

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

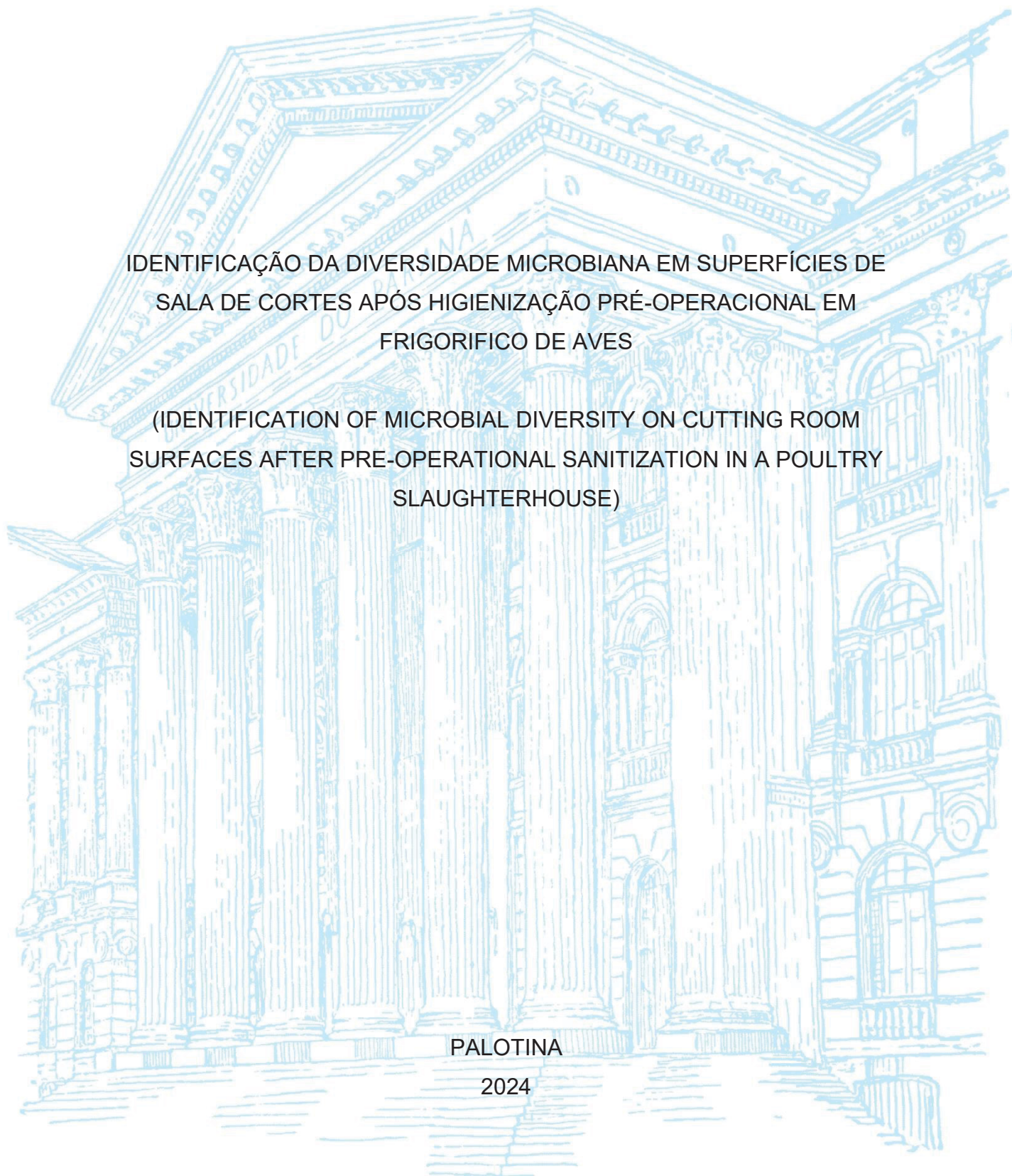
LUIZ GUSTAVO BACH

IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA EM SUPERFÍCIES DE
SALA DE CORTES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL EM
FRIGORIFICO DE AVES

(IDENTIFICATION OF MICROBIAL DIVERSITY ON CUTTING ROOM
SURFACES AFTER PRE-OPERATIONAL SANITIZATION IN A POULTRY
SLAUGHTERHOUSE)

PALOTINA

2024



LUIZ GUSTAVO BACH

IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA EM SUPERFÍCIES DE
SALA DE CORTES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL EM
FRIGORIFICO DE AVES

(IDENTIFICATION OF MICROBIAL DIVERSITY ON CUTTING ROOM
SURFACES AFTER PRE-OPERATIONAL SANITIZATION IN A POULTRY
SLAUGHTERHOUSE)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2024

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

B118 Bach, Luiz Gustavo
Identificação da diversidade microbiana em superfícies de sala
de cortes após higienização pré-operacional em frigorífico de
aves / Luiz Gustavo Bach. – Palotina, PR, 2024.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot.

1. Microrganismos patogênicos. 2. Microrganismos deteriorantes.
3. Sequenciamento 16S rRNA. I. Bersot, Luciano dos Santos.
II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.5

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luiz Gustavo Bach, filho de Cleni Teresinha Bach e David Bach, nascido em 01 de março de 1997 no município de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul. Médico Veterinário formado no ano de 2021 pela Universidade Federal de Pelotas (UFPeI). Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, na linha de pesquisa Microbiologia Aplicada à Produção Animal.

Dedico aos meus pais, Cleni e David. Vocês são a base sólida que sustenta meus sonhos e realizações.

AGRADECIMENTOS

Em reverência, agradeço primeiramente a Deus, fonte de vida que torna tudo possível. Sem o seu amor, eu nada seria; a Ele devo tudo que tenho. Obrigado por ser pai, meu amigo, meu conforto e alívio. Agradeço ainda por cada desafio que moldou minha existência e por cada bênção que enriqueceu minha jornada.

Aos meus pais, David e Cleni, aos meus irmãos, Fábio e Eduardo, às minhas cunhadas, Carol e Daiana, e ao meu afilhado Joaquim, expresso toda minha gratidão. Vocês são meus maiores amores e principais referências. Abriam mão de tanta coisa por mim que uma vida seria pouco para poder retribuir. Agradeço ainda ao meu namorado Felipe, por estar sempre ao meu lado, por me amar tanto e cuidar de mim. Além de ser meu companheiro de vida, é meu melhor amigo. Com certeza, todos vocês sempre foram meus maiores estimuladores e apoiadores. Aprendi com cada um, saberes e valores que nenhum título na vida poderá igualar.

Aos meus gatos, Orfeu, Leona e Yang, agradeço por seu amor genuíno e puro, que muitas vezes foi meu acalento. Além de companheiros, vocês me ensinam todos os dias sobre amar incondicionalmente.

A todos os demais familiares e amigos, não me atenho a dizer o nome de cada um para não esquecer de ninguém, mas cada um de vocês tornou tudo melhor.

Ao LACOMA e toda a equipe, especialmente Camila, Gabriela, Jhennifer, Layza, Prof. Luciano, Márcia, Prof. Vinicius, Rosana, Vanessa, ICs e estagiários. Com vocês, dividi cada detalhe desse projeto, desde os melhores até os piores. Obrigado por toda força de trabalho, amizade, companheirismo e por serem uma família.

Agradeço ao IBTEC (Unesp/Botucatu) e à equipe, especialmente ao Prof. Fábio Possebon, Leonardo, Emanoelli e Evelyn, por terem me auxiliado e compartilhado tanto conhecimento comigo. Além disso, agradeço a Lara pelo auxílio na estatística.

Ao LabMicro (UFPel/Pelotas) e, principalmente, ao Prof. Dr. Wladimir, um profissional indescritível e que sempre me inspirou, foi meu orientador na graduação e me indicou o Lacoma.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano, por ter aceitado me orientar, pelo empenho, dedicação, paciência e por compartilhar seu conhecimento com tanta maestria.

A Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal e todo corpo docente.

A CAPES pela concessão da bolsa.

E todos que de alguma forma contribuíram e se fizeram presentes, meu muito
obrigado!

E lembre-se, a verdade que uma vez foi dita: amar outra pessoa é ver a face de Deus.

(Os Miseráveis, Victor Hugo, 1862)

RESUMO

As superfícies das indústrias de alimentos podem ser consideradas importantes fontes de contaminação microbiana para os alimentos caso não sejam higienizadas adequadamente. Diante disso, esse estudo objetivou avaliar a contaminação superficial após o processo de higienização pré-operacional nas superfícies da sala de cortes de um frigorífico de aves. As análises abrangeram as contagens de microrganismos mesófilos, psicotróficos, *Pseudomonas* spp., além da detecção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.. Adicionalmente, a diversidade microbiana viável dessas superfícies foi investigada por meio das técnicas de MALDI-TOF MS e sequenciamento do gene 16S rRNA, e os isolados foram caracterizados quanto ao seu potencial de adesão em microplacas de poliestireno. Apesar da avaliação da contaminação superficial após o procedimento de higienização ter revelado médias gerais inferiores a 1,0 Log UFC/cm², estabelecido por estudos anteriores como uma contaminação limite, foram identificadas contagens acima desse parâmetro, representando 18% das amostras de mesófilos, 30% de psicotróficos e 10% de *Pseudomonas* spp. No entanto, após o procedimento de higienização, não foi evidenciada a presença de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. As contagens para cada grupo de microrganismo não demonstraram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os diferentes materiais e tipos de esteiras. A avaliação da diversidade microbiana pela técnica de MALDI-TOF MS revelou a predominância dos gêneros *Candida* (14,21%), *Serratia* (13,7%), *Staphylococcus* (12,69%), *Kocuria* (12,69%), *Aeromonas* (6,09%) e *Lelliottia* (6,09%) dentre os 197 microrganismos identificados. Além disso, é importante destacar o isolamento de uma bactéria patogênica, *Yersinia enterocolitica*. Em relação ao sequenciamento, as maiores frequências relativas foram de *Staphylococcus* (13,42%), *Acinetobacter* (9,05%), *Pseudomonas* (8,65%), *Serratia* (5,28%) e *Aeromonas* (4,36%). Ao se investigar a diversidade alfa e beta nas amostras analisadas, não foram identificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para os diferentes materiais e tipos de superfície. O emprego das duas técnicas demonstrou ser uma abordagem abrangente para avaliação da diversidade microbiana viável, totalizando 43 gêneros diferentes. Destes, cada técnica proporcionou a identificação de 15 gêneros exclusivos, enquanto 13 gêneros foram comuns a ambas. Por fim, constatou-se que 45,7% dos isolados apresentava diferentes níveis de capacidade de adesão. O plano amostral mais robusto e sensível revela informações importantes anteriormente desconhecidas pela indústria de alimentos. Os resultados desse estudo reforçam a importância do controle rigoroso, monitoramento constante e estratégias específicas para garantir a segurança e qualidade nas instalações industriais de alimentos.

Palavras-chave: MALDI-TOF; sequenciamento 16S rRNA; microrganismos patogênicos; microrganismos deteriorantes; adesão.

ABSTRACT

Food industry surfaces can be considered important sources of microbial contamination if they are not properly sanitized. Based on this, this study aimed to assess surface contamination after the pre-operational sanitization process on the surfaces of the cutting room of a poultry slaughterhouse. The analyses included counts of mesophilic, psychrotrophic, and *Pseudomonas* spp. microorganisms, as well as the detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. In addition, the viable microbial ecology of these surfaces was investigated using MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing techniques, and the isolates were characterized in terms of their adhesion potential. Although the evaluation of surface contamination after the sanitizing procedure revealed overall averages below the 1,0 Log UFC/cm² limit established by previous studies as a limit contamination, counts above this parameter were identified, representing 18% of the samples of mesophiles, 30% of psychrotrophic and 10% of *Pseudomonas* spp. However, after the sanitizing procedure, the presence of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* was not evidenced. The counts for each group of microorganisms showed no statistical difference ($p > 0.05$) between the different materials and types of conveyor belts. The assessment of microbial diversity using the MALDI-TOF MS technique revealed a predominance of the genera *Candida* (14.21%), *Serratia* (13.7%), *Staphylococcus* (12.69%), *Kocuria* (12.69%), *Aeromonas* (6.09%) and *Lelliottia* (6.09%) among the 197 microorganisms identified. It is also important to highlight the isolation of a pathogenic bacterium, *Yersinia enterocolitica*. In terms of sequencing, the highest relative frequencies were *Staphylococcus* (13.42%), *Acinetobacter* (9.05%), *Pseudomonas* (8.65%), *Serratia* (5.28%) and *Aeromonas* (4.36%). When investigating alpha and beta diversity in the samples analyzed, no statistically significant differences ($p < 0.05$) were identified for the different materials and surface types. Using the two techniques proved to be a comprehensive approach to assessing viable microbial ecology, totaling 43 different genera. Of these, each technique enabled the identification of 15 unique genera, while 13 genera were common to both. Finally, it was found that 45.7% of the isolates had different levels of adhesion capacity. The more robust and sensitive sampling plan reveals important information previously unknown to the food industry. The results of this study reinforce the importance of strict control, constant monitoring and specific strategies to guarantee safety and quality in industrial food facilities.

Keywords: MALDI-TOF; 16S rRNA sequencing; pathogenic microorganisms; spoilage microorganisms; adhesion.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1-	VANTAGENS E DESVANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO E COMPOSTOS DE AMÔNIO QUATERNÁRIO COMO AGENTES SANITIZANTES.....	24
-----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	ESQUEMA ILUSTRATIVO DO CICLO DE SINNER.....	23
FIGURA 2-	DISTRIBUIÇÃO DAS CONTAGENS DE MESÓFILOS, PSICROTRÓFICOS E <i>Pseudomonas</i> sp. NA SALA DE CORTES DO ABATEDOURO DE AVES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL (Log UFC/cm ²).....	45
FIGURA 3-	GÊNEROS E PORCENTAGENS CORRESPONDENTES DE ISOLADOS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS.....	47
FIGURA 4-	ESPÉCIES E PORCENTAGENS CORRESPONDENTES DE ISOLADOS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS.....	48
FIGURA 5-	FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DE MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS NA SALA DE CORTES DO ABATEDOURO DE AVES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL.....	49
FIGURA 6-	FREQUÊNCIA RELATIVA DAS ESPÉCIES DE MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS NA SALA DE CORTES DO ABATEDOURO DE AVES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL.....	50
FIGURA 7-	FREQUÊNCIA RELATIVA DAS FAMÍLIAS DE MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO 16S rRNA NA SALA DE CORTES DO ABATEDOURO DE AVES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL.....	52
FIGURA 8-	FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DE MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO 16S rRNA NA SALA DE CORTES DO ABATEDOURO DE AVES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL.....	53
FIGURA 9-	GÊNEROS MICROBIANOS IDENTIFICADOS PELAS TÉCNICAS DE MALDI-TOF MS, SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA E EM AMBAS.....	55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- TABELA 1- MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS CONTAGENS (Log UFC/cm²) PARA CADA GRUPO DE MICROORGANISMO EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES MATERIAIS E TIPOS DE ESTEIRA.....46
- TABELA 2- PONTOS DE COLETA, NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS, NÚMERO DE ISOLADOS OBTIDOS E NÚMERO DE ISOLADOS SUBMETIDOS À ANÁLISE DE MALDI-TOF MS.....47
- TABELA 3- PONTOS DE COLETA, NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS E NÚMERO AMOSTRAS SEQUENCIADAS.....51

APÊNDICE

- TABELA 1- ESPÉCIES E NÚMERO DE ISOLADOS IDENTIFICADOS ATRAVÉS DO MALDI-TOF MS POR PONTO DE COLETA MS.....79

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

APT	- Água peptonada tamponada
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	- Caldo infusão cérebro e coração
BL	- <i>Boneless leg</i>
BS	- Agar bismuto sulfito
CMS	- Carne mecanicamente separada
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DTA	- Doenças transmitidas por alimentos
LEB	- Caldo de enriquecimento seletivo para <i>Listeria</i>
MALDI-TOF MS	- Espectrometria de Massa de Tempo de Voo por Ionização de Dessorção a Laser Assistida por Matriz
MKTTn	- Muller-kauffmann tetracionato novobiocina
OTUs	- <i>Operational Taxonomic Unit</i>
OXA	- Agar <i>Listeria</i> Oxford
PBS	- Tampão fosfato salino
PCA	- Ágar padrão para contagem
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
rpm	- Rotações por minuto
rRNA	- Ácido ribonucleico ribossomal
RVS	- Caldo rappaport-vassiliadis soja
TSA	- Agar triptona de soja
TSA-YE	- Agar triptona de soja extrato de levedura
TSB	- Caldo triptona de soja
TSI	- Agar tríplice açúcar ferro
XLD	- Agar xilose lisina desoxicolato

LISTA DE SÍMBOLOS

© - *Copyright*

® - *Marca registrada*

™ – *Trade mark*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	21
2.2 ECOLOGIA MICROBIANA	25
2.3 MICRORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE	26
2.3.1 Microrganismos mesófilos	27
2.3.2 Microrganismos psicrotróficos	28
2.3.3 <i>Pseudomonas</i> spp.	28
2.4 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS	29
2.4.1 <i>Salmonella</i> spp.	30
2.4.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 CAPÍTULO 1: IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA EM SUPERFÍCIES DE SALA DE CORTES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL EM FRIGORÍFICO DE AVES	35
4.1 INTRODUÇÃO	36
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.2.1 Local de coleta e amostragem	37
4.2.2 Contagem de microrganismos indicadores	38
4.2.3 Confirmação de <i>Pseudomonas</i> spp. por PCR	39
4.2.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	40
4.2.5 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	40
4.2.6 Caracterização da diversidade microbiana por MALDI-TOF MS	41
4.2.7 Caracterização da diversidade microbiana pelo sequenciamento do gene 16S rRNA	42
4.2.8 Determinação da capacidade de adesão dos microrganismos	43
4.2.9 Análise estatística	44
4.3 RESULTADOS	45
4.3.1 Contagem de microrganismos indicadores de higiene	45
4.3.2 Detecção de <i>Salmonella</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i>	46

4.3.3 Diversidade microbiana pela técnica de MALDI-TOF MS	46
4.3.4 Caracterização da diversidade microbiana pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.....	50
4.3.5 Semelhanças das técnicas para identificação da diversidade microbiana a nível de gênero	54
4.3.6 Capacidade de adesão dos isolados.....	55
4.4 DISCUSSÃO	55
4.5 CONCLUSÃO.....	61
4.6 REFERÊNCIAS.....	62
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICE.....	79

1 1 INTRODUÇÃO

2 O setor agropecuário desempenha um papel importante para o Brasil. As
3 atividades agropecuárias representam um dos principais pilares da economia do país,
4 representado uma parcela substancial do Produto Interno Bruto (PIB) (DA SILVEIRA;
5 FEISTEL; BRUM, 2019). Dentre essas atividades, a avicultura se destaca pela sua
6 produção anual. Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA,
7 2023), no ano de 2022 foram produzidos 14.524 milhões de toneladas, totalizando um
8 valor bruto de 112.1 bilhões de reais, figurando o Brasil como o segundo maior
9 produtor e primeiro maior exportador de carne de frango do mundo.

10 Além do impacto econômico, o setor exerce um papel importante sobre os
11 aspectos de segurança alimentar. Frente ao cenário de incremento populacional ao
12 longo dos anos, torna-se cada vez mais indispensável uma expansão produtiva que
13 atenda às exigências de mercado e garanta as condições higiênico-sanitárias dos
14 processos tecnológicos e a inocuidade dos alimentos (RICKE, 2023).

15 A carne de frango é um alimento amplamente consumido no país em função
16 dos hábitos alimentares da população, da versatilidade de preparo e do preço de
17 mercado mais acessível. Além disso, desempenha importância na dieta humana por
18 ser nutricionalmente rica em proteínas, vitaminas e minerais. Contudo, suas
19 características intrínsecas, como a composição química, atividade de água e pH
20 próximo a neutralidade, propiciam um ambiente oportuno para a multiplicação de
21 microrganismos (ÇAPAN; BAĞDATLI, 2021).

22 Os locais de manipulação e processamento de matérias-primas na indústria
23 alimentícia podem ser considerados fontes de contaminação, visto que entram em
24 contato direto com os alimentos e podem servir de reservatório para microrganismos.
25 Nesse contexto, a identificação e caracterização desses microrganismos é uma
26 medida de importância social, econômica e de saúde pública (ZENG *et al.*, 2021;
27 ZHAO *et al.*, 2017). Ao longo da cadeia produtiva é possível avaliar a qualidade
28 microbiológica dos produtos e processos através da contagem e pesquisa de
29 microrganismos indicadores e patogênicos (BRASIL, 2017a).

