijão
33	674	Gabriel_49	Em registro	Leite cru	68	710	Em registro	Gabriel_90	Requeijão
34	675	Gabriel_50	Em registro	Latão de leite - fazenda	69	711	Em registro	Gabriel_95	Leite cru
35	676	Gabriel_53	Em registro	Teteira					

DOCUMENTO SUPLEMENTAR 2
(Parte 1)

N	ID	Cepa	Código NCBI (acesso)	Espécie	Detalhes
1	225	BT 10792	CM000753.1	<i>B. thuringiensis</i>	Ferida necrótica humana - Yugoslavia
2	226	BT 9727	AE017355.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera - Germany
3	227	BT407	CP003889.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
4	228	BT IS5056	CP004123.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
5	229	BT BMB171	CP001903.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
6	230	BT HD-771	CP003752.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
7	231	BT HD-789	CP003763.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
8	232	BT MC28	CP003687.1	<i>B. thuringiensis</i>	Floresta na China
9	233	BT CT-43	CP001907.1	<i>B. thuringiensis</i>	China
10	234	BT YBT-020	CP002508.1	<i>B. thuringiensis</i>	serovar finitimus
11	235	BT HD73	CP004069.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera - France
12	236	BT AI Hakam	CP009651.1	<i>B. thuringiensis</i>	Iraq
13	238	BT DAR 81934	CM001804.1	<i>B. thuringiensis</i>	Australia
14	239	BT IBL 200	CM000758.1	<i>B. thuringiensis</i>	Humano
15	240	BT IBL 4222	CM000759.1	<i>B. thuringiensis</i>	Gato
16	241	BT BGSC 4AW1	CM000754.1	<i>B. thuringiensis</i>	Espanha
17	242	BT BGSC 4BD1	CM000756.1	<i>B. thuringiensis</i>	China
18	243	BT T03a001	CM000751.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera
19	244	BT BGSC 4AJ1	CM000752.1	<i>B. thuringiensis</i>	Mexico
20	245	BT t13001	CM000750.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera
21	246	BT BGSC 4BA1	CM000755.1	<i>B. thuringiensis</i>	Solo - India
22	247	BT BGSC 4CC1	CM000757.1	<i>B. thuringiensis</i>	Grain Field - Pakistan
23	248	BT T04001	CM000749.1	<i>B. thuringiensis</i>	Canada
24	249	BT T01001	CM000748.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera
25	250	BT BGSC 4Y1	CM000746.1	<i>B. thuringiensis</i>	Solo - Japão
26	252	BT ATCC 35646	AAJM00000000.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
27	253	BA Ames	AE016879.1	<i>B. anthracis</i>	cepa avirulenta
28	254	BA A0248	CP001598.1	<i>B. anthracis</i>	Humano - Ohio
29	255	BA Steme	AE017225.1	<i>B. anthracis</i>	Desenvolvimento vacina
30	256	BA CDC 684	CP001215.1	<i>B. anthracis</i>	-
31	257	BA Ames Ancestor	AE017334.2	<i>B. anthracis</i>	Padrão ouro
32	258	BA A2012	AAAC01000001.1	<i>B. anthracis</i>	Doença respiratória - Florida
33	259	BA H9401	CP002091.1	<i>B. anthracis</i>	Antrax cutâneo - Humano - Korea
34	260	BA 3154	ANFF01000002.1	<i>B. anthracis</i>	Solo - Bulgária
35	261	BA 3166	NZ_ANFG00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Solo - Bulgária
36	262	BA A0174	NZ_ABLT00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Canada
37	263	BA A0193	NZ_ABKF00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Bovino - Dakota do Sul/USA
38	264	BA A0389	NZ_ABLB00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Indonésia
39	265	BA A0442	NZ_ABKG00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Antelope - África do Sul
40	266	BA A0465	NZ_ABLH00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Bovino - França
41	267	BA A0488	NZ_ABJC00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Bovino - UK - alta virulência
42	268	BA A1055	NZ_AAEO01000033.3	<i>B. anthracis</i>	EUA
43	269	BA Australia 94	NZ_AAES01000044.3	<i>B. anthracis</i>	Australia
44	270	BA BF-1	AMDT01000001.1	<i>B. anthracis</i>	Carcassa bovino - Alemanha
45	271	BA CNEVA-9066	NZ_AAEN01000027.3	<i>B. anthracis</i>	França
46	272	BA Carbozap	NZ_ANAO00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Vacina animal - Itália
47	273	BA Gmb1	NZ_CAVE000000000.1	<i>B. anthracis</i>	serovar Ames
48	274	BA Heroin Ba4599	NZ_AGQP00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Heroína - Escócia
49	275	BA KrugerB	NZ_AAEQ00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Animal - Kruger Nat. Park/África do Sul
50	276	BA Sen2Col2	NZ_CAVC00000000.1	<i>B. anthracis</i>	serovar Ames