30 A higienização das instalações e equipamentos da indústria alimentícia
31 constitui uma etapa essencial ao longo de todo o processo produtivo. Através desse
32 procedimento aplicado rotineiramente é possível reduzir a contaminação das
33 superfícies a níveis aceitáveis. Os agravos associados a uma ineficiente higienização

1 incluem a contaminação dos alimentos por bactérias patogênicas (MOURA *et al.*,
2 2019; TAGAR; QAMBRANI, 2023) ocasionando as chamadas doenças veiculadas por
3 alimentos, e a contaminação por microrganismos deteriorantes (HINTON JUNIOR;
4 CASON; INGRAM, 2004). Ambos os aspectos geram prejuízos econômicos, danos à
5 reputação da marca, e possíveis medidas sancionatórias (BRASIL, 2017a).

6 Em contrapartida, a eliminação completa dos microrganismos de uma
7 superfície representa um desafio significativo (MAES *et al.*, 2019; TADIELO *et al.*,
8 2023b). A higienização pré-operacional é projetada para reduzir significativamente a
9 carga bacteriana de superfícies e equipamentos, mas a eliminação total nem sempre
10 é possível devido a diversos fatores, como a complexidade das estruturas, natureza
11 dos materiais, condições ambientais, eficácia dos produtos, características dos
12 microrganismos, composição dos alimentos, entre outros (BERNARDES, 2012; TANG
13 *et al.*, 2009).

14 A capacidade dos microrganismos de sobreviver e persistir por longos períodos
15 é uma preocupação para a indústria alimentícia. A aptidão para aderir e formar biofilme
16 em superfícies representam elementos facilitadores para a permanência desses
17 microrganismos (WAGNER *et al.*, 2021). Conseqüentemente, a estrutura do biofilme
18 pode conferir maior resistência aos processos de higienização realizados
19 (LANGSRUD *et al.*, 2016; PANG; YUK, 2019; ZENG *et al.*, 2021).

20 Mais estudos são necessários para caracterizar a identidade das bactérias e o
21 seu papel como participante da ecologia dessas superfícies. Diante dessa demanda,
22 diversas técnicas têm sido utilizadas para auxiliar nesse processo, destacando-se, por
23 exemplo, a técnica de MALDI-TOF MS (Espectrometria de Massa de Tempo de Voo
24 por Ionização de Dessorção a Laser Assistida por Matriz) e o sequenciamento do gene
25 16S rRNA (WAGNER *et al.*, 2020). Assim, este estudo teve como objetivos avaliar a
26 contaminação superficial após o processo de higienização pré-operacional nas
27 superfícies da sala de cortes de um frigorífico de aves, por meio das contagens de
28 microrganismos indicadores e da pesquisa de microrganismos patogênicos; identificar
29 a diversidade microbiana viável dessas instalações utilizando as técnicas de MALDI-
30 TOF MS e sequenciamento do gene 16S rRNA; e caracterizar o potencial de adesão
31 dos isolados.

32

33

1 2 REVISÃO DE LITERATURA

2 2.1 Higienização na indústria de alimentos

3 A busca pela qualidade dos produtos é um desafio enfrentado por diversos
4 setores produtivos. Na indústria de alimentos, em particular, o procedimento de
5 higienização se configura como uma etapa essencial para assegurar a qualidade e a
6 segurança dos alimentos (BAKIN *et al.*, 2023).

7 Após o final de um dia de processamento, as superfícies e equipamentos da
8 indústria podem acabar retendo resíduos orgânicos e inorgânicos. Esses compostos,
9 além de servirem como fonte de nutriente para multiplicação microbiana, criam um
10 filme condicionante para a fixação de microrganismos, favorecendo a formação de
11 biofilme (DE OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010). Como medida preventiva, as
12 indústrias realizam rotineiramente procedimentos de higienização abrangendo tanto o
13 ambiente industrial quanto todos as superfícies de equipamentos e utensílios
14 envolvidos no processo de produção.

15 A Higienização Industrial e Operacional faz parte de um dos programas de
16 autocontrole exigidos pelas legislações e regulamentações do Ministério da
17 Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a exemplo da Norma Interna n° 01, de
18 8 de março de 2017 (BRASIL,2017b); Portaria n° 210 de 10 de novembro de 1998
19 (BRASIL, 1998) e suas atualizações e o Regulamento de Inspeção Industrial e
20 Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2017a) com suas
21 atualizações, a fim de garantir que o produto seja manuseado em superfícies limpas.
22 Este programa de autocontrole aborda os processos de higienização operacional,
23 realizado durante o processamento, e pré-operacional, realizado ao final do
24 processamento com vistas a preparar a superfície para o próximo dia de
25 processamento.

26 Segundo o RIISPOA (BRASIL, 2017a), a higienização é resultado de dois
27 procedimentos distintos:

28 - Limpeza: remoção de resíduos orgânicos (carboidratos, lipídeos e proteínas)
29 e inorgânicos (sais minerais) das superfícies que entram em contato direto ou indireto
30 com os alimentos.

31 - Sanitização: realizado posteriormente a limpeza com objetivo de eliminar a
32 população microbiana presente nas superfícies por métodos físicos e químicos.

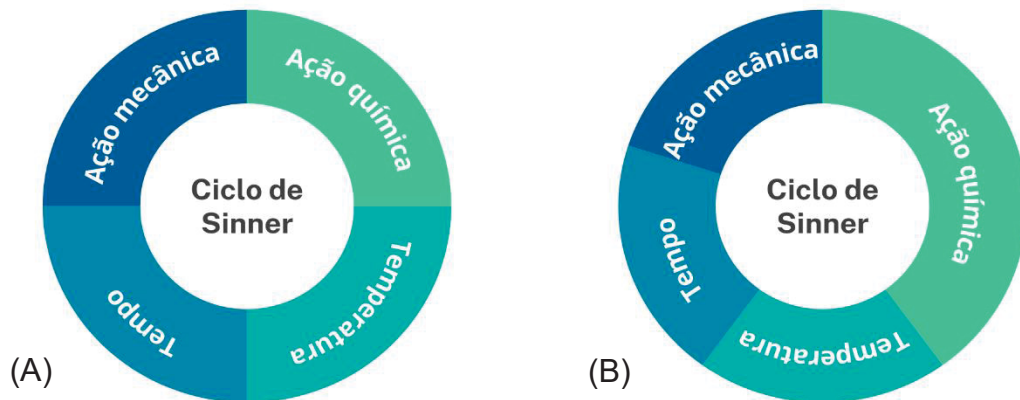
1 O número de etapas da higienização de uma indústria pode variar em função
2 do tipo de resíduo, pois diferentes detergentes podem ser necessários para remover
3 de forma eficaz compostos orgânicos e inorgânicos. Em termos gerais, o protocolo de
4 higienização compreende uma sequência que inclui uma etapa inicial de pré-lavagem,
5 seguida pela limpeza com detergentes, subsequente enxágue, processo de
6 sanitização e, por fim, novo enxágue (ROVIRA; DIEZ; MELERO, 2014).

7 A etapa de pré-lavagem é a eliminação dos resíduos sólidos mais grosseiros
8 com auxílio de água, associada à eliminação de resíduos líquidos, permitindo sua
9 drenagem das superfícies. No entanto, alguns resíduos permanecem aderidos, e por
10 isso soluções detergentes são utilizadas na etapa subsequente de limpeza (KUNIGK,
11 2023).

12 Os diferentes tipos de resíduos são classificados em ácido-solúveis, álcali-
13 solúveis, solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Por essa razão, os
14 detergentes empregados na rotina de higienização são agrupados em categorias, tais
15 como neutros, alcalinos suaves, alcalinos fortes, ácidos suaves e ácidos fortes
16 (DAMIAN, 2023). Adicionalmente, as formulações atuais dos detergentes apresentam
17 tensoativos, substâncias utilizadas para favorecer a entrada de água nos depósitos
18 de sujeira e entre os resíduos e a superfície (KUNIGK, 2023).

19 De acordo com Kunigk (2023), o processo de limpeza não é afetado somente
20 pelas substâncias presentes nas formulações dos detergentes, mas também pelo tipo
21 e concentração do tensoativo, temperatura de aplicação do detergente, ação
22 mecânica sobre as superfícies e o tempo de duração do procedimento. Esses fatores
23 apresentam uma interdependência, isto é, uma variável exerce influência sobre as
24 outras quando modificada. A título de exemplo, na Figura 1A, os quatro fatores estão
25 equilibrados, mas um aumento na concentração do detergente pode resultar na
26 necessidade de aplicar uma força mecânica menor durante o procedimento de
27 limpeza, como demonstrado no Ciclo de Sinner (FIGURA 1B).

1 FIGURA 1- ESQUEMA ILUSTRATIVO DO CICLO DE SINNER



2

3

FONTE: Adaptado de Kunigk (2023)

4

5

6

7

8

9

O processo de enxágue com água é realizado entre as etapas de lavagem visando remover resíduos, detergentes e sanitizantes. Sua principal função é atuar como agente suspensor, garantindo a remoção eficiente desses elementos. No entanto, é fundamental que a água utilizada nesse procedimento atenda aos critérios microbiológicos e físico-químicos estabelecido por órgãos competentes (ANDRADE, 2008).

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

A fase sanitização, executada após o processo de limpeza, utiliza métodos físicos e químicos para a redução da população microbiana das superfícies. Dentre os métodos físicos, o calor e a radiação ultravioleta são as mais utilizadas, e nos métodos químicos, são utilizadas substâncias sanitizantes. Comercialmente, diversos desses compostos estão disponíveis, destacando-se o ácido peracético e compostos de amônio quaternário, por exemplo. O ácido peracético atua por meio de um mecanismo que induz a oxidação de grupos sulfidrilas em enzimas, interferindo nos processos metabólicos. Por sua vez, os compostos de amônio quaternário causam interferência na permeabilidade da membrana celular e no metabolismo de proteínas (ANDRADE, 2008). Demais características são descritas no Quadro 1:

20

21

22

QUADRO 1- VANTAGENS E DESVANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO PERACÉTICO E COMPOSTOS DE AMÔNIO QUATERNÁRIO COMO AGENTES SANITIZANTES

Composto	Concentração (mg/L)	Ação contra			Vantagens	Desvantagens
		Gram+	Gram-	Esporos		
Ácido peracético	60	+++	+++	+++	Eficiente em baixas concentrações, ação de amplo espectro, penetra em biofilme, decompõe-se em ácido acético e água e não forma subprodutos tóxicos	Pode ser corrosivo, relativamente instável e possui odor forte de vinagre
Compostos de amônio quaternário	100 a 200	+++	+-	---	Baixa toxicidade, ausência de odor, não são irritantes, boa adsorção à superfície e mantém atividade antimicrobiana residual	Nota-se aumento de resistência bacteriana, geram espuma, inativados em pH baixo e deixa filme residual

FONTE: Adaptado de LENAHAN, 1992; ANDRADE, 2008.

LEGENDA: +++ = eficaz; +- = moderadamente eficaz; +- = baixa eficácia; --- = sem eficácia

1

2 A ação dos sanitizantes pode ser afetada por uma série de questões, dentre as
3 quais (KUNIGK, 2023):

4 - Características e tamanho da população microbiana presente: cada
5 sanitizantes é capaz de reduzir a população microbiana até determinado número,
6 assim como diferentes microrganismos apresentam diferentes perfis de tolerância aos
7 sanitizantes.

8 - Concentração, pH, tempo e temperatura de exposição: cada sanitizante
9 apresenta concentração, pH e tempo ideal de utilização. Ainda, grande parte dos
10 sanitizantes necessita que o tempo de exposição seja dobrado a cada decréscimo de
11 10 °C na temperatura.

12 - Presença de resíduos nas superfícies: a presença de matéria orgânica e
13 tensoativos pode desencadear reações químicas com os sanitizantes, resultando na
14 diminuição de sua eficácia.

15 - Rugosidade das superfícies: essas irregularidades servem como abrigo para
16 os microrganismos, impedindo o efetivo contato com os sanitizantes.

17 A verificação periódica do procedimento de higienização é conduzida para
18 detectar possíveis falhas no processo, as quais podem ser evidenciadas pelo aumento

1 da contaminação microbiana (ISMAÏL *et al.*, 2013). O teste de *swab* é uma
2 metodologia amplamente utilizada para a contagem total de bactérias viáveis. Essa
3 técnica envolve a fricção do *swab* sobre a superfície delimitada por moldes estéreis,
4 seguida pela ressuspensão dos microrganismos em uma solução neutralizante.
5 Posteriormente, realiza-se o plaqueamento em ágar não seletivo para multiplicação
6 dos microrganismos presentes na amostra (ISMAÏL *et al.*, 2013; ROVIRA; DIEZ;
7 MELERO, 2014).

8 A legislação brasileira, até o momento, não dispõe de padrões microbiológicos
9 para determinar a eficácia da Higienização Industrial e Operacional. As empresas têm
10 autonomia para estabelecer seus próprios limites com base nas contagens mínimas
11 observadas. Entretanto, estudos conduzidos no contexto brasileiro evidenciaram
12 deficiências nesses procedimentos quando as contagens ultrapassam 10 UFC/cm²
13 (RODRIGUES *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2018; TADIELO *et al.*, 2023b).

14 2.2 Ecologia Microbiana

15 A ecologia microbiana é definida como uma área do conhecimento que estuda
16 a diversidade de microrganismos que vivem em um ambiente específico e que
17 interagem entre si (CUNDELL, 2018). A avaliação da ecologia microbiana através de
18 técnicas como MALDI-TOF MS e o sequenciamento de *amplicon* representam uma
19 abordagem abrangente e detalhada para explorar a diversidade dos microrganismos
20 em diferentes ambientes. Essas novas metodologias surgiram como alternativas aos
21 métodos fenotípicos clássicos de identificação bacteriana (RAHI; VAISHAMPAYAN,
22 2020; WAGNER *et al.*, 2020).

23 A técnica de MALDI-TOF MS é amplamente empregada devido à sua
24 capacidade de fornecer resultados rápidos e de baixo custo, sendo aplicada inclusive
25 para procedimentos de monitoramento ambiental de indústrias (FARRANCE; KHOT,
26 2003). Essa abordagem permite identificar uma ampla variedade de microrganismos,
27 o que inclui bactérias e fungos (YAN *et al.*, 2020; DE MIRANDA *et al.*, 2023). Na
28 técnica, uma amostra do microrganismo é combinada com uma matriz e depositada
29 sobre uma placa, onde ocorre a irradiação por laser. Essa matriz absorve a energia
30 do laser, resultando na dessorção e ionização individual das moléculas. Os íons são
31 então acelerados em um campo elétrico e percorrem um tubo até um detector. A
32 massa dos íons influencia no tempo necessário para atravessar a estrutura, com íons
33 de menor massa movendo-se mais rapidamente em comparação aos íons de maior

1 massa. Após essa etapa, é gerado um espectro de massa característico para cada
2 microrganismo, que é então comparado com banco de dados conhecido, permitindo
3 a identificação do microrganismo em análise (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB,
4 2012).

5 O método de sequenciamento de *amplicon*, concentra-se na amplificação da
6 sequência de uma região específica do material genético microbiano. Essa técnica
7 envolve, inicialmente, a amplificação do gene alvo por meio de uma reação em cadeia
8 da polimerase (PCR), sendo que, no caso das bactérias, o gene 16S rRNA é
9 predominantemente utilizado (COCOLIN *et al.*, 2013). Esse gene possui regiões
10 conservadas, que possibilitam desenhar *primers* universais, e regiões variáveis, que
11 permitem a diferenciação das bactérias presentes na amostra (ZHANG *et al.*, 2018).
12 Posteriormente, as *reads* são comparadas com bancos de dados e agrupadas por
13 similaridade em *Operational Taxonomic Unit* (OTUs), obtendo-se a composição
14 taxonômica. Como o número de *reads* associadas a cada OTU é proporcional à sua
15 abundância na amostra, isso torna possível o cálculo da distribuição relativa e
16 absoluta para cada táxon. (DE FILIPPIS; PARENTE; ERCOLINI, 2018). Essa
17 metodologia proporciona resultados mais rápidos e seguros, permitindo a detecção
18 de células bacterianas em diferentes estados, inclusive sem necessidade de cultivo
19 (O'SULLIVAN *et al.*, 2013). Além disso, é possível estimar a diversidade microbiana
20 das amostras através de dois tipos de medidas diferentes, a alfa e a beta diversidade
21 (SARANGI; GOEL; AGGARWAL, 2019).

22 A diversidade alfa refere-se à diversidade de espécies dentro de uma mesma
23 comunidade ou local específico. Seus componentes incluem a riqueza das espécies
24 (número de espécies diferentes presentes) e a uniformidade (a distribuição das
25 abundâncias das diferentes espécies). Por outro lado, a diversidade beta constitui a
26 variação na composição de espécies entre diferentes comunidades (DALY *et al.*,
27 2018).

28 2.3 Microrganismos indicadores de higiene

29 Os métodos laboratoriais convencionais disponíveis atualmente ainda não
30 permitem a detecção, enumeração ou identificação de todas as bactérias presentes
31 em uma amostra de alimento. Em decorrência dessa limitação, as análises são
32 direcionadas a alguns grupos de microrganismos ou microrganismos específicos,
33 chamados comumente de indicadores (BÍSCOLA; FRANCO, 2023). Estes, quando

1 presentes, fornecem indicações sobre o estado higiênico-sanitário, potencial
2 deterioração do alimento e provável presença de patógenos (TORTORELLO, 2003).

3 No entanto, a avaliação desses indicadores não apenas contribui para o
4 controle de qualidade e segurança dos produtos, mas também pode auxiliar na
5 validação da eficácia das medidas de controle microbiano aplicados na indústria. Por
6 meio dessa análise é possível monitorar a higienização, a adesão aos programas de
7 Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os pontos críticos de controle da análise de
8 perigos (TORTORELLO, 2003).

9 A análise de microrganismos indicadores é muito utilizada em razão do seu
10 menor custo, simplicidade da técnica, facilidade de detecção e enumeração, rapidez
11 dos resultados, permitindo tomadas de decisões rápidas, além de possibilitar a
12 realização de análises de tendências (GERBA, 2015).

13 2.3.1 Microrganismos mesófilos

14 Os microrganismos mesófilos, também conhecidos como aeróbios mesófilos,
15 englobam tanto as bactérias aeróbias estritas como as aeróbias facultativas. Sua
16 enumeração é denominada contagem total de bactérias aeróbias mesófilas ou
17 contagem padrão em placa (DA SILVA *et al.*, 2018).

18 A temperatura ótima de multiplicação desse grupo gira em torno de 30 °C a 45
19 °C, com mínimo de 5 °C e máximo de 47 °C (FORSYTHE, 2013). A maioria dos
20 microrganismos de importância em alimentos são mesófilos, porém a realização da
21 técnica de contagem padrão em placa não prevê a diferenciação dessas bactérias.
22 Posto isso, o resultado de uma análise apresentando altas contagens de bactérias
23 mesófilas indica que durante alguma etapa da cadeia produtiva houve condições
24 favoráveis para a multiplicação microbiana (BÍSCOLA; FRANCO, 2023).

25 Como a análise objetiva a avaliação dos microrganismos viáveis do grupo, a
26 técnica pode fornecer uma visão sobre a qualidade sanitária dos alimentos, das
27 condições de processamento e armazenamento, bem como da contaminação das
28 superfícies e equipamentos (BOHRZ *et al.*, 2019; RAIMUNDO *et al.*, 2021). Essa
29 abordagem contribui significativamente para o monitoramento das medidas de
30 controle utilizadas na indústria.

1 2.3.2 Microrganismos psicrotróficos

2 Psicrotróficos são bactérias que exibem a capacidade de se multiplicarem em
3 baixas temperaturas, compreendidas entre 0 °C a 7 °C. Todavia, sua temperatura
4 ótima de crescimento situa-se em torno de 20 °C, classificando-as como um subgrupo
5 dos mesófilos, diferenciando-se dos psicrofilos, que são inativados em temperatura
6 ambiente (DA SILVA *et al.*, 2018).

7 Sua capacidade de multiplicação em condições de baixa temperatura as
8 tornam particularmente relevantes na indústria de alimentos, onde a refrigeração é
9 uma prática comum para a preservação e armazenamento dos produtos. A análise
10 desse grupo microbiano é utilizada para avaliar desvios microbiológicos nos
11 alimentos, visto que possuem capacidade de provocar deterioração pela produção de
12 enzimas proteolíticas e lipolíticas (MAES *et al.*, 2019). No entanto, esses
13 microrganismos podem resistir aos processos de limpeza e sanitização da indústria e
14 atuarem como fontes de contaminação (FAGERLUND *et al.*, 2017).

15 Entre os representantes desse grupo podem ser citadas: *Acinetobacter* spp.,
16 *Aeromonas* spp., *Carnobacterium* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.,
17 *Enterococcus* spp., *Microbacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp.,
18 *Psychrobacter* spp., *Serratia* spp., entre outros (ARCURI *et al.*, 2008). Alguns
19 microrganismos patogênicos também podem fazer parte desse grupo, como por
20 exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* e
21 *Vibrio cholerae* (DA SILVA *et al.*, 2018).

22

23 2.3.3 *Pseudomonas* spp.

24 O gênero *Pseudomonas*, pertencente à família Pseudomonadaceae,
25 compreende bactérias psicrotróficas com morfologia de bastonetes Gram-negativas,
26 aeróbias, não fermentadores, não esporogênicas, catalase e oxidase positivas
27 (CALDERA *et al.*, 2016). A maioria dos representantes são móveis e apresentam um
28 ou mais flagelos polares. Esses microrganismos são reconhecidos por serem um
29 grupo heterogêneo e de grande relevância ecológica, sendo encontrados em diversos
30 ambientes, como alimentos, solo, plantas, água doce e ambientes marinhos. Essa
31 distribuição abrangente é atribuída aos robustos sistemas enzimáticos que conferem
32 às *Pseudomonas* adaptabilidade a diferentes condições ambientais (FRANZETTI;
33 SCARPELLINI, 2007).

1 Umas das implicações significativas do gênero para a indústria de alimentos
2 reside no seu potencial deteriorante. A liberação de pigmentos e a produção de
3 enzimas, como lipases e proteases, desencadeiam alterações sensoriais, gerando
4 odor desagradável e a modificações nas características de sabor, aspecto e textura
5 (CALDERA *et al.*, 2016). Além disso, algumas proteases são termoestáveis e,
6 portanto, resistem aos processos térmicos utilizados durante o processamento. Essa
7 atividade metabólica compromete a qualidade e diminui o tempo de vida de prateleira
8 dos produtos (MORALES *et al.*, 2016).

9 *Pseudomonas* spp. demonstrou capacidade de causar deterioração em uma
10 variedade de produtos alimentícios, como produtos lácteos (ZAREI *et al.*, 2020),
11 diversos tipos de carnes e produtos cárneos (WICKRAMASINGHE *et al.*, 2019;
12 KATIYO *et al.*, 2020), peixes (STERNIŠA; KLANČNIK; MOŽINA, 2019), frutos do mar
13 (DON *et al.*, 2018) e ovos (WANG *et al.*, 2021).

14 Entretanto, esses microrganismos também podem residir em superfícies
15 industriais, atuando como fonte de contaminação cruzada (CHERIFI *et al.*, 2022). A
16 capacidade de formação de biofilme pode favorecer a sua permanência nesses
17 ambientes (NAHAR *et al.*, 2021), e pode favorecer a permanência de outras espécies
18 patogênicas (DEL MAR CENDRA; TORRENTS, 2021). Do mesmo modo, a matriz
19 extracelular é capaz de conferir maior proteção em ambientes hostis e resistência a
20 situações de estresse, como a ação de sanitizantes (ZHOU *et al.*, 2024).

21 2.4 Microrganismos patogênicos

22 Os microrganismos patogênicos são responsáveis pelas chamadas Doenças
23 Veiculadas por Alimentos (DVA), ou seja, doenças em que os alimentos atuam como
24 veículos de bactérias prejudiciais à saúde humana. Essas enfermidades manifestam-
25 se principalmente no sistema gastrointestinal, embora possam afetar também outros
26 sistemas, como o sistema nervoso central. Segundo dados da Organização Mundial
27 da Saúde (WHO, 2022), aproximadamente 600 milhões de pessoas são afetadas
28 anualmente por DVA, resultando em 420.000 mortes. Paralelamente, a *Food and Drug*
29 *Administration* (FDA, 2023) destaca que, apesar do sistema de abastecimento
30 alimentar dos Estados Unidos da América (EUA) estar entre os mais seguros do
31 mundo, um em cada seis americanos adocece por ano devido a esses agravos. Essa
32 incidência resulta num total de 48 milhões de casos, 128.000 hospitalizações e 3.000
33 mortes.

1 2.4.1 *Salmonella* spp.

2 *Salmonella* sp. são bacilos Gram-negativos da família Enterobacteriaceae,
3 anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, fermentadores de glicose,
4 oxidase negativa e catalase positiva. São móveis com flagelos peritríquios, exceto os
5 sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Possuem distribuição ubiquitária, tendo o trato
6 gastrointestinal dos animais como seu principal reservatório. Dessa forma, são
7 encontrados em diversos hospedeiros, dentre eles, répteis, insetos, aves e mamíferos
8 (MARTINEZ *et al.*, 2023).

9 Taxonomicamente, o gênero é dividido em duas espécies distintas, *Salmonella*
10 *bongori* e *Salmonella enterica*. A última, por sua vez, é dividida em seis subespécies:
11 *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*,
12 *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtanae* e *S. enterica* subsp. *indica*.
13 Cabe ressaltar que cada uma das espécies é adicionalmente subdividida em
14 sorovares, perfazendo um total de aproximadamente 2600 sorovares diferentes
15 (GRIMONT; WEILL, 2007).

16 *Salmonella* spp. é reconhecida mundialmente como um dos principais agentes
17 etiológicos envolvidos em casos de DVA (BESSER, 2018). No Brasil, essa bactéria é
18 apontada como o segundo patógeno mais prevalente em surtos de origem alimentar,
19 sendo responsável por 10,9% dos casos identificados no período entre 2013 e 2022
20 (BRASIL, 2023). Nos EUA, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, 2023a)
21 relata que esse microrganismo é responsável por cerca de 1,35 milhões de infecções
22 e 420 mortes anualmente. Com relação à União Europeia, dados apresentados pela
23 *European Food Safety Authority* (EFSA; ECDC, 2023) no ano de 2022, demonstram
24 que a salmonelose foi a segunda infecção gastrointestinal mais frequentemente
25 notificada, sendo também uma das principais causas de surtos de origem alimentar
26 nesses países. Ainda segundo a agência, os cinco principais sorovares relacionados
27 a esses casos foram: *S. Enteritidis* (6,7%), *S. Typhimurium* (13,1%), *S. Typhimurium*
28 *monofásica* (1,4,[5],12:i:-) (4,3%), *S. Infantis* (2,3 %) e *S. Derby* (0,89%).

29 A enterocolite, ou salmonelose não tifoide, é a infecção que ocorre através da
30 ingestão de alimentos ou água contaminados. Essa condição é provocada por
31 diversos sorovares e se manifesta por meio de sintomas como dores abdominais,
32 cólica, diarreia, náusea, vômito, febre moderada e fadiga. Tipicamente, a doença
33 segue um curso autolimitante, sendo que a antibioticoterapia é indicada apenas para

1 casos mais graves (MARTÍNEZ *et al.*, 2006). Complicações associadas à salmonelose
2 não tifoide incluem artrite reativa, síndrome de Reiter e espondilite anquilosante
3 (MARTINEZ *et al.*, 2023)

4 Os sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi* acometem exclusivamente os seres
5 humanos e causam Febre Tifoide e Febre Paratifoide, respectivamente. A transmissão
6 do patógeno ocorre pela via fecal-oral e ingestão de alimentos e água contaminados
7 com dejetos humanos. A sintomatologia característica da febre tifoide inclui febre alta
8 e continua (39 °C a 40 °C), cefaleia, letargia e dores abdominais. Cerca de 10% dos
9 pacientes podem desenvolver complicações graves, como encefalopatia tifoide,
10 perfuração intestinal, peritonite e choque. A febre paratifoide apresenta quadro clínico
11 semelhante, porém com sintomas mais brandos (GIBANI; BRITTO; POLLARD, 2018;
12 MARCHELLO; BIRK HOLD; CRUMP, 2020).

13 *Salmonella* sp. pode ser isolada em diferentes materiais e superfícies do
14 ambiente industrial, resultando em potencial contaminação cruzada com diversos
15 alimentos (OBE *et al.*, 2020; ASHRAFUDOULLA *et al.*, 2021). A capacidade de
16 formação de biofilme e a resistência aos sanitizantes são fatores que podem favorecer
17 a sua permanência nestes ambientes industriais (OBE; RICHARDS; SHARIAT, 2022;
18 CHAVES *et al.*, 2024).

19 2.4.2 *Listeria monocytogenes*

20 Os microrganismos do gênero *Listeria* pertencem a família Listeriaceae e se
21 caracterizam por serem bacilos Gram-positivos, anaeróbios facultativos e não
22 formadores de esporos. Apresentam flagelos peritríquios que, quando em temperatura
23 de 20 °C a 25 °C, conferem motilidade. No entanto, são imóveis ou com baixa
24 motilidade a 37 °C. Isso se deve a presença do gene de flagelina, que é altamente
25 transcrito a 22 °C, mas não a 37 °C. Possuem movimento de tombamento e
26 multiplicação característica em formato de guarda-chuva aberto. O tamanho das
27 células varia de 0,5 a 2 µm de comprimento por 0,4 a 0,5 µm de diâmetro, mas quando
28 encubados em até cinco dias, podem ser visualizados como bacilos longos de 6 a 20
29 µm (CHIARINI; PINTO, 2023).

30 O gênero *Listeria* compreende atualmente 30 espécies e 8 subespécies
31 descritas (<https://psn.dsmz.de/search?word=listeria> - acesso em 27/12/2023).
32 Embora casos raros de infecções causadas por *L. ivanovii* e *L. seeligeri* já tenham
33 sido relatados (ROCOURT *et al.*, 1989; GUILLET *et al.*, 2010), a espécie

1 epidemiologicamente mais relevante para os seres humanos é *L. monocytogenes*
2 (HOFER; REIS; HOFER, 2006). Além disso, *L. ivanovii* é reconhecida como um agente
3 patogênico em animais, capaz de desenvolver aborto em ruminantes (LOW;
4 DONACHIE, 1997), enquanto *L. innocua* pode servir como indicadora ambiental
5 potencial para a presença de *L. monocytogenes* (FRIEDLY *et al.*, 2008).

6 A sorotipagem de *L. monocytogenes* é baseada nos antígenos somáticos (O)
7 e flagelares (H), resultando 13 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c,
8 4d, 4e, 7). Embora todos tenham potencial patogênico, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b
9 são os mais envolvidos em doenças e surtos (ORSI; DEN BAKKER; WIEDMANN,
10 2011; CARTWRIGHT *et al.*, 2013).

11 A doença causada por *L. monocytogenes*, denominada listeriose, manifesta-se
12 clinicamente de duas formas: infecção não invasiva e infecção invasiva sistêmica. A
13 forma não invasiva restringe-se ao intestino, na forma de gastroenterite, podendo ser
14 assintomática ou apresentar sintomas semelhantes aos de uma gripe, incluindo
15 diarreia, vômito e febre moderada. Por outro lado, a forma invasiva ocorre
16 principalmente em indivíduos imunocomprometidos, devido à capacidade do
17 microrganismo de ultrapassar a barreira intestinal, hematoencefálica e fetoplacentária
18 do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2016).

19 Em gestantes, a invasão do feto pode resultar em aborto, parto prematuro ou
20 septicemia neonatal. Em caso de infecção durante o parto, o recém-nascido pode
21 desenvolver sintomas de meningite. Em adultos ou idosos, o acometimento do
22 sistema nervoso central pode levar a meningite, encefalite ou abscessos cerebrais.
23 Estima-se que a taxa de mortalidade associada à listeriose seja de aproximadamente
24 30% (LECUIT, 2007).

25 O CDC (CDC, 2023b) relata que mais de 1600 pessoas adoecem por listeriose
26 a cada ano nos EUA, resultando em mais de 1500 hospitalizações e 260 óbitos. Com
27 relação à União Europeia, no ano de 2022, foram descritos 2738 casos da doença,
28 com 1330 hospitalizações e 286 mortes. A listeriose ocupa a quinta posição entre as
29 zoonoses mais relatadas nesses países, representando um aumento de 15,9% nas
30 notificações em comparação com o ano de 2021 (EFSA; ECDC, 2023). Apesar de ser
31 objeto de estudos e de estar presente em isolados humanos (FREITAG *et al.*, 2021)
32 e de alimentos (IGLESIAS *et al.*, 2022), no cenário epidemiológico brasileiro, esse
33 microrganismo não figura entre os principais agentes patogênicos, muito
34 provavelmente devido à subnotificação dos casos.

1 *L. monocytogenes* é uma bactéria ubiqüitária, podendo ser encontrada em
2 diversos ambientes, como solo, vegetação, água, esgoto e fezes. Além disso, é
3 encontrada em diversos tipos de alimentos, tanto vegetais como de origem animal,
4 como: carne e produtos cárneos (ZHANG *et al.*, 2022), leite (SU *et al.*, 2023), queijos
5 (MATA *et al.*, 2022) e pescados (YÜCEL *et al.*, 2010).

6 Esse microrganismo apresenta mecanismos de tolerância as condições de
7 estresse, que permitem a sua sobrevivência em ampla faixa de temperatura (0 a 45
8 °C), inclusive em alimentos congelados; elevadas concentrações de sal (>10%);
9 alterações de pH (4,5 a 9,2); baixa atividade de água (>0,92); além da atmosfera de
10 anaerobiose, que possibilita multiplicação em alimentos embalados a vácuo
11 (BUCHANAN *et al.*, 2017).

12 Na indústria de alimentos, *L. monocytogenes* demonstra capacidade de
13 formar biofilme em diferentes tipos de materiais (MANVILLE *et al.*, 2023) e
14 desenvolver tolerância aos sanitizantes comumente utilizados nos programas de
15 higienização (AASE *et al.*, 2000; MØRETRØ *et al.*, 2017), facilitando assim sua
16 colonização, permanência e disseminação.

17

18

1 3 OBJETIVOS

2 3.1 OBJETIVO GERAL

3 Avaliar a diversidade microbiana viável em superfícies de sala de cortes de um
4 abatedouro frigorífico de aves após o processo de higienização pré-operacional.

5 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6 - Avaliar a contaminação superficial de esteiras transportadoras de alimentos
7 em sala de cortes de um frigorífico de aves através da contagem de microrganismos
8 mesófilos, psicotróficos e *Pseudomonas* spp., e pela detecção de *Listeria*
9 *monocytogenes* e *Salmonella* spp.

10

11 - Utilizar as técnicas de MALDI-TOF MS e sequenciamento 16S rRNA para a
12 avaliação da diversidade microbiana viável.

13

14 - Avaliar a capacidade de adesão dos microrganismos mesófilos identificados
15 em superfície de polipropileno.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1 4 CAPÍTULO 1: IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA EM 2 SUPERFÍCIES DE SALA DE CORTES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ- 3 OPERACIONAL EM FRIGORÍFICO DE AVES

4 As superfícies das indústrias de alimentos podem ser consideradas importantes fontes
5 de contaminação microbiana se não forem higienizadas adequadamente. Diante
6 disso, esse estudo teve como objetivo avaliar a contaminação superficial após o
7 processo de higienização pré-operacional nas superfícies da sala de cortes de um
8 frigorífico de aves. Foram realizada as contagens de microrganismos mesófilos,
9 psicrotróficos, *Pseudomonas* spp. e a detecção de *Listeria monocytogenes* e
10 *Salmonella* spp.. Adicionalmente, a diversidade microbiana viável dessas superfícies
11 foi investigada por meio das técnicas de MALDI-TOF MS e sequenciamento do gene
12 16S rRNA, e os isolados foram caracterizados quanto ao seu potencial de adesão em
13 poliestireno. Apesar da avaliação da contaminação superficial após o procedimento
14 de higienização ter revelado médias gerais inferiores ao limite de 1,0 Log UFC/cm²,
15 estabelecido por estudos anteriores, foram identificadas contagens acima desse
16 parâmetro, representando 18% das amostras de mesófilos, 30% de psicrotróficos e
17 10% de *Pseudomonas* spp. No entanto, não foi evidenciada a presença de *Salmonella*
18 spp. e *L. monocytogenes*. As contagens para cada grupo de microrganismo não
19 demonstraram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os diferentes materiais e tipos de
20 esteiras. A avaliação da diversidade microbiana pela técnica de MALDI-TOF MS
21 revelou a predominância dos gêneros *Candida* (14,21%), *Serratia* (13,7%),
22 *Staphylococcus* (12,69%), *Kocuria* (12,69%), *Aeromonas* (6,09%) e *Lelliottia* (6,09%)
23 dentre os 197 microrganismos identificados. Além disso, é importante destacar o
24 isolamento de uma bactéria patogênica, *Yersinia enterocolitica*. Em relação ao
25 sequenciamento do gene 16S rRNA, as maiores frequências relativas foram de
26 *Staphylococcus* (13,42%), *Acinetobacter* (9,05%), *Pseudomonas* (8,65%), *Serratia*
27 (5,28%) e *Aeromonas* (4,36%). Ao investigar a diversidade alfa e beta nas amostras
28 analisadas submetidas ao sequenciamento, não foram identificadas diferenças
29 estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para os diferentes materiais e tipos de
30 superfície. O emprego das duas técnicas demonstrou ser uma abordagem abrangente
31 para avaliação da diversidade microbiana viável, totalizando 43 gêneros diferentes.
32 Destes, cada técnica proporcionou a identificação de 15 gêneros exclusivos, enquanto
33 13 gêneros foram comuns a ambas. Por fim, constatou-se que 45,7% dos isolados
34 apresentava diferentes níveis de capacidade de adesão. Os resultados desse estudo
35 reforçam a importância do controle rigoroso, monitoramento constante e estratégias
36 específicas para garantir a segurança e qualidade nas instalações industriais de
37 alimentos.

38

39 Palavras-chave: MALDI-TOF; sequenciamento 16S rRNA; microrganismos
40 patogênicos; microrganismos deteriorantes; adesão.

41

42

1 4.1 INTRODUÇÃO

2 A contínua expansão e modernização da produção brasileira de carne de aves
3 não apenas destacam a sua relevância econômica, mas também evidenciam sua
4 capacidade de abastecer as demandas de um mercado cada vez mais exigente em
5 relação à qualidade e segurança dos alimentos (HÖTZEL; VANDRESEN, 2022;
6 ABPA, 2023). Como líder mundial nas exportações e um dos principais produtores de
7 carne de aves, o Brasil demonstra maturidade e assume a responsabilidade de
8 atender às exigências tanto do mercado interno quanto externo (KRABBE *et al.*, 2013).

9 A qualidade e a segurança dos alimentos estão intrinsecamente relacionadas,
10 dentre outros fatores, à presença e controle de bactérias patogênicas e indicadores
11 de higiene (RODRÍGUEZ-LÓPEZ *et al.*, 2015; MAES *et al.*, 2019). Os microrganismos
12 indicadores, como os aeróbios mesófilos e psicrotróficos, fornecem às indústrias
13 informações acerca das condições higiênico-sanitárias. (CRANDALL *et al.*, 2023). Por
14 outro lado, os microrganismos patogênicos desempenham um papel crítico em termos
15 de saúde pública, sendo responsáveis por causar doenças de origem alimentar em
16 seres humanos, comumente referidas como Doenças Veículas por Alimentos (DVA)
17 (WARMATE; ONARINDE, 2023). *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* destacam-
18 se como alguns dos principais agentes causadores de doenças e surtos em diversos
19 países ao redor do mundo (BRASIL, 2023; CDC, 2023b; EFSA; ECDC, 2023).

20 As empresas incorporam à sua gestão, como parte dos programas de
21 autocontrole, a prática da higienização industrial e operacional, também denominada
22 de Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO). Essa abordagem tem como
23 objetivo diminuir sujidades e a contaminação microbiana a níveis aceitáveis durante
24 as etapas de processamento tecnológico dos produtos obtidos na indústria. A
25 higienização pré-operacional, realizada antes do início do processamento,
26 fundamenta-se na aplicação de protocolos que envolvem limpeza e sanitização,
27 empregando agentes químicos apropriados (BRASIL, 1998, 2017a, 2017b;
28 KOTSANOPOULOS; ARVANITOYANNIS, 2017). No entanto, esses ambientes
29 podem servir como fonte de contaminação cruzada se não forem higienizados
30 adequadamente, uma vez que, durante o processamento industrial, os alimentos
31 entram em contato com diversas superfícies, equipamentos e utensílios (GIAOURIS
32 *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2014; TAGAR; QAMBRANI, 2023).

1 Os métodos rotineiramente utilizados pela equipe do controle de qualidade da
2 indústria para a avaliação da higienização normalmente não possibilitam uma
3 caracterização aprofundada da ecologia microbiana presente nas superfícies
4 industriais. Além de outros fatores, técnicas avançadas, como Espectrometria de
5 Massa de Tempo de Voo por Ionização de Dessorção a Laser Assistida por Matriz
6 (MALDI-TOF MS) e o sequenciamento do gene 16S rRNA, oferecem a capacidade de
7 explorar as comunidades microbianas encontradas nessas instalações (WAGNER *et*
8 *al.*, 2020; TADIELO *et al.*, 2023a)

9 Com base nesse contexto, este estudo teve como objetivos avaliar a
10 contaminação superficial de esteiras transportadoras de alimentos em sala de cortes
11 de um frigorífico de aves, por meio das contagens de microrganismos indicadores e
12 da pesquisa de microrganismos patogênicos, identificação da diversidade microbiana
13 viável dessas instalações utilizando as técnicas de MALDI-TOF MS e sequenciamento
14 do gene 16S rRNA e o perfil de adesão dos microrganismos identificados.