DOCUMENTO SUPLEMENTAR 2
(Parte 2)

N	ID	Cepa	Código NCBI (acesso)	Espécie	Detalhes
51	277	BA Sen3	NZ_CAVD000000000.1	<i>B. anthracis</i>	serovar Ames
52	278	BA Tsiankovskii-I	NZ_ABDN000000000.2	<i>B. anthracis</i>	Russia Usuário de heroína - Alemanha
53	279	BA UR-1	ALNY000000000.1	<i>B. anthracis</i>	UK-Espanha-Zimbabwe
54	280	BA Vollum	CP007666.1	<i>B. anthracis</i>	França e América do Norte
55	281	BA WesternNA USA6153	NZ_AAER000000000.1	<i>B. anthracis</i>	-
56	282	BC ATCC14579	AE016877.1	<i>B. cereus</i>	Caso de pneumonia fatal
57	283	BC B4264	CP001176.1	<i>B. cereus</i>	Fratura aberta - Nova Iorque
58	284	BC F65185	CM000736.1	<i>B. cereus</i>	Pneumonia severa - USA
59	285	BC 03BB102	CP009318.1	<i>B. cereus</i>	Vômito humano - UK
60	286	BC AH187	CP001177.1	<i>B. cereus</i>	Região Peridontal - Noruega
61	287	BC AH820	CP001283.1	<i>B. cereus</i>	Queijo - Canada
62	288	BC ATCC10987	AE017194.1	<i>B. cereus</i>	Carcassa de zebra - Namibia
63	289	BC E33L	CP000001.1	<i>B. cereus</i>	Ferida humana
64	290	BC F0837/76	CP003187.1	<i>B. cereus</i>	-
65	291	BC FRI-35	CP003747.1	<i>B. cereus</i>	Amostra clínica- Nebraska
66	292	BC G9842	CP001186.1	<i>B. cereus</i>	Síndrome emética
67	293	BC NC7401	AP007209.1	<i>B. cereus</i>	Apatogênica
68	294	BC Q1	CP000227.1	<i>B. cereus</i>	Caso fatal - chipamzé
69	295	BC CI	CP001746.1	<i>B. cereus</i>	Ferida
70	296	BC 172560W	CM000717.1	<i>B. cereus</i>	Endocardite - UK
71	297	BC 95-8201	CM000727.1	<i>B. cereus</i>	Lamp - Iceland
72	298	BC AH1271	CM000739.1	<i>B. cereus</i>	Fluído Amniótico - Islândia
73	299	BC AH1272	CM000740.1	<i>B. cereus</i>	Sangue humano - Islândia
74	300	BC AH1273	CM000741.1	<i>B. cereus</i>	Lácteo
75	301	BC AH603	CM000737.1	<i>B. cereus</i>	Solo - Noruega
76	302	BC AH621	CM000719.1	<i>B. cereus</i>	ATCC
77	303	BC AH676	CM000738.1	<i>B. cereus</i>	-
78	304	BC ATCC10876	CM000715.1	<i>B. cereus</i>	Sensível a fago gama
79	305	BC 4342	CM000721.1	<i>B. cereus</i>	-
80	306	BC BDRD-Bcer4	CM000726.1	<i>B. cereus</i>	-
81	307	BC BDRD-ST196	CM000725.1	<i>B. cereus</i>	-
82	308	BC BDRD-ST24	CM000723.1	<i>B. cereus</i>	-
83	309	BC BDRD-ST26	CM000724.1	<i>B. cereus</i>	-
84	310	BC BGSC 6E1	CM000716.1	<i>B. cereus</i>	-
85	311	BC F	CM001787.1	<i>B. cereus</i>	Amostra antiga de permafrost
86	312	BC MM3	CM000718.1	<i>B. cereus</i>	Alimento
87	313	BC R309803	CM000720.1	<i>B. cereus</i>	Septicemia - UK
88	314	BC Rock1-15	CM000729.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
89	315	BC Rock1-3	CM000728.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
90	316	BC Rock3-28	CM000730.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
91	317	BC Rock3-29	CM000731.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
92	318	BC Rock3-42	CM000732.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
93	319	BC Rock3-44	CM000733.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
94	320	BC Rock4-18	CM000735.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
95	321	BC Rock4-2	CM000734.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
96	322	BC m1293	CM000714.1	<i>B. cereus</i>	Cream cheese
97	323	BC mm1550	NZ_CM000722.1	<i>B. cereus</i>	Frango cru - Brasil
98	324	BC 03BB108	CP009641.1	<i>B. cereus</i>	Pneumonia - Humano
99	325	BC AH1134	NZ_ABDA000000000.2	<i>B. cereus</i>	Endoftalmite - USA
100	326	BC AND1407	NZ_AHCM000000000.1	<i>B. cereus</i>	-