15 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

16 4.2.1 Local de coleta e amostragem

17 A pesquisa foi conduzida na sala de cortes de um abatedouro frigorífico de aves
18 localizado na região Centro-Oeste do Brasil. A empresa possui registro oficial do
19 Serviço de Inspeção Federal (SIF) e apresenta uma capacidade de abate de 204 mil
20 aves diariamente, aproximadamente. As coletas foram realizadas em 10 semanas
21 consecutivas no período de junho a agosto de 2023.

22 Ao todo, foram obtidas 50 amostras provenientes de cinco superfícies distintas
23 da sala de cortes, sendo: esteira de polipropileno modular 1 (n=10/ esteira de saída
24 do *chiller*), esteira de polipropileno modular 2 (n=10/ esteira do peito), mesa de aço
25 inoxidável lisa (n=10/ mesa da linha coxa e sobrecoxa *boneless leg* (BL)), esteira de
26 poliuretano lisa (n=10/ esteira do corte shawarma) e esteira de polipropileno modular
27 3 (n=10/ esteira do dorso para carne mecanicamente separada (CMS)). A coleta das
28 amostras foi realizada mediante fricção de *swabs* estéreis sobre uma superfície
29 delimitada com moldes estéreis de 10 x 10 cm. A técnica consistiu na aplicação de
30 movimentos giratórios, inicialmente de cima para baixo e, posteriormente, da
31 esquerda para a direita. Após essa etapa, os *swabs* foram acondicionados em 10 mL
32 de solução salina 0,85% suplementada com 0,1% de peptona e 0,5% de polissorbato

1 80 (Tween 80®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como agente neutralizante. Cada
2 amostra foi composta por 12 áreas de 100 cm² (1200 cm²), as quais foram divididas
3 em três tubos Falcon (subamostras), cada um contendo quatro *swabs*, ou seja, 400
4 cm². Destes, um foi destinado às análises de microrganismos indicadores (aeróbios
5 mesófilos, psicrotróficos e *Pseudomonas* spp.) e à diversidade microbiana por meio
6 de MALDI-TOF MS e sequenciamento 16S rRNA; outro para *L. monocytogenes*; e o
7 último para *Salmonella* spp..

8 A temperatura da sala de cortes era padronizada pela indústria em 12 °C. O
9 processo de higienização das superfícies na sala de cortes consistiu em uma pré-
10 lavagem, seguida por lavagem com detergente semi pastoso neutro e detergente
11 líquido alcalino clorado, enxágue e, por último, sanitização com ácido peracético 0,1%.

12 As amostras coletadas foram devidamente acondicionadas em caixas
13 isotérmicas contendo gelo e foram processadas imediatamente após a chegada ao
14 Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA) da
15 Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

16 4.2.2 Contagem de microrganismos indicadores

17 Em cada coleta, o tubo Falcon destinado a contagem de microrganismos
18 indicadores (quatro *swabs*= 400 cm²) foi submetido a agitação em vórtex por
19 aproximadamente 2 min, visando à extração das células bacterianas que ficaram
20 aderidas aos *swabs*. Em seguida, foram realizadas quatro diluições seriadas em
21 solução salina 0,85%.

22 A quantificação de aeróbios mesófilos foi realizada conforme a metodologia
23 estabelecida pela norma ISO 4833-1 (ISO, 2013). Para a análise, 1 mL de cada
24 diluição foi inoculada por profundidade em placas de Petri contendo Ágar Padrão para
25 Contagem (PCA, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Após solidificação, as
26 placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 48 ± 2 h.

27 Para análise de bactérias psicrotróficas, foi empregada a metodologia ISO
28 17410 (ISO, 2001). Neste método, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL das diluições
29 e inoculadas por superfície em placas de Petri contendo Ágar PCA (Kasvi, São José
30 dos Pinhais, Paraná, Brasil). Os inóculos foram homogeneizados com auxílio de alça
31 de Drigalski, e as placas incubadas a 7 °C por 10 dias.

32 Para a quantificação de *Pseudomonas* spp. a metodologia ISO 13720 (ISO,
33 2010) foi utilizada para a análise. Foram retiradas alíquotas de 0,1 mL das diluições e

1 inoculadas por superfície em placas de Petri contendo Ágar Cetrimide (Kasvi, São
2 José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Os inóculos foram homogeneizados com auxílio de
3 alça de Drigalski, e as placas foram incubadas a 25 °C por 48 ± 2 h. Por fim, as
4 colônias características foram submetidas ao teste de oxidase, repicadas em Ágar
5 Tríplice Açúcar Ferro (TSI, Biokar, Allonne, França) e confirmadas por PCR.

6 Ao término dos períodos de incubação, todas as placas foram submetidas à
7 contagem. Os resultados para cada microrganismo foram expressos em Log
8 UFC/cm².

9 4.2.3 Confirmação de *Pseudomonas* spp. por PCR

10 A extração de DNA dos isolados foi realizada de acordo com o protocolo
11 proposto por Bierhals *et al.* (2020), com modificações. Inicialmente, os isolados
12 suspeitos foram reativados em Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI, Oxoid Ltd.,
13 Basingstoke, Inglaterra) e incubados a 36 °C durante 24 h. Em seguida, 400 µL de
14 cada cultura em BHI foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a
15 4500 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* formado foi lavado
16 em 500 µL de *Tris*- EDTA 1x (TE 1X) e centrifugado por 4500 rpm durante 10 min,
17 com subsequente descarte do sobrenadante. Este procedimento foi repetido por mais
18 uma vez. O *pellet* foi ressuspendido em 200 µL de TE 1X e incubado em banho seco
19 a 100 °C durante 10 min. Finalmente, o material foi centrifugado a 4500 rpm por 5 min
20 e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 1,5 mL. O DNA extraído foi
21 armazenado a -20 °C.

22 A PCR foi preparada em reações contendo volume final de 25 µL (12,5 µL de
23 Taq DNA Polimerase (Celco®), 5,5 µL de água ultrapura livre de nucleases
24 (Promega®), 5 µL de DNA, 1 µL de *primer 16S rRNA forward*
25 (GGCTCAACCTGGGAACTGCA) e 1 µL *primer 16S rRNA reverse*
26 (CAGTATCAGTCCAGGTGGTCGC), ambos na concentração de 10 pmol). O
27 tamanho no amplicon foi de 137 pares de base. Como controle positivo foi utilizado
28 *P. aeruginosa* ATCC 27853 e, para controle negativo, foi utilizado água ultrapura livre
29 de nucleases (Promega®).

1 4.2.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

2 A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada de acordo com a metodologia ISO
3 6579 (ISO, 2017a), com modificações. Em cada coleta, o tubo Falcon atribuído a essa
4 análise (quatro *swabs*= 400 cm²) foi submetido a agitação em vórtex por
5 aproximadamente 2 minutos, visando à extração das células bacterianas que ficaram
6 aderidas aos *swabs*. Primeiramente, as amostras foram pré-enriquecidas com 40 mL
7 de Água Peptonada Tamponada (APT, Biokar, Allonne, França) e incubadas a 37 ± 1
8 °C durante 18 ± 2 h. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para o Caldo
9 Rappaport – Vassilidis Soja (RVS, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e 1 mL para
10 Caldo Muller-Kauffmann Tetracionato Novobiocina (MKTTn, Merck KGaA, Darmstadt,
11 Alemanha), sendo incubados a 41,5 ± 1 °C durante 24 ± 3 h e 37 ± 1 °C durante 24 ±
12 3 h, respectivamente. Após isso, uma alíquota de cada caldo foi inoculada nos ágar
13 Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Biokar, Allonne, França) e Bismuto Sulfito (BS,
14 Neogen®, Lansing, Michigan, EUA), que foram incubados a 37 ± 1 °C por 24 ± 3 h. As
15 colônias características foram submetidas aos testes bioquímicos (fermentação de
16 açúcares, lisina, produção de H₂S, citrato, malonato, ureia, vermelho de metila, Voges-
17 Proskauer, motilidade e produção de indol). Por fim, os resultados foram expressos
18 em ausência ou presença de *Salmonella* spp. em 400 cm².

19 4.2.5 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

20 A pesquisa de *L. monocytogenes* seguiu metodologia ISO 11.290-1 (ISO,
21 2017b), com modificações. Em cada coleta, o tubo Falcon designado para a análise
22 (quatro *swabs*= 400 cm²) foi submetido a agitação em vórtex por aproximadamente 2
23 min, visando à extração das células bacterianas que ficaram aderidas aos *swabs*. As
24 amostras foram hidratadas com 40 mL de Caldo de Enriquecimento de *Listeria* (LEB,
25 Difco™) e incubadas a 30 ± 1 °C por 24 h. A seguir, uma alíquota de 0,1 mL foi
26 transferida para o caldo Fraser (Difco™) e incubado a 37 ± 1 °C durante 24 a 48 h.
27 Dos tubos com multiplicação característica, ou seja, caldo escurecido em razão da
28 hidrólise da esculina, foi transferida uma alíquota para Ágar *Listeria* Oxford (OXA,
29 Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e incubados a 37 °C ± 1 °C durante 48 h. As
30 colônias características foram purificadas em Ágar Triptona de Soja suplementado
31 com 0,6% de Extrato de Levedura (TSA-YE, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná,
32 Brasil) e, posteriormente, submetidas a identificação e confirmação bioquímica

1 (catalase, motilidade, β -hemólise, fermentação de manitol, xilose, dextrose e
2 ramnose). Finalmente, os resultados foram expressos em presença ou ausência de *L.*
3 *monocytogenes* em 400 cm².

4 4.2.6 Caracterização da diversidade microbiana por MALDI-TOF MS

5 4.2.6.1 Seleção das colônias

6 Após a contagem das placas com microrganismos aeróbios mesófilos, foram
7 selecionadas aleatoriamente 10% das colônias para identificação usando a técnica
8 MALDI-TOF MS. As colônias que estavam localizadas na superfície do ágar foram
9 transferidas para tubos contendo caldo BHI (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra). Da
10 mesma maneira, as colônias situadas no interior do ágar também foram transferidas
11 para tubos de caldo BHI, sendo necessário realizar o recorte do ágar. Os tubos foram
12 incubados a 37 °C \pm 1 °C durante 24 h. Após isso, os isolados eram transferidos para
13 microtubos tipo eppendorf com Ágar TSA (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná,
14 Brasil) e Caldo Triptona de Soja (TSB, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil)
15 suplementado com glicerol, para armazenamento e uso futuro.

16 4.2.6.2 Realização da técnica

17 A análise de MALDI-TOF MS foi realizada no Laboratório de Pesquisa em
18 Qualidade do Leite (Qualileite), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
19 Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga.

20 Os microrganismos foram cultivados em caldo BHI e incubados a 37 °C \pm 1
21 °C durante 24 h. Após o período de incubação, os isolados bacterianos foram
22 inoculados em placas de Petri contendo Ágar TSA e incubados novamente a 37 °C \pm
23 1 °C durante 24 h, para obtenção de colônias isoladas. A extração de proteínas
24 ribossômicas seguiu o protocolo descrito por Barcelos *et al.*, (2019), onde cada colônia
25 foi transferida em triplicata para uma placa alvo de aço polido MSP 96 (Bruker
26 Daltonik) utilizando uma haste de madeira. Em seguida, aplicou-se 1,0 μ L de ácido
27 fórmico a 70%, seguido de secagem à temperatura ambiente. Posteriormente,
28 adicionou-se 1,0 μ L de solução matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico diluído em
29 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético), seguido por nova secagem em
30 temperatura ambiente. Para leitura das placas foram utilizadas as instruções de

1 identificação de extração de proteínas (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), e os
2 espectros analisados no Biotyper 3.0.

3 A calibração do MALDI-TOF MS foi realizada utilizando uma solução padrão
4 de proteína, Bacterial Test Standard (BTS, Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), e a
5 análise de espectrometria de massa foi executada com o instrumento Microflex
6 Bruker. A aquisição de dados foi realizada por meio do *software* FlexControl 3.3
7 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). Foram realizados 240 disparos de laser para
8 cada espectro, sendo coletados na faixa de massa entre 2.000 a 20.000 Da, e então
9 comparados com dados da biblioteca de referência MALDI Biotyper (MBT) (Bruker
10 Daltonik, Bremen, Alemanha). Os extratos proteicos originaram conjuntos de picos
11 proteicos, os quais foram confrontados com a biblioteca de referência do *software*
12 MBT 4.1.7. Por fim, os resultados entre $\geq 1,7$ e $< 2,0$ foram julgados confiáveis apenas
13 para gênero, enquanto $\geq 2,0$ foram consideradas confiáveis para identificação de
14 gênero e espécie.

15 4.2.7 Caracterização da diversidade microbiana pelo sequenciamento do gene 16S 16 rRNA

17 4.2.7.1 Obtenção das amostras

18 A obtenção das amostras de microrganismos mesófilos viáveis para o
19 sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizada por meio da inoculação de 0,1 ml
20 por semeadura *pour plate* da mesma subamostra destinada a análise de
21 microrganismos indicadores, conforme descrito no item 4.4.2. Essa inoculação foi
22 realizada sobre uma placa de Petri contendo ágar PCA (Kasvi, São José dos Pinhais,
23 Paraná, Brasil). Após incubação a 36 ± 1 °C por 24 ± 2 h, o crescimento em placa foi
24 colhido através da adição de 3 mL de solução salina sobre as culturas, que por sua
25 vez foram removidas do ágar através de raspagem leve com auxílio de pipeta com
26 ponteira estéril e homogeneização. Posteriormente, o caldo com os microrganismos
27 foi transferido para tubos do tipo Eppendorf de 5 mL, sendo posteriormente congelado
28 a -20 °C.

29 4.2.7.2 Realização da técnica

30 A análise de sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizada no Instituto de
31 Biotecnologia (IBTEC), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de

1 Botucatu. A extração do material genético foi conduzida por meio do kit comercial
2 MagMAX CORE *Nucleic Acid Purification Kit* (Applied Biosystems™). Posteriormente,
3 as amostras extraídas passaram por análise de pureza utilizando o equipamento
4 NanoDrop® ND – 1000 UV-Vis (Thermo Fisher). A quantificação dos materiais
5 extraídos foi realizada por meio do fluorômetro Invitrogen Qubit 2.0 (Thermo Fisher)
6 empregando o kit Qubit® 1X dsDNA HS (*High Sensitivity*) (Thermo Fisher). Esses
7 procedimentos garantiram a obtenção de amostras de alta qualidade e aferiram a
8 concentração precisa do material genético para análises subsequentes.

9 Para a identificação através do sequenciamento, foram utilizadas as regiões V3
10 e V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento foi conduzido no equipamento MiSeq
11 (Illumina Inc., EUA), empregando o kit V3 de 600 ciclos. O preparo das bibliotecas
12 consistiu na amplificação dos primers para a região V3-V4 do gene 16S rRNA (5'-
13 TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3';
14 5'TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC
15 C-3'; segundo Klindworth *et al.*, 2013). As etapas de preparo seguiram as instruções
16 do protocolo de *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* proposto pela
17 Illumina (Illumina Inc., EUA).

18 Depois de realizar o sequenciamento, as análises de bioinformática foram
19 conduzidas utilizando o software QIIME2 para processar as sequências (BOLYEN *et*
20 *al.*, 2019). O programa DEBLUR (AMIR *et al.*, 2017) foi empregado para remover
21 *reads* de qualidade inferior e categorizar as leituras em *features*. Para alinhamento e
22 análise filogenética entre as *features* foram utilizados os *softwares* MAFFT (*Multiple*
23 *Alignment using Fast Fourier Transform*; ROZEWICKI *et al.*, 2019) e FastTree (PRICE;
24 DEHAL; ARKIN, 2010). As *features* foram classificadas taxonomicamente utilizando o
25 banco de dados SILVA (QUAST *et al.*, 2013)

26 4.2.8 Determinação da capacidade de adesão dos microrganismos

27 A avaliação da capacidade de adesão foi realizada para todos os
28 microrganismos identificados na análise de MALDI-TOF MS. Os ensaios foram
29 realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços (Nest®, Kasvi, São José dos
30 Pinhais, Paraná, Brazil), de acordo com a metodologia descrita por Stepanović *et al.*
31 (2000).

32 Cada isolado foi inoculado em 3 mL de caldo TSB e incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$
33 durante 24h. Posteriormente, os caldos foram ajustados para uma densidade óptica

1 de 0,5 na escala de McFarland, e alíquotas de 200 µL foram transferidas em triplicata
2 para uma microplaca de 96 poços, sendo incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. Como
3 controle negativo, três poços foram preenchidos somente com caldo TSB não
4 inoculado. Após a incubação, os poços foram submetidos a três lavagens com 250 µL
5 por poço de solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,2). As células
6 aderidas foram fixadas com 200 µL de metanol a 99% por 15 minutos e secas à
7 temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram corados com 200 µL de violeta
8 de cristal 1% por 15 min. O corante foi removido em três etapas de lavagem com água
9 destilada, e as placas foram mantidas à temperatura ambiente até secarem. Por fim,
10 para leitura, foram adicionados 160 µL de ácido acético glacial 33% (v/v), e a
11 absorvância foi avaliada em leitora de microplacas a 450 nm.

12 Os resultados de adesão foram obtidos e classificados de acordo com
13 Stepanović *et al.* (2000), sendo a avaliação média dos resultados de absorvância de
14 cada amostra (DOa) comparada com a média da absorvância dos controles negativos
15 acrescido de três vezes o desvio padrão (DOcn). O grau de adesão foi determinado
16 de acordo com a seguinte classificação: não aderente ($\text{DOa} \leq \text{DOcn}$), fracamente
17 aderente ($\text{DOcn} < \text{DOa} \leq 2.\text{DOcn}$), moderadamente aderente ($2.\text{DOcn} < \text{DOa} \leq$
18 $4.\text{DOcn}$) e fortemente aderente ($4.\text{DOcn} < \text{DOa}$). Os testes foram realizados em duas
19 repetições e os resultados expressos em média.

20 4.2.9 Análise estatística

21 As contagens obtidas para aeróbios mesófilos, psicrotróficos e *Pseudomonas*
22 spp. foram expressos em Log UFC/cm². A partir disso, utilizou-se PROC FREQ (SAS
23 Institute, Cary, NC, EUA) para fazer a conferência dos dados e PROC MEANS (SAS
24 Institute, Cary, NC, EUA) para obter estatísticas descritivas, como média, desvio
25 padrão, mediana e percentis. A distribuição dos dados foi analisada através de PROC
26 UNIVARIATE (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Observado que os dados não seguiam
27 distribuição normal, optou-se pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon (SAS Institute,
28 Cary, NC, EUA) para avaliar a eficácia da higienização para cada microrganismo nos
29 diferentes materiais e tipos de esteiras analisadas. $P < 0,05$ foi considerado
30 estatisticamente significativo.

31 As métricas de diversidade alfa e beta foram obtidas por diferentes métodos e
32 inferências estatísticas, sendo alfa diversidade (*Shannon's diversity index*, *Observed*
33 *Features*, *Faith's Phylogenetic Diversity* e *Evenness*) e para beta diversidade (*Jaccard*

1 *distance*, *Bray-Curtis distance*, *unweighted UniFrac distance*, e *weighted UniFrac*
 2 *distance*) as quais foram comparadas entre os grupos amostrais utilizando testes não
 3 paramétricos. Diferenças nas abundâncias relativas de táxons foram avaliadas com o
 4 ANCOM (MANDAL *et al.*, 2015).

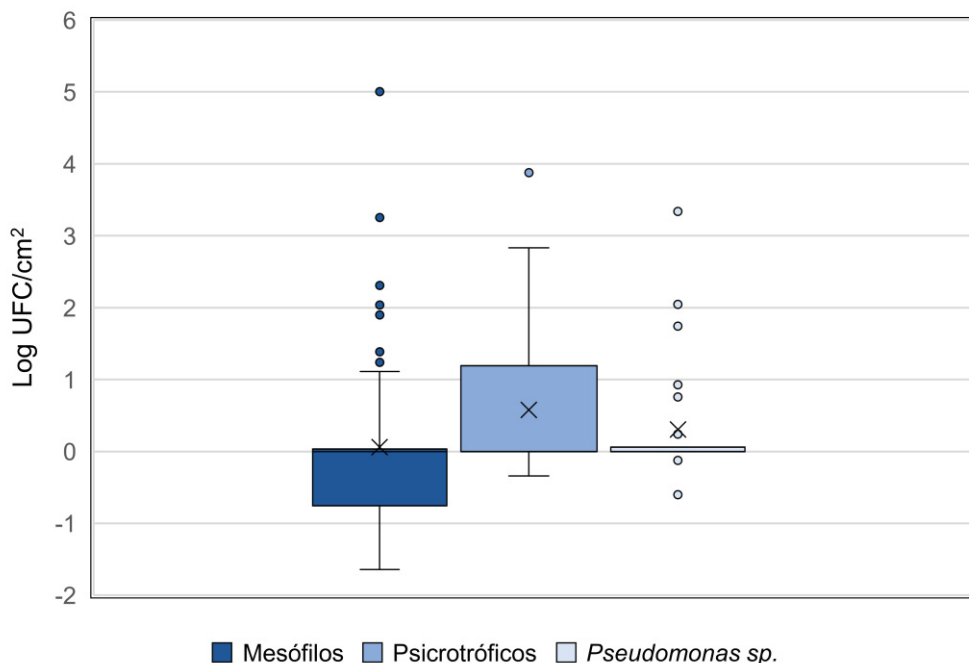
5 4.3 RESULTADOS

6 4.3.1 Contagem de microrganismos indicadores de higiene

7 As contagens bacterianas foram superiores a 1,0 Log UFC/cm² em nove das
 8 50 amostras de superfícies coletadas para mesófilos (média de 0.06 ± 1.25 Log
 9 UFC/cm²), em 15/50 para psicrotróficos (média de 0.58 ± 0.91 Log UFC/cm²) e em
 10 5/50 para *Pseudomonas* spp. (média de 0.31 ± 0.73 Log UFC/cm²) (FIGURA 2).

11

12 FIGURA 2- DISTRIBUIÇÃO DAS CONTAGENS DE MESÓFILOS, PSICROTRÓFICOS E
 13 *Pseudomonas* sp. NA SALA DE CORTES DO ABATEDOURO DE AVES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-
 14 OPERACIONAL (Log UFC/cm²).



15

16 Avaliando as contagens de cada grupo de microrganismo após a higienização
 17 pré-operacional, observou-se que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os
 18 diferentes materiais e tipos de esteiras. A média das contagens e desvio padrão para
 19 ambas as categorias são descritas na Tabela 1.

20

21

TABELA 1- MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS CONTAGENS (Log UFC/cm²) PARA CADA GRUPO DE MICROORGANISMO EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES MATERIAIS E TIPOS DE ESTEIRA

	Mesófilos	Psicrotróficos	<i>Pseudomonas spp.</i>
Material			
Aço inoxidável	-0.22 ± 0.61a	0.34 ± 0.75a	0.24 ± 0.76a
Poliuretano	0.62 ± 2.10a	0.90 ± 1.34a	0.63 ± 1.63a
Polipropileno	-0.03 ± 1.01a	0.50 ± 0.75a	0.22 ± 0.51a
Tipo de esteira			
Lisa	0.20 ± 1.57a	0.62 ± 1.10a	0.44 ± 0.98a
Modular	-0.03 ± 1.01a	0.50 ± 0.75a	0.22 ± 0.51a

1

2 4.3.2 Detecção de *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes*

3 Ao longo das coletas não foi detectada a presença de *Salmonella spp.* e *L.*
4 *monocytogenes* em nenhuma das superfícies avaliadas da sala de cortes do
5 abatedouro frigorífico de aves. No entanto, cabe destacar que em uma coleta, sexta
6 coleta, em esteira de poliuretano lisa foi confirmado a presença de *L. innocua*.

7

8 4.3.3 Diversidade microbiana pela técnica de MALDI-TOF MS

9 De 50 amostras coletadas em cada um dos cinco pontos de coleta, um total de
10 439 isolados foram obtidos a partir das superfícies após a higienização da sala de
11 cortes de um abatedouro frigorífico de aves, como segue: esteira de polipropileno
12 modular 1 (64), esteira de polipropileno modular 2 (80), mesa de aço inoxidável lisa
13 (77), esteira de poliuretano lisa (106) e esteira de polipropileno modular 3 (112) (Tabela
14 2).

15

16

17

18

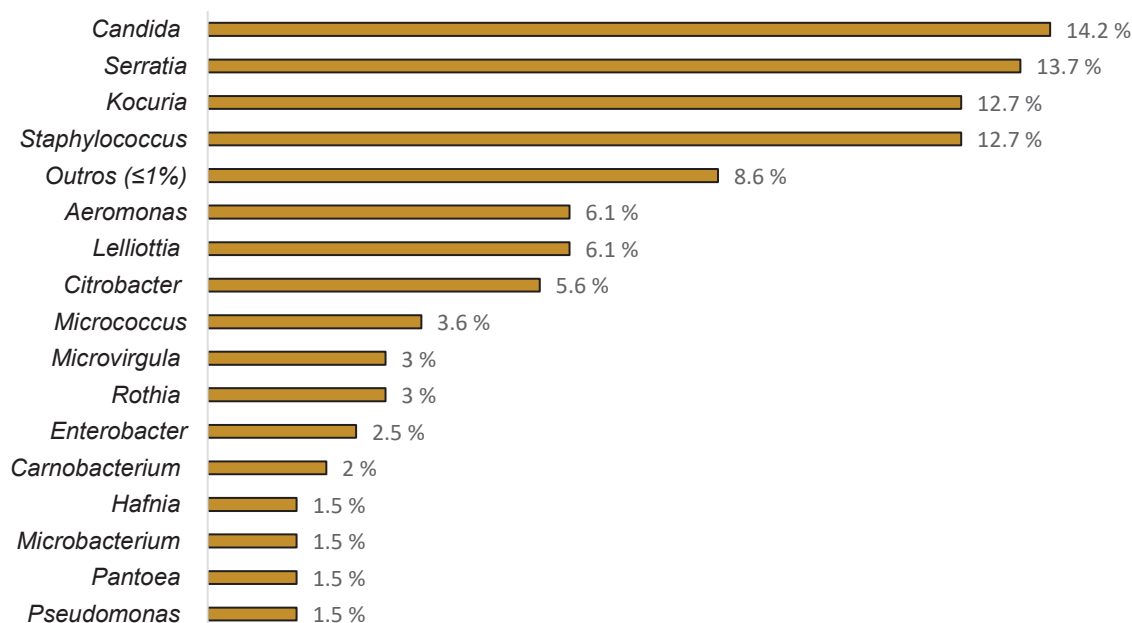
TABELA 2- PONTOS DE COLETA, NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS, NÚMERO DE ISOLADOS OBTIDOS E NÚMERO DE ISOLADOS SUBMETIDOS À ANÁLISE DE MALDI-TOF MS

Pontos de coleta	Nº amostras com crescimento	Nº isolados obtidos	Submetidos a MALDI-TOF MS
Esteira de polipropileno modular 1	4/10	64	32
Esteira de polipropileno modular 2	8/10	80	40
Mesa de aço inoxidável lisa	7/10	77	34
Esteira de poliuretano lisa	7/10	106	57
Esteira de polipropileno modular 3	6/10	112	56
Total	32/50	439	219

1
2 De um total de 219 isolados analisados por meio da técnica de MALDI-TOF
3 MS, 197 (89,95%) foram identificados, enquanto 22 (10,05%) não obtiveram resultado.
4 No contexto da sala de cortes como um todo, a análise resultou em 28 gêneros
5 (FIGURA 3), com predominância de *Candida* (14,2%), *Serratia* (13,7%),
6 *Staphylococcus* (12,7%), *Kocuria* (12,7%), *Aeromonas* (6,1%) e *Lelliottia* (6,1%).
7 Destas, foram detectadas 45 espécies (FIGURA 4), com predomínio de *Candida*
8 *parapsilosis* (14,4%), *Serratia liquefaciens* (12,8%), *Kocuria rhizophila* (12,8%),
9 *Lelliottia amnigena* (6,15%), *Staphylococcus epidermidis* (5,64%) e *Aeromonas*
10 *veronni* (5,13%).

11

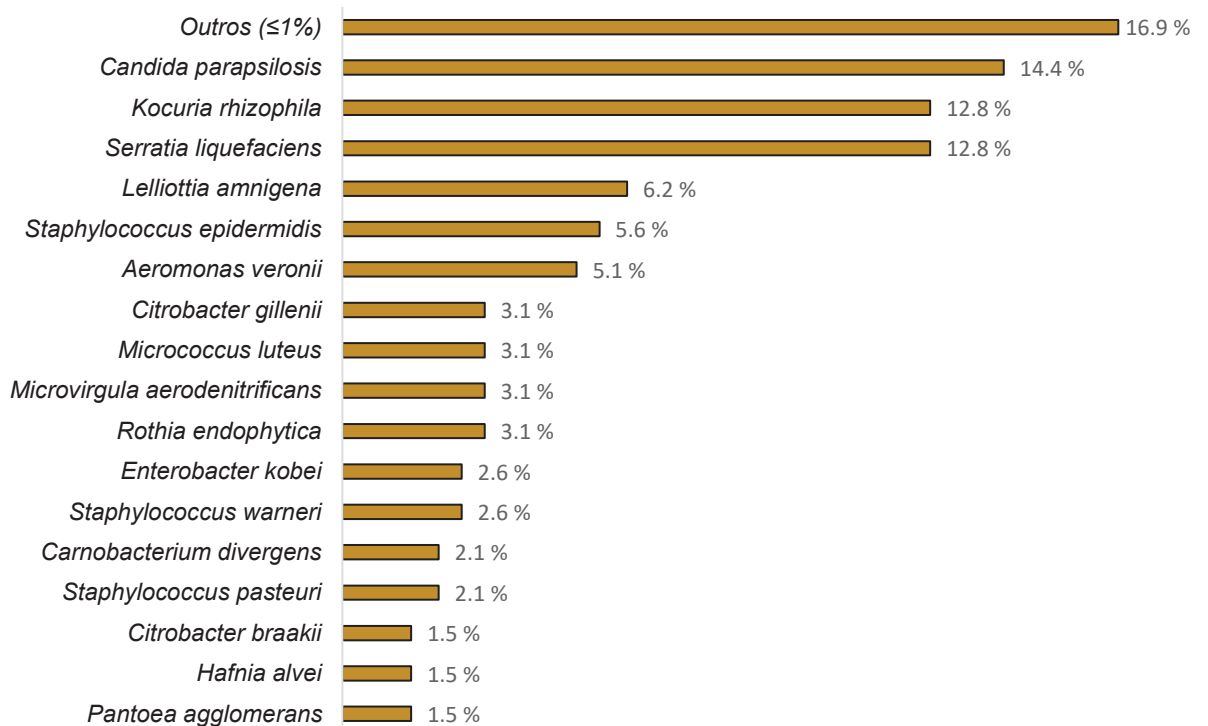
12 FIGURA 3- GÊNEROS E PORCENTAGENS CORRESPONDENTES DE ISOLADOS IDENTIFICADOS
13 PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS



14

15 NOTA: gêneros com porcentagem igual ou inferior a 1% foram agrupados como "outros".

1 FIGURA 4- ESPÉCIES E PORCENTAGENS CORRESPONDENTES DE ISOLADOS IDENTIFICADOS
 2 PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS



3

4 NOTA: espécies com porcentagem igual ou inferior a 1% foram agrupados como “outros”.

5

6 Os resultados de distribuição relativa para cada superfície são demonstrados
 7 nas Figuras 5 e 6, as quais ilustram os gêneros e espécies identificados,
 8 respectivamente. Dos 32 isolados submetidos à identificação por MALDI-TOF MS da
 9 esteira de polipropileno modular 1, foram identificados 11 gêneros distintos. Os
 10 gêneros mais frequentes nesse ponto foram: *Staphylococcus* (23,3%), *Rothia* (20%),
 11 *Carnobacterium* (13,3%) e *Lelliottia* (13,3%). Em relação às espécies, foram
 12 encontradas 13 diferentes, com destaque para *Rothia endophytica* (20%),
 13 *Carnobacterium divergens* (13,3%) e *Lelliottia amnigena* (13,3%).

14 Na esteira de polipropileno modular 2 foram identificados 7 gêneros distintos
 15 dentre os 40 isolados analisados. Desses, *Candida* (36,4%), *Staphylococcus* (27,27%)
 16 e *Serratia* (21,2%) foram os predominantes. Além disso, 11 espécies foram obtidas,
 17 sendo *Candida parapsilosis* (36,4%), *Serratia liquefaciens* (27,3%) e *Staphylococcus*
 18 *epidermidis* as dominantes (12,1%).

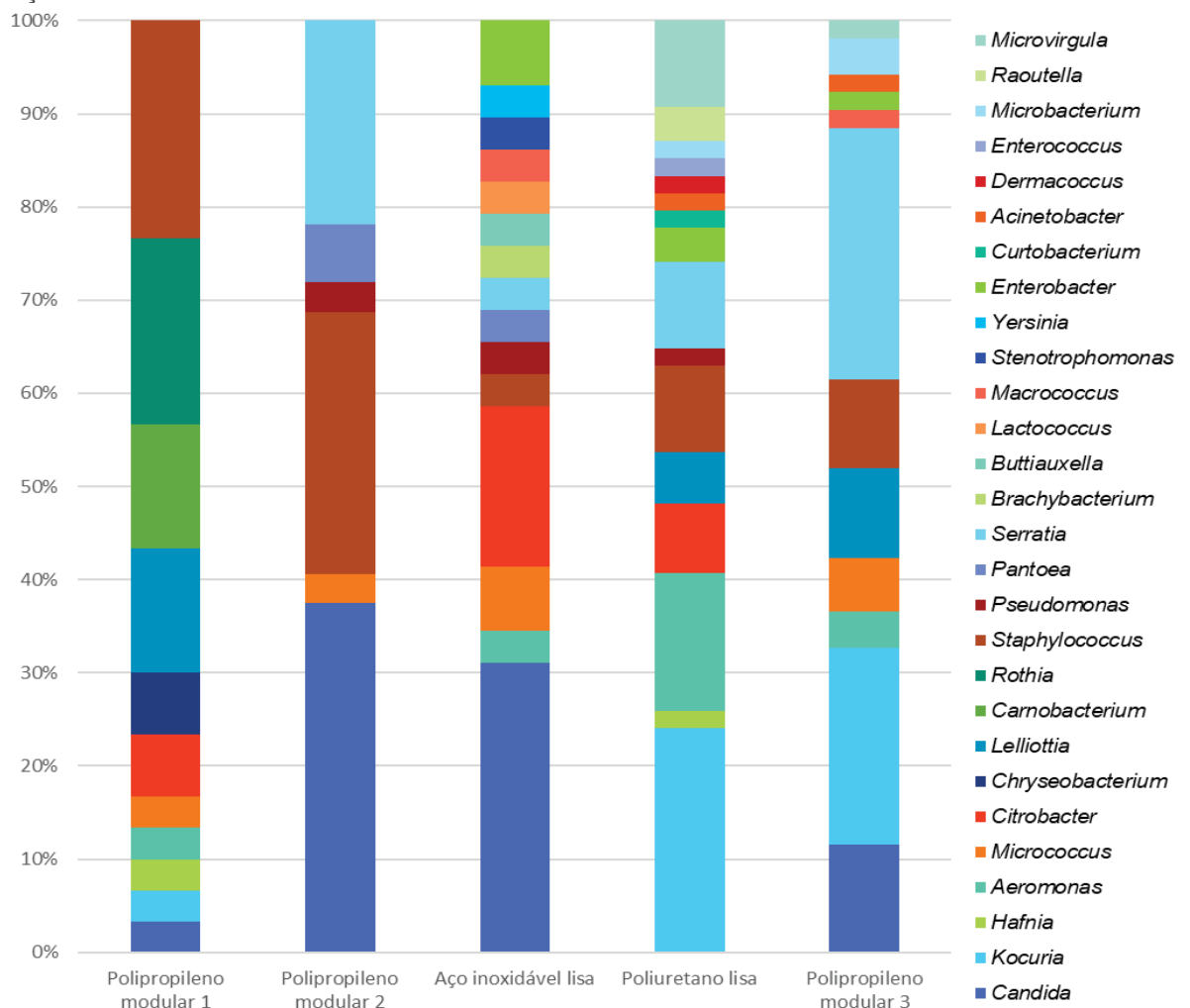
19 Na mesa de aço inoxidável lisa foram identificados 15 gêneros diferentes entre
 20 os 34 isolados submetidos à análise, com destaque para *Candida* (31%), *Citrobacter*
 21 (17,2%), *Micrococcus* (6,9%) e *Enterobacter* (6,9%). Nessa superfície foram
 encontradas 16 espécies, das quais *Candida parapsilosis* (31%), *Citrobacter braakii*

1 (10,3%), *Citrobacter gillenii* (6,9%), *Enterobacter kobei* (6,9%) e *Micrococcus luteus*
2 (6,9%) estavam em maior número.

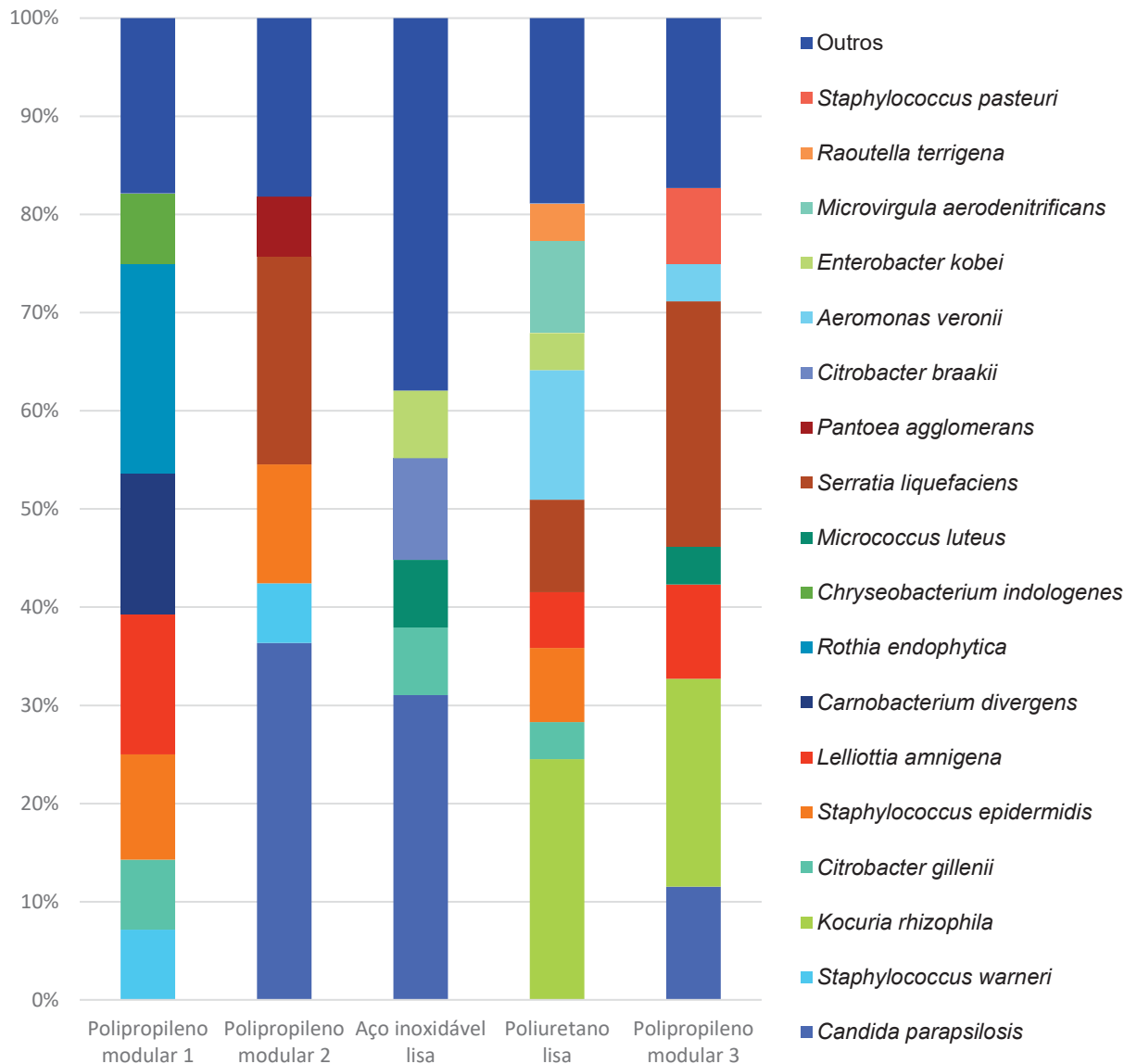
3 Na esteira de poliuretano lisa foram identificados 16 gêneros dentre os 57
4 isolados analisados, destacando-se *Kocuria* (24%), *Aeromonas* (14,8%), *Serratia*
5 (9,3%), *Microvirgula* (9,3%) e *Staphylococcus* (9,3%). Adicionalmente, identificaram-
6 se 19 espécies, com destaque para *Kocuria rhizophila* (24%), *Aeromonas veronni*
7 (14,8%), *Serratia liquefaciens* (9,3%) e *Microvirgula aerodentrificans* (9,4%).

8 Na esteira de polipropileno modular 3, foram identificados 12 gêneros dentre os
9 56 isolados analisados, com maior ocorrência de *Serratia* (26,9%), *Kocuria* (21,2%) e
10 *Candida* (11,5%). Em relação às 16 espécies encontradas nesse ponto, as mais
11 comuns foram *Serratia liquefaciens* (26,9%), *Kocuria rhizophila* (21,2%) e *Candida*
12 *parapsilosis* (11,5%).