DOCUMENTO SUPLEMENTAR 2
(Parte 3)

N	ID	Cepa	Código NCBI (acesso)	Espécie	Detalhes
101	327	BC B5-2	NZ_AHFW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
102	328	BC BAG1O-1	NZ_AHCN00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
103	329	BC BAG1O-2	NZ_AHCO00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
104	330	BC BAG1X1-1	NZ_AHCQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
105	331	BC BAG1X1-2	NZ_AHCR00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
106	332	BC BAG1X1-3	NZ_AHCS00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
107	333	BC BAG1X2-1	NZ_AHCT00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
108	334	BC BAG1X2-2	NZ_AHCU00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
109	335	BC BAG1X2-3	NZ_AHCV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
110	336	BC BAG2O-1	NZ_AHCW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
111	337	BC BAG2O-3	NZ_AHCY00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
112	338	BC BAG2X1-1	NZ_AHCZ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
113	339	BC BAG2X1-2	NZ_AHDA00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
114	340	BC BAG2X1-3	NZ_AHDB00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
115	341	BC BAG3O-1	NZ_AHJV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
116	342	BC BAG3O-2	NZ_AHDC00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
117	343	BC BAG3X2-1	NZ_AHDD00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
118	344	BC BAG3X2-2	NZ_AHDE00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
119	345	BC BAG4O-1	NZ_AHDF00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
120	346	BC BAG4X12-1	NZ_AHDG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
121	347	BC BAG4X2-1	NZ_AHDG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
122	348	BC BAG5O-1	NZ_AHDI00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
123	349	BC BAG5X1-1	NZ_AHDJ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
124	350	BC BAG5X12-1	NZ_AHDK00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
125	351	BC BAG5X2-1	NZ_AHDL00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
126	352	BC BAG6O-1	NZ_AHDM00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
127	353	BC BAG6O-2	NZ_AHDN00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
128	354	BC BAG6X1-1	NZ_AHDO00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
129	355	BC BAG6X1-2	NZ_AHDP00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
130	356	BC BMG1.7	NZ_AHDQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
131	357	BC BtB2-4	NZ_AHDR00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
132	358	BC CER057	NZ_AHDS00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
133	359	BC CER074	NZ_AHDT00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
134	360	BC G9241	NZ_CP009590.1	<i>B. cereus</i>	Anthrax-like
135	362	BC H3081.97	NZ_ABDL00000000.2	<i>B. cereus</i>	cepa emetica
136	363	BC HD73	NZ_AHDU00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
137	364	BC HuA2-1	NZ_AHDV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
138	365	BC HuA2-3	NZ_AHDW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
139	366	BC HuA2-4	NZ_AHDW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
140	367	BC HuA2-9	NZ_AHDY00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
141	368	BC HuA3-9	NZ_AHDZ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
142	369	BC HuA4-10	NZ_AHEA00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
143	370	BC HuB1-1	NZ_AHEB00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
144	371	BC HuB13-1	NZ_AHEC00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
145	372	BC HuB2-9	NZ_AHED00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
146	373	BC HuB4-10	NZ_AHEE00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
147	374	BC HuB4-4	NZ_AHEF00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
148	375	BC HuB5-5	NZ_AHEG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
149	376	BC IS075	NZ_AHCH00000000.2	<i>B. cereus</i>	-
150	377	BC IS195	NZ_AHEH00000000.1	<i>B. cereus</i>	-