13 FIGURA 5- FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DE MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS
14 PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS NA SALA DE CORTES DO ABATEDOURO DE AVES APÓS
15 HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL



1 FIGURA 6- FREQUÊNCIA RELATIVA DAS ESPÉCIES DE MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS
 2 PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS NA SALA DE CORTES DO ABATEDOURO DE AVES APÓS
 3 HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL



4

5 NOTA: espécies que tiveram apenas um isolado por superfície foram agrupados como "outros".

6 4.3.4 Caracterização da diversidade microbiana pelo sequenciamento do gene 16S 7 rRNA

8 De 50 amostras coletadas, 30 apresentaram crescimento em placa, porém sete
 9 delas foram descartadas por não apresentarem DNA suficiente para o
 10 sequenciamento, restando as demais 23 para a avaliação da diversidade microbiana
 11 (Tabela 3).

12

TABELA 3- PONTOS DE COLETA, NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS E NÚMERO AMOSTRAS SEQUENCIADAS

Pontos de coleta	Nº amostras com crescimentos	Nº amostras sequenciadas
Esteira de polipropileno modular 1	4	3
Esteira de polipropileno modular 2	7	6
Mesa de aço inoxidável lisa	6	3
Esteira de poliuretano lisa	7	7
Esteira de polipropileno modular 3	6	4
Total	30	23

1

2 Ao se investigar a diversidade alfa e beta nas amostras analisadas, pelas
3 métricas *Shannon's diversity index*, *Observed Features*, *Faith's Phylogenetic Diversity*
4 e *Evenness*, *Jaccard distance*, *Bray-Curtis distance*, *unweighted UniFrac distance*, e
5 *weighted UniFrac distance*, não foram identificadas diferenças estatisticamente
6 significativas ($p < 0,05$) para os diferentes materiais e tipos de esteira. Apesar disso,
7 a avaliação descritiva dos dados permitiu observar que pelo sequenciamento resultou
8 um total de 26 famílias diferentes (FIGURA 7) para todos os pontos da sala de cortes,
9 com maior frequência relativa para Microbacteriaceae (14%), Staphylococcaceae
10 (13,5%), Moraxellaceae (12,3%), Pseudomonadaceae (8,7%) e Enterobacteriaceae
11 (7,4%). Além disso, 28 gêneros foram identificados (FIGURA 8), com destaque para
12 *Staphylococcus* (13,4%), *Acinetobacter* (9,1%), *Pseudomonas* (8,7%), *Serratia* (5,3%)
13 e *Aeromonas* (4,4%).

14 Quando avaliada separadamente, na esteira de polipropileno modular 1 foram
15 identificadas sete famílias, dentre as quais Staphylococcaceae (33,9%),
16 Moraxellaceae (20,6%) e Weeksellaceae (13,3%) foram as de maior frequência
17 relativa. Em relação aos gêneros, *Staphylococcus* (33,9%), *Acinetobacter* (20,6%) e
18 *Chryseobacterium* (13,3%) foram os principais.

19 Na esteira de polipropileno modular 2 foi revelada a ocorrência de 10 famílias,
20 com destaque para Microbacteriaceae (22,7%), Staphylococcaceae (16,7%) e
21 Moraxellaceae (14,4%). Entre os gêneros, *Staphylococcus* (16,7%), *Acinetobacter*
22 (13,7%) e *Sphingomonas* (10,5%) foram os mais frequentes.

FIGURA 7- FREQUÊNCIA RELATIVA DAS FAMÍLIAS DE MICRORGANISMOS DA SALA DE CORTES DE AVES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL

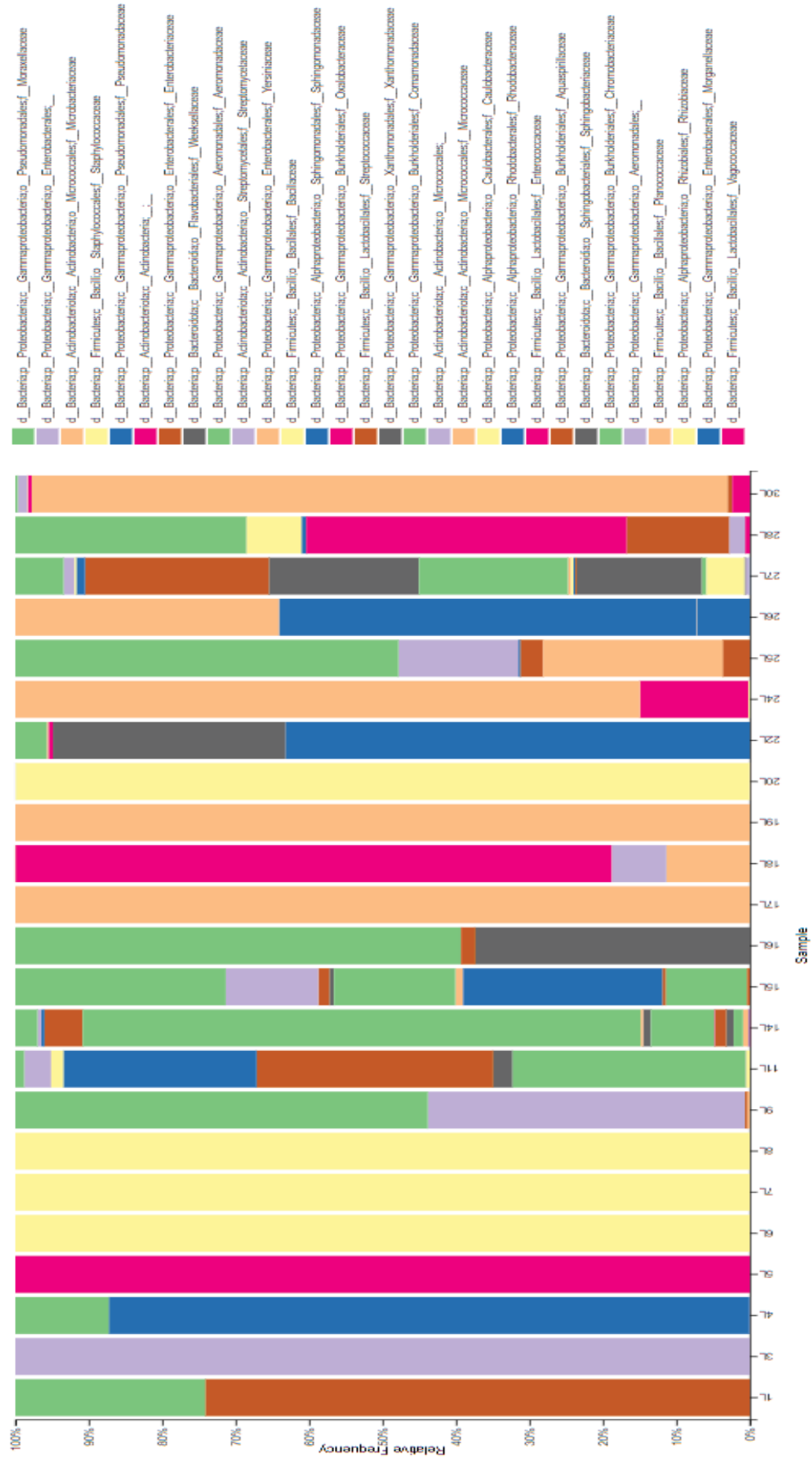


FIGURA 8- FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DE MICRORGANISMOS DA SALA DE ABATEDOURO DE AVES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL



1 Na mesa de aço inoxidável lisa foram identificadas 18 famílias no total, sendo
2 Streptomycetaceae (33,3%), Oxalobacteriaceae (27,1%) e Enterobacteriaceae (8,4%)
3 as mais abundantes. *Streptomyces* (33,3%), *Massilia* (7,3%) e *Aeromonas* (6,8%)
4 foram os gêneros mais frequentes entre os 18 identificados nesse ponto.

5 Na esteira de poliuretano lisa, Microbacteriaceae (26,4%), Pseudomonadaceae
6 (16,3%) e Staphylococcaceae (15,4%) evidenciaram-se como as famílias com maior
7 frequência relativa entre as 19 identificadas. No que diz respeito aos 18 gêneros
8 presentes nesse ponto, *Pseudomonas* (16,3%), *Staphylococcus* (15,3%) e *Serratia*
9 (13,6%) se destacaram como os mais frequentes.

10 Por fim, na esteira de polipropileno modular 3 foram identificadas 12 famílias,
11 com maior abundância para Bacillaceae (25%), Moraxellaceae (20,2%) e
12 Sphingomonadaceae (6,8%). Quanto aos gêneros, um total de 12 foi observado,
13 sobressaindo-se especialmente *Bacillus* (25%), *Acinetobacter* (15%) e *Serratia*
14 (6,4%).

15 4.3.5 Semelhanças das técnicas para identificação da diversidade microbiana a nível 16 de gênero

17 A avaliação da diversidade microbiana através das duas técnicas revelou um
18 total de 43 gêneros microbianos diferentes. Destes, 13 gêneros foram identificados por
19 ambas as técnicas, 15 foram exclusivos da técnica de sequenciamento 16S rRNA,
20 enquanto outros 15 foram exclusivos da técnica de MALDI-TOF MS (FIGURA 9).

21

22

23

24

25

26

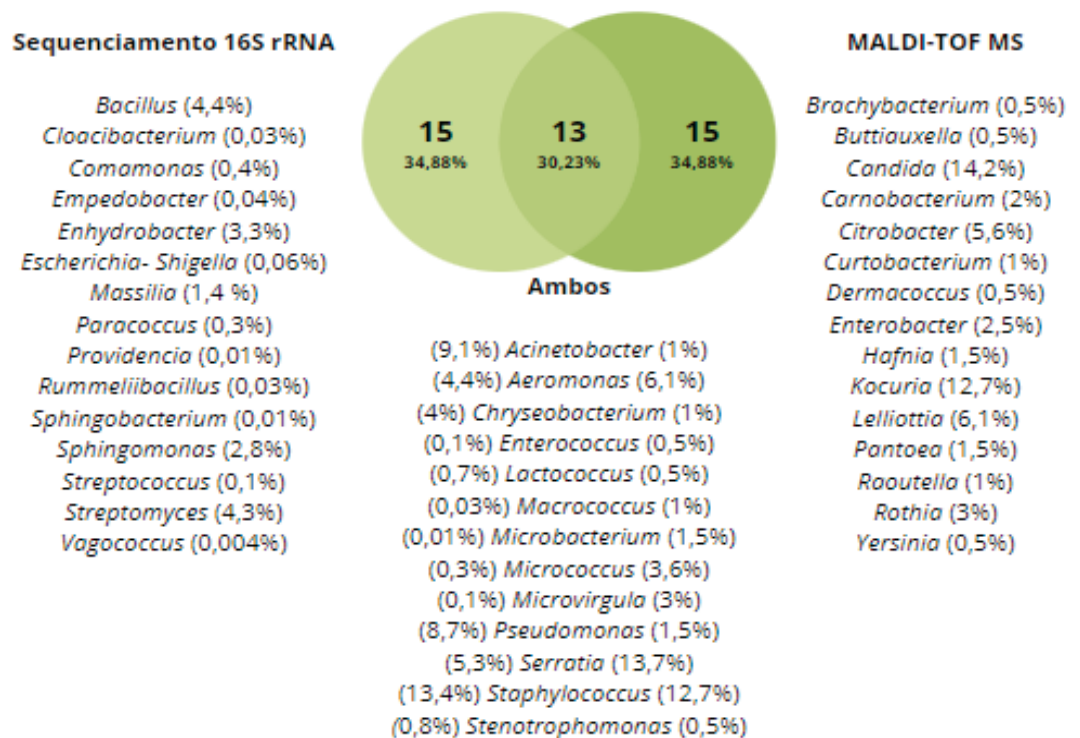
27

28

29

30

1 FIGURA 9- GÊNEROS MICROBIANOS IDENTIFICADOS PELAS TÉCNICAS DE MALDI-TOF MS,
 2 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA E EM AMBAS



3

4 NOTA: na categoria “ambos”, a porcentagem à esquerda do gênero está relacionada à técnica de
 5 Sequenciamento 16S rRNA e a porcentagem à direita à técnica de MALDI-TOF MS.

6 4.3.6 Capacidade de adesão dos isolados

7 De um total de 197 microrganismos identificados, 107 (54,3%) foram
 8 classificados como não aderentes, resultando em 90 (45,7%) isolados com potencial
 9 para formação de biofilme. Entre os isolados considerados aderentes, 62 (31,5%)
 10 foram classificados como fracos, 20 (10,2%) como moderados e 8 (4,1%) como fortes.

11 4.4 DISCUSSÃO

12 O programa de monitoramento ambiental é definido como uma ferramenta
 13 utilizada nas indústrias de alimentos com a finalidade de realizar a vigilância do
 14 ambiente e, desse modo, prevenir a contaminação cruzada entre os produtos e as
 15 superfícies de contato (3M; CORNELL UNIVERSITY, 2019). A detecção de células
 16 bacterianas viáveis nas superfícies limpas da sala de cortes, mesmo após
 17 procedimento de higienização pré-operacional, destaca aspectos importantes que
 18 devem ser levadas em consideração pelas equipes de gestão da qualidade e
 19 segurança dos alimentos das indústrias. O delineamento experimental adotado neste

1 estudo, com um plano amostral mais robusto e sensível, maximizou a obtenção de
2 resultados, viabilizando a aquisição de informações frequentemente desconhecida
3 pela indústria.

4 A legislação brasileira não estabelece critérios microbiológicos específicos
5 para avaliar a eficácia desse processo, deixa ao cargo das indústrias a determinação
6 dos seus próprios limites. Contudo, estudos desenvolvidos no contexto brasileiro
7 utilizaram contagens inferiores a 1,0 Log UFC/cm² como parâmetro de referência para
8 avaliação desses procedimentos (RODRIGUES *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2018;
9 TADIELO *et al.*, 2023b)

10 Tomando-se como base este referencial, neste estudo, ainda que a média
11 geral para os todos os microrganismos indicadores avaliados tenha se mantido dentro
12 do padrão, 18% das amostras para mesófilos, 30% para psicrotóxicos e 10% para
13 *Pseudomonas* spp. apresentaram contagens acima deste limite de 1,0 Log UFC/cm²,
14 o que demonstrou possíveis falhas no processo de higienização. As contagens para
15 cada grupo de microrganismos não apresentaram diferença estatística entre os
16 diferentes materiais e tipos de esteira o que foi também relatado por Tadielo *et al.*
17 (2023b), os quais não identificaram diferenças nas contagens entre diferentes tipos
18 de superfície após a realização do procedimento de higienização pré-operacional,
19 destacando, assim, que o resultado da higienização não está condicionado ao tipo de
20 superfície.

21 Mota *et al.*, (2021) descreveram a importância de registrar e monitorar
22 sistematicamente os resultados das análises, assim como acompanhar as tendências
23 de contaminação ao longo do tempo. Essas práticas permitem determinar linhas de
24 base para avaliar microrganismos específicos ou grupos de microrganismos,
25 facilitando a tomada de decisões e implementação de ações corretivas.

26 A ausência de *Salmonella* spp. nas superfícies limpas do frigorífico contrasta
27 com observações de outros autores que identificaram o patógeno nesses ambientes
28 mesmo após o processo de higienização (RASSCHAERT; HOUF; DE ZUTTER, 2007;
29 OBE *et al.*, 2020; VIANA *et al.*, 2020). Zeng *et al.*, (2021) recuperaram isolados de
30 *Salmonella* spp. em superfícies limpas de abatedouros no dia posterior ao abate de
31 lotes de aves positivos para esse microrganismo. Notavelmente, em dois dias de
32 coleta durante nosso estudo, também foram abatidos lotes positivos. A diferença deste
33 estudo para aqueles que observaram a presença do patógeno, sugere que, apesar

1 dos esforços da higienização, a persistência desse patógeno pode variar, justificando
2 a investigação constante da presença do microrganismo em todo ambiente industrial.

3 Diversos fatores podem estar relacionados a persistência de *Salmonella* spp.,
4 incluindo os agentes químicos utilizados, interferências no procedimento de limpeza,
5 capacidade do microrganismo de aderir as superfícies e o desenvolvimento de
6 tolerância aos sanitizantes (OBE *et al.*, 2020). Além disso, Zeng *et al.*, (2021)
7 descrevem que os sorovares *S. Infantis* and *S. Paratyphi B* variante Java são
8 altamente persistentes e a higienização é menos eficiente contra esses
9 microrganismos. No entanto, provavelmente, neste estudo, estes fatores não tenham
10 sido observados.

11 Os resultados também revelaram a ausência de *Listeria monocytogenes* após
12 o processo de higienização, mas, a presença de *L. innocua* em uma amostra da esteira
13 lisa de poliuretano revelou condições apropriadas para o desenvolvimento de *L.*
14 *monocytogenes* (MOURA *et al.*, 2019). As espécies desse gênero possuem alta
15 homologia de DNA, tornando-as semelhantes fenotipicamente e ecologicamente,
16 podendo serem encontradas juntas no mesmo ambiente (SAUDERS; WIEDMANN,
17 2007).

18 A capacidade do gênero *Listeria* de se multiplicar em baixas temperaturas pode
19 ser uma importante característica que permite identificar a sala de cortes como um
20 ambiente propício para o desenvolvimento desses microrganismos (SCHÄFER *et al.*,
21 2017). Investigações prévias de outros pesquisadores evidenciaram a presença de *L.*
22 *monocytogenes* em equipamentos e superfícies limpas do ambiente industrial de
23 processamento de carne de frango (CARVALHO *et al.*, 2019; MOURA *et al.*, 2019;
24 TADIELO *et al.*, 2023ab). Além de descreverem uma variedade de mecanismos
25 fenotípicos e genotípicos associados à persistência desses microrganismos nesses
26 ambientes, tais como formação de biofilme e resistência a agentes sanitizantes,
27 alguns desses estudos também abordaram o potencial patogênico dos isolados
28 identificados. Essas informações ressaltam a relevância do tema, tanto no âmbito das
29 estratégias de controle microbiológico em ambientes industriais quanto para a saúde
30 pública, considerando o risco potencial de contaminação dos alimentos.

31 Apesar dos resultados negativos para os patógenos avaliados por meio de
32 análises microbiológicas neste estudo, a aplicação da técnica de MALDI-TOF MS
33 revelou a presença de *Yersinia enterocolitica* na mesa de aço inoxidável lisa,
34 microrganismo reconhecidamente causador de infecções gastrointestinais,

1 geralmente adquiridas por meio do consumo de água e alimentos contaminados
2 (FÀBREGA; VILA, 2012).

3 Vários fatores têm o potencial de afetar a ecologia microbiana observada em
4 ambientes industriais após procedimentos de higienização, influenciando a
5 constituição de populações microbianas, sejam elas residentes ou transitórias. Dentre
6 esses fatores, destacam-se a composição inicial da microbiota das aves,
7 inadequações nos processos de higienização, a presença de resíduos orgânicos e as
8 características específicas das superfícies (MAES *et al.*, 2019; DE FILIPPIS *et al.*,
9 2021; TADIELO *et al.*, 2023a)

10 A análise da diversidade microbiana pela técnica de MALDI-TOF MS revelou a
11 presença notável do gênero *Candida* (SILVA *et al.*, 2012). A principal via de
12 contaminação e disseminação de leveduras na indústria de alimentos ocorre por meio
13 de aerossóis, respingos e pulverizações durante o processo de higienização (ZARA
14 *et al.*, 2020; MIRANDA; LEÃES; COPETTI, 2022). A alta incidência encontrada nas
15 superfícies limpas avaliadas pode estar associada a esse fenômeno, uma vez que,
16 em determinadas circunstâncias, a condensação das instalações propiciou respingos
17 sobre as superfícies avaliadas. Ademais, outra característica que propicia sua
18 manutenção nas indústrias é a sua capacidade de formação biofilme (BRUGNONI;
19 LOZANO; CUBITTO, 2007).

20 As técnicas de MALDI-TOF e o sequenciamento do gene 16S rRNA revelaram
21 uma concordância na identificação de três gêneros entre os mais predominantes nas
22 superfícies higienizadas do frigorífico de aves: *Staphylococcus*, *Serratia* e *Aeromonas*.
23 Essa convergência entre os dois métodos reforça a consistência da maior abundância
24 de microrganismos viáveis desses gêneros no ambiente da sala de cortes. Resultados
25 semelhantes foram descritos por Mettler e Carpentier (1998), Brightwell *et al.* (2006),
26 Møretro, Langsrud e Heir (2013) e Tadielo *et al.*, (2023b), que descreveram esses
27 gêneros como predominantes em plantas de processamento de carne após limpeza e
28 sanitização.

29 *Staphylococcus* spp., pertencem a microbiota da pele e mucosa de seres
30 humanos e animais e a presença desses microrganismos no ambiente industrial pode
31 ser atribuída à introdução pela pele das aves ou pela presença humana nos locais de
32 processamento (XU *et al.*, 2023). *Aeromonas* e *Serratia* são microrganismos
33 associados à deterioração da carne de frango (ZHANG *et al.*, 2021; SHAO *et al.*,
34 2022), que manifestam capacidade de formar biofilme e resistir a agentes sanitizantes

1 (MØRETRO; LANGSRUD; HEIR, 2013; YUAN *et al.*, 2020). A característica
2 psicotrófica desses microrganismos pode ter contribuído para a permanência na sala
3 de cortes, ambiente que mantém condições térmicas reduzidas.

4 A técnica de MALDI-TOF MS revelou ainda grande abundância para os gêneros
5 *Kocuria* e *Lelliottia*. Maes *et al.* (2019) também encontraram *Kocuria rhizophila* em
6 superfícies de contato com alimentos de duas empresas de processamento de carnes
7 avaliadas. Esses autores enfatizaram o possível papel desses microrganismos não
8 apenas em superfícies higienizadas, mas também na formação de biofilme e no
9 potencial de deterioração de alimentos. O gênero *Lelliottia*, por sua vez, foi associado
10 a galpões de frango de corte após limpeza e higienização (LUYCKX *et al.*, 2017) e
11 também em produtos crus de frango (OLOBATOKE; MULUGETA; MWANZA, 2015;
12 İNAT *et al.*, 2023), demonstrando assim sua disseminação ao longo de diferentes
13 etapas do processo.

14 Pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, ainda foi possível observar
15 *Pseudomonas* e *Acinetobacter* entre os gêneros viáveis mais abundantes nas
16 superfícies. Apesar desse estudo ter sido desenvolvido baseado em cultura
17 microbiana, os resultados são condizentes com os apresentados por Fagerlund *et al.*
18 (2017) e Tadielo *et al.*, (2023ab) que utilizaram a metodologia independente de cultivo.

19 Marmion *et al.* (2021) descreveram que a contaminação de microrganismos
20 deteriorantes, notadamente *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, aumentou no ambiente
21 da indústria de aves a partir da água dos tanques de escaldagem. Adicionalmente,
22 Tadielo *et al.* (2023b) demonstraram que a contaminação por esses microrganismos
23 teve sua densidade relativa aumentada após o processo de higienização pré-
24 operacional.

25 *Pseudomonas* spp. possui notável capacidade de adaptação e é capaz de se
26 desenvolver em diferentes nichos ecológicos, o que é atribuído à ampla rede de genes
27 regulatórios presentes no seu genoma (GULA *et al.*, 2019). O biofilme de
28 *Pseudomonas* recebe destaque, cuja função não se limita apenas à proteção das
29 células contra os efeitos dos agentes sanitizantes, mas também cria um ambiente
30 propício para a colonização e proteção de bactérias patogênicas (PANG; YANG; YUK,
31 2017; STERNIŠA *et al.*, 2023). O gênero é reconhecido por ser pertencente a
32 microbiota natural das aves (RYCHLIK; KARASOVA; CRHANOVA, 2023), e dessa
33 maneira possivelmente contaminar os ambientes industriais. Da mesma forma, o

1 biofilme de *Acinetobacter* também tem sido associado a bactérias patogênicas em
2 alimentos e superfícies do ambiente industrial (ZWIRZITZ *et al.*, 2021).

3 Samapundo *et al.* (2019) identificaram o ar como um importante veículo de
4 contaminação das superfícies das salas de processamento de um frigorífico de aves.
5 Os autores verificaram que os aerossóis formados devido à alta pressão dos jatos de
6 água durante a etapa de higienização foram capazes de disseminar microrganismos
7 para diferentes ambientes industriais. Portanto, é plausível estabelecer uma relação
8 entre esse fator específico e a provável contaminação em diferentes superfícies,
9 destacando a importância crítica da gestão adequada do processo de higienização
10 para minimizar a disseminação de microrganismos nas instalações industriais

11 As duas metodologias de cultivo empregadas neste estudo demonstraram
12 concordância na identificação de 13 gêneros microbianos sendo que cada técnica
13 revelou 15 gêneros exclusivos, evidenciando uma divergência na identificação
14 microbiana entre as abordagens. A implementação simultânea de ambas as técnicas
15 para a avaliação microbiana viável revelou-se uma estratégia abrangente, permitindo
16 uma identificação mais completa dos microrganismos presentes nas superfícies
17 higienizadas da sala de cortes do frigorífico de aves.

18 A ausência de diferença significativa para alfa e beta diversidade pode ser
19 atribuída à frequência das coletas e à técnica de cultivo utilizadas. Salienta-se a
20 necessidade de conduzir pesquisas mais amplas e abrangentes sobre a diversidade
21 microbiana no contexto em análise. Este estudo visou promover o desenvolvimento
22 de uma compreensão mais aprofundada da diversidade presente nesses ambientes
23 específicos.

24 A avaliação do potencial de adesão dos isolados obtidos é de fundamental
25 importância para compreender a interação desses microrganismos com as superfícies
26 analisadas. A capacidade de adesão é uma característica que influencia a
27 persistência, colonização e formação de biofilme (CARVALHO *et al.*, 2023). Nesse
28 contexto, a capacidade de adesão apresentada por 45,7% dos microrganismos
29 mesófilos avaliados ressalta um alerta, indicando que uma parcela considerável da
30 microbiota viável pode potencialmente sobreviver aos processos de limpeza e
31 sanitização por meio da formação de biofilme.

1 4.5 CONCLUSÃO

2 A avaliação da contaminação superficial das superfícies da sala de cortes do
3 frigorífico de aves após a higienização pré-operacional, apesar de ter demonstrado
4 médias gerais situadas dentro de parâmetros aceitáveis estabelecidos por estudos
5 anteriores, também demonstrou algumas contagens acima do parâmetro, indicando a
6 possibilidade de falhas no processo de higienização. Contudo, não foram detectados
7 dois dos principais patógenos encontrados em ambientes de abate de aves,
8 *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*.

9 A avaliação da diversidade microbiana viável das superfícies após a
10 higienização pré-operacional, utilizando ambas as técnicas, demonstrou ser uma
11 abordagem abrangente em comparação com aquela ao utilizado adotada indústria.
12 Por meio delas, foi possível identificar uma diversidade de 43 gêneros microbianos,
13 incluindo indicadores de higiene, microrganismos deteriorantes, uma levedura e uma
14 espécie patogênica, *Yersinia enterocolitica*.

15 Adicionalmente, destaca-se que uma grande quantidade desses isolados
16 apresentou diferentes níveis de adesão, sugerindo potencial para formação de
17 biofilme. Essas informações revelam aspectos importantes sobre a segurança e a
18 qualidade na produção de alimentos, sugerindo a necessidade contínua de estratégias
19 de controle e monitoramento para garantir a integridade microbiológica dos ambientes
20 industriais e, conseqüentemente, dos produtos alimentícios.

21

22

23

24

25

26

27

1 4.6 REFERÊNCIAS

- 2 3M; CORNELL UNIVERSITY. Environmental Monitoring Handbook for the Food and
3 Beverage Industries (1st edition). Disponível em:
4 [https://multimedia.3m.com/mws/media/1684575O/environmental-monitoring-
5 handbook.pdf](https://multimedia.3m.com/mws/media/1684575O/environmental-monitoring-
5 handbook.pdf). Acesso em: 24 jan. 2024.
- 6 ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2023 (2023)**.
7 Disponível em: <<https://abpa-br.org/abpa-relatorio-anual/>>. Acesso em: 21 dez.
8 2023.
- 9 AMIR, A.; MCDONALD, D.; NAVAS-MOLINA, J. A.; KOPYLOVA, E.; MORTON, J. T.;
10 ZECH XU, Z.; KIGHTLEY, E. P.; THOMPSON, L. R.; HYDE, E. R.; GONZALEZ, A.;
11 KNIGHT, R. Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence
12 patterns. **MSystems**, v. 2, n. 2, p. e00191-16, 2017.
- 13 BARCELOS, M. M.; MARTINS, L.; GRENFELL, R. D. C.; JULIANO, L.; ANDERSON,
14 K. L.; DOS SANTOS, M. V.; GONÇALVES, J. L. Comparison of standard and on-
15 plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF
16 MS. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 849-857, 2019.
- 17 BIERHALS, N. D.; BRIXNER, B.; SILVA, K. S.; OLIVEIRA, C. F.; RENNER, J. D. P.
18 Extração de DNA genômico bacteriano: uma comparação de métodos comerciais e
19 *in house*. **Saúde**, v. 46, n. 2, 2020.
- 20 BOLYEN, E.; RIDEOUT, J. R.; DILLON, M. R.; BOKULICH, N. A.; ABNET, C. C.; AL-
21 GHALITH, G. A.; ALEXANDER, H.; ALM, E. J.; ARUMUGAM, M.; ASNICAR, F.; BAI,
22 Y.; BISANZ, J. E.; BITTINGER, K.; BREJNROD, A.; BRISLAWN, C. J.; BROWN, C.
23 T.; CALLAHAN, B. J.; CARABALLO RODRÍGUEZ, A. M.; CHASE, J.; COPE, E. K.;
24 DA SILVA, R.; DIENER, C.; DORRESTEIN, P. C.; DOUGLAS, G. M.; DURALL, D.
25 M.; DUVALLET, C.; EDWARDSON, C.; ERNST, M.; ESTAKI, M.; FOUQUIER, J.;
26 GAUGLITZ, J. M.; GIBBONS, S. M.; GIBSON, D. L.; GONZALEZ, A.; GORLICK, K.;
27 GUO, J.; HILLMANN, B.; HOLMES, S.; HOLSTE, H.; HUTTENHOWER, C.;
28 HUTTLEY, G. A.; JANSSEN, S.; JARMUSCH, A. K.; JIANG, L.; KAEHLER, B. D.;
29 KANG, K. B.; KEEFE, C. R.; KEIM, P.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOESTER, I.;
30 KOSCIOLEK, T.; KREPS, J.; LANGILLE, M. G. I.; LEE, J.; LEY, R.; LIU, Y.;
31 LOFTFIELD, E.; LOZUPONE, C.; MAHER, M.; MAROTZ, C.; MARTIN, B. D.;
32 MCDONALD, D.; MCIVER, L. J.; MELNIK, A. V.; METCALF, J. L.; MORGAN, S. C.;
33 MORTON, J. T.; NAIMEY, A. T.; NAVAS-MOLINA, J. A.; NOTHIAS, L. F.;
34 ORCHANIAN, S. B.; PEARSON, T.; PEOPLES, S. L.; PETRAS, D.; PREUSS, M. L.;
35 PRUESSE, E.; RASMUSSEN, L. B.; RIVERS, A.; ROBESON, M. S.; ROSENTHAL,
36 P.; SEGATA, N.; SHAFFER, M.; SHIFFER, A.; SINHA, R.; SONG, S. J.; SPEAR, J.
37 R.; SWAFFORD, A. D.; THOMPSON, L. R.; TORRES, P. J.; TRINH, P.; TRIPATHI,
38 A.; TURNBAUGH, P. J.; UL-HASAN, S.; HOOFT, J. J. J. V.; VARGAS, F.;
39 VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; VOGTMANN, E.; HIPPEL, M. V.; WALTERS, W.; WAN, Y.;
40 WANG, M.; WARREN, J.; WEBER, K. C.; WILLIAMSON, C. H. D.; WILLIS, A. D.;
41 XU, Z. Z.; ZANEVELD, J. R.; ZHANG, Y.; ZHU, Q.; KNIGHT, R.; CAPORASO, J. G.
42 Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using
43 QIIME 2. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852-857, 2019.

- 1 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto Nº 9.013, de**
2 **29 de março de 2017**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos
3 de Origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2017a.
- 4 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 210, de 10**
5 **de novembro de 1998**. Aprova o regulamento técnico da inspeção tecnológica e
6 higiênico-sanitária de carne de aves. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1998.
- 7 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Norma Interna nº 1,**
8 **de 08 de março de 2017**. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem
9 Animal. Brasília, DF, 2017b.
- 10 BRASIL, Ministério da saúde. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e**
11 **Alimentar Informe- 2023**. 2023. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/view)
12 [br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/view)
13 [hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/view). Acesso em: 25 dez. 2023.
- 14 BRIGHTWELL, G.; BOEREMA, J.; MILLS, J.; MOWAT, E.; PULFORD, D. Identifying
15 the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by
16 culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence
17 analysis. **International journal of food microbiology**, v. 109, n. 1-2, p. 47-53, 2006.
- 18 BRUGNONI, L.I.; LOZANO, J. E.; CUBITTO, M. A. Potential of yeast isolated from
19 apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing
20 industry. **Food research international**, v. 40, n. 3, p. 332-340, 2007.
- 21 CARVALHO, D.; CHITOLINA, G. Z.; WILSMANN, D. E.; LUCCA, V.; DE EMERY, B.
22 D.; BORGES, K. A.; FURIAN, T. Q.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S.; DO
23 NASCIMENTO, V. P. Adhesion capacity of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*
24 and *Campylobacter jejuni* on polystyrene, stainless steel, and polyethylene
25 surfaces. **Food Microbiology**, v. 114, p. 104280, 2023.
- 26 CARVALHO, F. T.; VIEIRA, B. S.; VALLIM, D. C.; CARVALHO, L. A.; CARVALHO,
27 R. C. T.; PEREIRA, R. C. L.; FIGUEIREDO, E. E. S. Genetic similarity, antibiotic
28 resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from
29 chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso,
30 Brazil. **LWT**, v. 109, p. 77-82, 2019.
- 31 CDC, Center for Disease Control and Prevention. Disponível em:
32 <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>. Acesso em: 28 dez. 2023b
- 33 CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; WANG, D.; GIBSON, K. E.; OBE,
34 T. Environmental monitoring in food manufacturing: Current perspectives and
35 emerging frontiers. **Food Control**, v. 159, p. 110269, 2023.
- 36 DE FILIPPIS, F.; VALENTINO, V.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; COTTER, P. D.;
37 ERCOLINI, D. Environmental microbiome mapping as a strategy to improve quality
38 and safety in the food industry. **Current Opinion in Food Science**, v.38, p. 168-176,
39 2021.

- 1 EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY); ECDC (EUROPEAN CENTRE
2 FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL). The European Union One Health
3 2022 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 21, n. 12, p. e8442, 2023.
- 4 FÀBREGA, A.; VILA, J. *Yersinia enterocolitica*: pathogenesis, virulence and
5 antimicrobial resistance. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 30,
6 n. 1, p. 24-32, 2012.
- 7 FAGERLUND, A.; MØRETRØ, T.; HEIR, E.; BRIANDET, R.; LANGSRUD, S.
8 Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and
9 background microbiota from meat processing surfaces. **Applied and Environmental**
10 **Microbiology**, v. 83, n. 17, 2017.
- 11 FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ, M. J. *Listeria*
12 *monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain
13 characteristics, and implications for public health. **Journal of food protection**, v. 77,
14 n. 1, p. 150-170, 2014.
- 15 GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.;
16 MØRETRØ, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G. J.
17 Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing
18 environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by
19 alternative novel methods. **Meat science**, v. 97, n. 3, p. 298-309, 2014.
- 20 GUŁA, G.; DOROTKIEWICZ-JACH, A.; KORZEKWA, K.; VALVANO, M. A.; DRULIS-
21 KAWA, Z. Complex signaling networks controlling dynamic molecular changes in
22 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Current medicinal chemistry**, v.26, n. 11,
23 p.1979-1993, 2019.
- 24 HÖTZEL, M. J.; VANDRESEN, B. Brazilians' attitudes to meat consumption and
25 production: Present and future challenges to the sustainability of the meat
26 industry. **Meat Science**, v. 192, p. 108893, 2022.
- 27 İNAT, G.; SIRIKEN, B.; ÇİFTCI, A.; EROL, İ.; BAŞKAN, C.; YILDIRIM, T. Molecular
28 characterization of extended-spectrum β -lactamases-producing Enterobacteriaceae
29 species in ground beef and chicken meat. **International Journal of Food**
30 **Microbiology**, v. 398, p. 110228, 2023.
- 31 ISO, ISO. 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal
32 method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1:
33 Detection method. **International Organization for Standardization**, Geneva,
34 Switzerland, 2017b.
- 35 ISO, ISO. 13720 Meat and meat products — Enumeration of presumptive
36 *Pseudomonas* spp. **International Organization for Standardization**, Geneva,
37 Switzerland, 2010.
- 38 ISO, ISO. 17410 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method
39 for the Enumeration of Psychrotrophic Microorganisms. **International Organization**
40 **for Standardization**, Geneva, Switzerland, 2001.

- 1 ISO, ISO. 4833-1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the
2 enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate
3 technique. **International Organization for Standardization**, Geneva, Switzerland,
4 2013.
- 5 ISO, ISO. 6579 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method
6 for the detection of *Salmonella* spp.: Detection method. **International Organization
7 for Standardization**, Geneva, Switzerland, 2017a.
- 8 KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN,
9 M.; GLÖCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers
10 for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids
11 research**, v. 41, n. 1, p. e1-e1, 2013.
- 12 KOTSANOPOULOS, K. V.; ARVANITTOYANNIS, I. S. The role of auditing, food
13 safety, and food quality standards in the food industry: A review. **Comprehensive
14 reviews in food science and food safety**, v. 16, n. 5, p. 760-775, 2017.
- 15 KRABBE, E. L.; SANTOS FILHO, J. I.; MIELE, M.; MARTINS, F. M. Cadeias
16 produtivas de suínos e aves. Embrapa Suínos e Aves. *In*: GENTILINI, F. P.;
17 ANCIUTI, M. A. (Org.). **Tópicos atuais na produção de suínos e aves**. Pelotas:
18 IFSul/Pelotas, 2013. p. 9-13.
- 19 LUYCKX, K.; VAN COILLIE, E.; DEWULF, J.; VAN WEYENBERG, S.; HERMAN, L.;
20 ZOONS, J.; VERVAET, E.; HEYNDRICKX, M.; DE REU, K. Identification and biocide
21 susceptibility of dominant bacteria after cleaning and disinfection of broiler
22 houses. **Poultry science**, v. 96, n. 4, p. 938-949, 2017.
- 23 MAES, S.; HEYNDRICKX, M.; VACKIER, T.; STEENACKERS, H.; VERPLAETSE,
24 A.; DE REU, K. Identification and Spoilage Potential of the Remaining Dominant
25 Microbiota on Food Contact Surfaces after Cleaning and Disinfection in Different
26 Food Industries. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 2, p. 262-275, 2019.
- 27 MANDAL, S.; VAN TREUREN, W.; WHITE, R. A.; EGGESBØ, M.; KNIGHT, R.;
28 PEDDADA, S. D. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for
29 studying microbial composition. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, n.
30 1, p. 27663, 2015.
- 31 MARMION, M.; FERONE, M. T.; WHYTE, P.; SCANNELL, A. G. M. The changing
32 microbiome of poultry meat; from farm to fridge. **Food microbiology**, v. 99, p.
33 103823, 2021.
- 34 METTLER, E.; CARPENTIER, B. Variations over time of microbial load and
35 physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry
36 premises. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 1, p. 57-65, 1998.
- 37 MIRANDA, A. C. V.; LEÃES, G. F.; COPETTI, M. V. Fungal biofilms: insights for the
38 food industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 46, p. 100846, 2022.
- 39 MØRETRO, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E. Bacteria on meat abattoir process
40 surfaces after sanitation: Characterisation of survival properties of *Listeria*

- 1 *monocytogenes* and the commensal bacterial flora. **Advances in Microbiology**, v. 3,
2 p. 255-264, 2013.
- 3 MOTA, J. D. O.; BOUE, G.; PREVOST, H.; MAILLET, A.; JAFFRES, E.; MAIGNIEN,
4 T.; ARNICH, T.; SANAA, M.; FEDERIGHI, M. Environmental monitoring program to
5 support food microbiological safety and quality in food industries: A scoping review of
6 the research and guidelines. **Food Control**, v. 130, p. 108283, 2021.
- 7 MOURA, G.; TOMBORELLI, P.; CARVALHO, R. C.; SIGARINI, C.; CARVALHO, F.;
8 VIEIRA, B.; FIGUEIREDO, E. E. *Listeria monocytogenes* and other species as
9 persistent contaminants in the processing of chicken meat. **Journal of Applied**
10 **Poultry Research**, v. 28, n. 2, p. 470-478, 2019.
- 11 OBE, T.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, W.; ZHANG, L.; MCDANIEL, C.; KIESS,
12 A. Prevalence of *Salmonella enterica* on poultry processing equipment after
13 completion of sanitization procedures. **Poultry science**, v. 99, n. 9, p. 4539-4548,
14 2020.
- 15 OLOBATOKE, R.; MULUGETA, S.; MWANZA, M. Incidence and antimicrobial
16 susceptibility of coliforms in broiler products at the north west province of South
17 Africa. **Food Prot. Trends**, v. 35, n. 1, p. 49-55, 2015.
- 18 PANG, X. Y.; YANG, Y. S.; YUK, H. G. Biofilm formation and disinfectant resistance
19 of *Salmonella* sp. in mono-and dual-species with *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal**
20 **of Applied Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 651-660, 2017.
- 21 PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2—approximately maximum-
22 likelihood trees for large alignments. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9490, 2010.
- 23 QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.;
24 PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project:
25 improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n.
26 D1, p. D590-D596, 2013.
- 27 RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; DE ZUTTER, L. Impact of the slaughter line
28 contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. **Journal of**
29 **Applied Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 333-341, 2007.
- 30 RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R. D.; RIZZO, N. N.; FERREIRA, D.; OLIVEIRA, A.
31 P. D.; LEVANDOWSKI, R.; WEBBER, B.; NASCIMENTO, V. P. D. ATP-
32 Bioluminescence and conventional microbiology for hygiene evaluation of cutting
33 room surfaces in poultry slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p. 1-6,
34 2018.
- 35 RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P.; SAÁ-IBUSQUIZA, P.; MOSQUERA-FERNÁNDEZ, M.;
36 LÓPEZ-CABO, M. *Listeria monocytogenes*-carrying consortia in food industry.
37 Composition, subtyping and numerical characterisation of mono-species biofilm
38 dynamics on stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, p.
39 84-95, 2015.