DOCUMENTO SUPLEMENTAR 2
(Parte 4)

N	ID	Cepa	Código NCBI (acesso)	Espécie	Detalhes
151	378	BC IS845/00	NZ_AHEI00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
152	379	BC ISP2954	NZ_AHEJ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
153	380	BC ISP3191	NZ_AHEK00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
154	381	BC K-5975c	NZ_AHEL00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
155	382	BC LCT-BC244	NZ_AJGQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
156	383	BC MC118	NZ_AHEM00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
157	384	BC MC67	NZ_AHEN00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
158	385	BC MSX-A1	NZ_AHEO00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
159	386	BC MSX-A12	NZ_AHEP00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
160	387	BC MSX-D12	NZ_AHEQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
161	388	BC NVH0597-99	NZ_ABDK00000000.2	<i>B. cereus</i>	mix de temperos - Noruega
162	389	BC SJ1	NZ_ADFM00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
163	390	BC TIAC219	NZ_AHCJ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
164	391	BC VD014	NZ_AHER00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
165	392	BC VD021	NZ_AHES00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
166	393	BC VD022	NZ_AHCK00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
167	395	BC VD048	NZ_AHEU00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
168	396	BC VD078	NZ_AHEV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
169	397	BC VD102	NZ_AHEW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
170	398	BC VD107	NZ_AHEX00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
171	399	BC VD115	NZ_AHEY00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
172	400	BC VD118	NZ_AHEZ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
173	401	BC VD131	NZ_AHFA00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
174	402	BC VD133	NZ_AHFB00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
175	404	BC VD140	NZ_AHFD00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
176	405	BC VD142	NZ_AHCL00000000.2	<i>B. cereus</i>	-
177	406	BC VD146	NZ_AHFE00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
178	407	BC VD148	NZ_AHFF00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
179	408	BC VD154	NZ_AHFG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
180	410	BC VD166	NZ_AHFI00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
181	411	BC VD169	NZ_AHFJ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
182	412	BC VD184	NZ_AHFK00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
183	413	BC VD196	NZ_AHFL00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
184	414	BC VD200	NZ_AHFM00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
185	415	BC VD214	NZ_AHFN00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
186	416	BC VDM006	NZ_AHFT00000000.1	<i>B. cereus</i>	antrax-like
187	417	BC VDM019	NZ_AHFO00000000.	<i>B. cereus</i>	-
188	419	BC VDM022	NZ_AHFP00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
189	420	BCVDM034	NZ_AHFQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
190	421	BC VDM053	NZ_AHFR00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
191	422	BC VDM062	NZ_AHFS00000000.1	<i>B. cereus</i>	-