- 1 ROZEWICKI, J.; LI, S.; AMADA, K. M.; STANDLEY, D. M.; KATOH, K. MAFFT-
2 DASH: integrated protein sequence and structural alignment. **Nucleic acids**
3 **research**, v. 47, n. W1, p. W5-W10, 2019.
- 4 RYCHLIK, I.; KARASOVA, D.; CRHANOVA, M. Microbiota of Chickens and Their
5 Environment in Commercial Production. **Avian Diseases**, v. 67, n. 1, p. 1-9, 2023.
- 6 SAMAPUNDO, S.; DE BAENST, I.; AERTS, M.; CNOCKAERT, M.; DEVLIEGHIERE,
7 F.; VAN DAMME, P. Tracking the sources of psychrotrophic bacteria contaminating
8 chicken cuts during processing. **Food microbiology**, v. 81, p. 40-50, 2019.
- 9 SAUDERS, B. D.; WIEDMANN, M. Ecology of *Listeria* species and *L.*
10 *monocytogenes* in the natural environment. **FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-**
11 **NEW YORK-MARCEL DEKKER-**, v. 161, p. 21, 2007.
- 12 SCHÄFER, D. F.; STEFFENS, J.; BARBOSA, J.; ZENI, J.; PAROUL, N.; VALDUGA,
13 E.; JUNGES, A.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L. Monitoring of contamination
14 sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. **LWT**, v. 86, p. 393-
15 398, 2017.
- 16 SHAO, L.; TIAN, Y.; CHEN, S.; XU, X.; WANG, H. Characterization of the spoilage
17 heterogeneity of *Aeromonas* isolated from chilled chicken meat: in vitro and in
18 situ. **LWT**, v. 162, p. 113470, 2022.
- 19 SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.;
20 AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*:
21 biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology**
22 **reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.
- 23 SOARES, V. M.; VIANA, C.; PEREIRA, J. G.; DESTRO, M. T.; NERO, L. A.; DOS
24 SANTOS BERSOT, L.; PINTO, J. P. D. A. N. Absence of a continuous water spray
25 system does not influence the microbiological contamination of the conveyor belts in
26 chicken slaughterhouses. **LWT**, v. 97, p. 414-418, 2018.
- 27 STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A
28 modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm
29 formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- 30 STERNIŠA, M.; CENTA, U. G.; DRNOVŠEK, A.; REMŠKAR, M.; MOŽINA, S.
31 *S. Pseudomonas fragi* biofilm on stainless steel (at low temperatures) affects the
32 survival of *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* and their control by a
33 polymer molybdenum oxide nanocomposite coating. **International Journal of Food**
34 **Microbiology**, v. 394, p. 110159, 2023.
- 35 TADIELO, L. E.; DOS SANTOS, E. A. R.; POSSEBON, F. S.; SCHMIEDT, J. A.;
36 JULIANO, L. C. B.; CERQUEIRA-CÉZAR, C. K.; DE OLIVEIRA, J. P.; SAMPAIO, A.
37 N. C. E.; MELO, P. R. L.; CARON, E. F. F.; PINTO, J. P. A. N.; BERSOT, L. S.;
38 PEREIRA, J. G. Characterization of microbial ecology, *Listeria monocytogenes*, and
39 *Salmonella* sp. on equipment and utensil surfaces in Brazilian poultry, pork, and dairy
40 industries. **Food Research International**, v. 173, p. 113422, 2023a.

- 1 TADIELO, L. E.; DOS SANTOS, E. A. R.; POSSEBON, F. S.; SCHMIEDT, J. A.;
2 ORISIO, P. H. S.; JULIANO, L. C. B.; CERQUEIRA-CÉZAR, C. K.; PINTO, J. P. A.
3 N.; PEREIRA, J. G.; BERSOT, L. S. Preoperational cleaning processes interfere with
4 microbial ecology and presence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on
5 food conveyor belts of a poultry slaughterhouse in Brazil. **LWT**, v. 184, p. 115037,
6 2023b.
- 7 TAGAR, S.; QAMBRANI, N. A. Avaliação da qualidade bacteriológica da carne de
8 frango e das superfícies de contato com a carne quanto à presença de bactérias-
9 alvo e determinação da resistência a antibióticos de *Salmonella* spp. No
10 Paquistão. **Controle Alimentar**, v. 151, p. 109786, 2023.
- 11 VIANA, C.; SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; TADIELO, L. E.; NERO, L. A.; PINTO,
12 J. P. D. A. N.; DOS SANTOS BERSOT, L. Effect of a water spray system on the
13 presence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* on conveyor belts in chicken
14 slaughterhouses. **LWT**, v. 122, p. 109017, 2020.
- 15 WAGNER, E. M.; PRACSER, N.; THALGUTER, S.; FISCHER, K.; RAMMER, N.;
16 POSPÍŠILOVÁ, L.; RYCHLI, K. Identification of biofilm hotspots in a meat processing
17 environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. **International**
18 **Journal of Food Microbiology**, v. 328, n. 108668, 2020.
- 19 WARMATE, D.; ONARINDE, B. A. Food safety incidents in the red meat industry: A
20 review of foodborne disease outbreaks linked to the consumption of red meat and its
21 products, 1991 to 2021. **International Journal of Food Microbiology**, v. 398, p.
22 110240, 2023.
- 23 XU, X.; ROTHROCK JR, M. J.; MISHRA, A.; KUMAR, G. D.; & MISHRA,
24 A. Relationship of the Poultry Microbiome to Pathogen Colonization, Farm
25 Management, Poultry Production, and Foodborne Illness Risk Assessment. **Journal**
26 **of Food Protection**, p. 100169, 2023.
- 27 YUAN, L.; WANG, N.; SADIQ, F. A.; HE, G. Interspecies interactions in dual-species
28 biofilms formed by psychrotrophic bacteria and the tolerance of sessile communities
29 to disinfectants. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 6, p. 951-958, 2020.
- 30 ZARA, G.; BUDRONI, M.; MANNAZZU, I.; FANCELLO, F.; ZARA, S. Yeast biofilm in
31 food realms: Occurrence and control. **World Journal of Microbiology and**
32 **Biotechnology**, v. 36, p. 1-10, 2020.
- 33 ZENG, H.; DE REU, K.; GABRIËL, S.; MATYHEUS, W.; DE ZUTTER, L.;
34 RASSCHAERT, G. *Salmonella* prevalence and persistence in industrialized poultry
35 slaughterhouses. **Poultry science**, v. 100, n. 4, p. 100991, 2021.
- 36 ZHANG, T.; DING, H.; CHEN, L.; ZHANG, S.; WU, P.; XIE, K.; PANELA, Z.; ZHANG,
37 G.; DAI, G.; WU, H.; WANG, J. Y. Characterization of chilled chicken spoilage using
38 an integrated microbiome and metabolomics analysis. **Food Research**
39 **International**, v. 144, p. 110328, 2021.
- 40 ZWIRZITZ, B.; WETZELS, S. U.; DIXON, E. D.; FLEISCHMANN, S.; SELBERHERR,
41 E.; THALGUTER, S.; QUIJADA, N. M.; DZIECIOL, M.; WAGNER, M.; STESSL,
42 B. Co-occurrence of *Listeria* spp. and spoilage associated microbiota during meat

1 processing due to cross-contamination events. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p.
2 632935, 2021.

3 **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

4 A eficácia da higienização na indústria de alimentos é uma medida
5 fundamental para evitar a multiplicação de microrganismos, considerando que a
6 persistência de bactérias pode representar prejuízos econômicos e riscos à saúde
7 pública. Este estudo demonstrou que diversos microrganismos podem sobreviver a
8 esse procedimento, incluindo bactérias deteriorantes e patogênicas. Esses resultados
9 ressaltam a necessidade de aprimorar as práticas de higienização e abrem espaço
10 para investigações adicionais, principalmente aquelas voltadas para caracterizar a
11 capacidade de deterioração, formação de biofilme e perfil de patogenicidade desses
12 isolados. A compreensão desses aspectos é crucial para o desenvolvimento de
13 estratégias eficazes de higienização, visando não apenas a eliminação dos
14 microrganismos, mas também a prevenção de sua recorrência.

15 A avaliação de microbiota possivelmente persistente em superfícies abióticas
16 nas indústrias de processamento de alimentos, conduzida por um plano amostral
17 robusto e mais sensível do que o plano amostral estabelecido pelo controle de
18 qualidade industrial, proporciona informações anteriormente desconhecidas
19 pela indústria de alimentos. A partir dos dados obtidos, é possível revisar a abordagem
20 da higiene pré-operacional, visando não apenas conhecer um quantitativo genérico,
21 mas também as possíveis interações entre os microrganismos, suas implicações e
22 estratégias de controle.

23

24

25

26

27

28

29

30

- 1 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 210, de 10**
2 **de novembro de 1998**. Aprova o regulamento técnico da inspeção tecnológica e
3 higiênico-sanitária de carne de aves. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1998.
- 4 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Norma Interna nº 1,**
5 **de 08 de março de 2017**. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem
6 Animal. Brasília, DF, 2017b.
- 7 BRASIL, Ministério da saúde. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e**
8 **Alimentar Informe- 2023**. 2023. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/view)
9 [br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/view)
10 [hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/view). Acesso em: 25 dez. 2023.
- 11 BUCHANAN, R. L.; GORRIS, L. G.; HAYMAN, M. M.; JACKSON, T. C.; WHITING,
12 R. C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose
13 response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, p. 1-13, 2017.
- 14 CALDERA, L.; FRANZETTI, L.V.; VAN COILLIE, E.; DE VOS, P.; STRAGIER, P.; DE
15 BLOCK, J.; HEYNDRIKX, M. Identification, enzymatic spoilage characterization and
16 proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different
17 foods. **Food Microbiology**, v. 54, p. 142-153, 2016.
- 18 ÇAPAN, B; BAĞDATLI, A. Investigation of physicochemical, microbiological and
19 sensorial properties for organic and conventional retail chicken meat. **Food Science**
20 **and Human Wellness**, v. 10, n. 2, p. 183-190, 2021.
- 21 CARTWRIGHT, E. J.; JACKSON, K. A.; JOHNSON, S. D.; GRAVES, L. M.; SILK, B.
22 J.; MAHON, B. E. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States,
23 1998–2008. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2013.
- 24 CDC, Center for Disease Control and Prevention. Disponível em:
25 <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>. Acesso em: 25 dez. 2023a
- 26 CDC, Center for Disease Control and Prevention. Disponível em:
27 <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>. Acesso em: 28 dez. 2023b
- 28 CHAVES, R. D.; KUMAZAWA, S. H.; KHANEGHAH, A. M.; ALVARENGA, V. O.;
29 HUNGARO, H. M.; SANT'ANA, A. S. Comparing the susceptibility to sanitizers,
30 biofilm-forming ability, and biofilm resistance to quaternary ammonium and chlorine
31 dioxide of 43 *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* strains. **Food**
32 **Microbiology**, v. 117, p. 104380, 2024.
- 33 CHERIFI, T.; ARSENAULT, J.; QUESSY, S.; FRAVALO, P. Co-Occurrence of *L.*
34 *monocytogenes* with Other Bacterial Genera and Bacterial Diversity on Cleaned
35 Conveyor Surfaces in a Swine Slaughterhouse. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, 2022.
- 36 CHIARINI, E.; PINTO, U. M. *Listeria monocytogenes*, In: FRANCO, B. D. G. M.;
37 LANDGRAF, M. (eds.). **Microbiologia dos Alimentos (2ª edição)**. Rio de Janeiro:
38 Atheneu, 2023. p. 54-60.
- 39 COCOLIN, L.; ALESSANDRIA, V.; DOLCI, P.; GORRA, R.; RANTSIOU, K. Culture
40 independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food

- 1 fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 29-43,
2 2013.
- 3 CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass
4 spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36,
5 n. 2, p. 380-407, 2012.
- 6 CUNDELL, Anthony M. Microbial ecology of the human skin. **Microbial ecology**, v.
7 76, n. 1, p. 113-120, 2018.
- 8 DALY, A. J.; BAETENS, J. M.; DE BAETS, B. Ecological diversity: measuring the
9 unmeasurable. **Mathematics**, v. 6, n. 7, p. 119, 2018.
- 10 DA SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.;
11 GOMES, R. A. R.; OKASAKI, M. M. Contagem total de microrganismos aeróbios
12 mesófilos e psicrótróficos em placas. *In*: **Manual de métodos de análise**
13 **microbiológica de alimentos e água (5ª edição)**. São Paulo: Blucher, 2018. p. 73-
14 86.
- 15 DA SILVEIRA, D. C.; FEISTEL, P. R.; BRUM, A. L. As exportações da região Sul do
16 Brasil: uma análise do setor agropecuário. **Redes. Revista do Desenvolvimento**
17 **Regional**, v. 24, n. 3, p. 272-294, 2019.
- 18 DAMIAN, A. Higienização e Sanificação – Indústria de Alimentos. Neoprospecta
19 Microbiome Technologies. *E-book*. Disponível em:
20 <https://www.neoprospecta.com/conteudos/>. Acesso em: 21 dez 2023.
- 21 DE FILIPPIS, F.; PARENTE, E.; ERCOLINI, D. Recent past, present, and future of
22 the food microbiome. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p.
23 589-608, 2018.
- 24 DE MIRANDA, N. M. Z.; DE SOUZA, A. C.; COSTA SOBRINHO, P. S.; DIAS, D. R.;
25 SCHWAN, R. F.; RAMOS, C. L. Novel yeasts with potential probiotic characteristics
26 isolated from the endogenous ferment of artisanal Minas cheese. **Brazilian Journal**
27 **of Microbiology**, p. 1-13, 2023.
- 28 DE OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos
29 na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.
30 3, p. 277-284, 2010.
- 31 DEL MAR CENDRA, M.; TORRENTS, E. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and
32 their partners in crime. **Biotechnology advances**, v. 49, p. 107734, 2021.
- 33 DON, S.; XAVIER, K. M.; DEVI, S.T.; NAYAK, B. B.; KANNUCHAMY, N.
34 Identification of potential spoilage bacteria in farmed shrimp (*Litopenaeus vannamei*):
35 Application of Relative Rate of Spoilage models in shelf life-prediction. **LWT**, v. 97,
36 p. 295-301, 2018.
- 37 EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY); ECDC (EUROPEAN CENTRE
38 FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL). The European Union One Health
39 2022 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 21, n. 12, p. e8442, 2023.

- 1 FAGERLUND, A.; MØRETRØ, T.; HEIR, E.; BRIANDET, R.; LANGSRUD, S.
2 Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and
3 background microbiota from meat processing surfaces. **Applied and Environmental**
4 **Microbiology**, v. 83, n. 17, 2017.
- 5 FARRANCE, C. E.; KHOT, P. D. MALDI-TOF MS – Microbial Identification as Part of
6 a Contamination Control Strategy for Regulated Industries. *In*: SHAH, H. N.;
7 SAHEER, E. G.; SHAH, A. J.; TRANFIELD, E. Y.; THOMPSON, K. C. (eds.).
8 **Microbiological Identification using MALDI-TOF and Tandem Mass**
9 **Spectrometry: Industrial and Environmental Applications (1st edition)**. West
10 Sussex, Reino Unido: John Wiley & Sons Ltd, 2023. p. 473-495.
- 11 FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em:
12 <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/foodborne-pathogens>. Acesso
13 em: 25 dez. 2023.
- 14 FORSYTHE, S. J. Fatores que afetam a multiplicação bacteriana. *In*: FORSYTHE, S.
15 J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed Editora,
16 2013. p. 104-107.
- 17 FRANZETTI, L.; SCARPELLINI, M. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated
18 from foods. **Annals of microbiology**, v. 57, p. 39-47, 2007.
- 19 FREITAG, I. G. R.; PEREIRA, R. D. C. L.; MACHADO, E.S.; HOFER, E.; VALLIM,
20 D.C.; HOFER, C.B. Seroprevalence of *Listeria monocytogenes* in HIV infected
21 pregnant women from Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25,
22 n. 6, p. 101635, 2021.
- 23 FRIEDLY, E. C.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S.; O'BRYAN, C. A.; MARTIN, E. M.;
24 BOYD, L. M. Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes*
25 in hamburger patties. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. 174–178, 2008.
- 26 GERBA, C. P. Indicator Microorganisms. *In*: PEPPER, I. L; GERBA, C. P.; GENTRY,
27 T. J. (eds.). **Environmental Microbiology (Third Edition)**. Amsterdam: Elsevier,
28 2015, p. 551-564.
- 29 GIBANI, M. M.; BRITTO, C.; POLLARD, A. J. Typhoid and paratyphoid fever: a call to
30 action. **Current opinion in infectious diseases**, v. 31, n. 5, p. 440, 2018.
- 31 GRIMONT, P. A.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. **WHO**
32 **collaborating centre for reference and research on Salmonella**, v. 9, p. 1-166,
33 2007.
- 34 GUILLET, C.; JOIN-LAMBERT, O.; LE MONNIER, A.; LECLERCQ, A.; MECHAÏ, F.;
35 MAMZER-BRUNEEL, M. F.; BIELECKA, M. K.; SCORTTI, M.; DISSON, O.;
36 BERCHE, P.; VAZQUEZ-BOLAND, J.; LORTHOLARY, O.; LECUIT, M. Human
37 listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. **Emerging infectious diseases**, v.16, n. 1, p.
38 136–138, 2010.
- 39 HINTON JUNIOR, A.; CASON, J. A.; INGRAM, K. D. Tracking spoilage bacteria in
40 commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry
41 carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2, p. 155-165, 2004.

- 1 HOFER, E.; REIS, C. M. F.; HOFER, C. B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e
2 espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade**
3 **Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 32-37, 2006.
- 4 IGLESIAS, M. A.; KRONING, I. S.; RAMIRES, T.; CUNHA, C. E.; MOREIRA, G. M.;
5 CAMARGO, A. C.; MENDONÇA, M.; NERO, L. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; LOPES, G.
6 V.; DA SILVA, W. P. Genetic Profiles and Invasion Ability of *Listeria monocytogenes*
7 Isolated from Bovine Carcasses in Southern Brazil. **Journal of Food Protection**, v.
8 85, n. 4, p. 591-596, 2022.
- 9 ISMAÏL, R.; AVIAT, F.; MICHEL, V.; LE BAYON, I.; GAY-PERRET, P.; KUTNIK, M.;
10 FÉDÉRIGHI, M. Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in
11 the food industry: a review of the literature. **International journal of environmental**
12 **research and public health**, v. 10, n. 11, p. 6169-6183, 2013.
- 13 KATIYO, W.; DE KOCK, H. L.; COOREY, R.; BUYS, E. M. Sensory implications of
14 chicken meat spoilage in relation to microbial and physicochemical characteristics
15 during refrigerated storage. **LWT**, v. 128, p. 109468, 2020.
- 16 KUNIGK, L; Higienização na indústria de alimentos. *In*: FRANCO, B. D. G. M.;
17 LANDGRAF, M. (eds.). **Microbiologia dos Alimentos (2ª edição)**. Rio de Janeiro:
18 Atheneu, 2023. p. 203-220.
- 19 LANGSRUD, S.; MOEN, B.; MØRETRØ, T.; LØYPE, M.; HEIR, E. Microbial
20 dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in
21 salmon-processing plants. **Journal of applied microbiology**, v. 120, n. 2, p. 366-
22 378, 2016.
- 23 LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and infection**, v. 9, n.
24 10, p. 1216-1225, 2007.
- 25 LENAHAN, R. J. Peroxyacetic acid: The new generation sanitizer. **MBAA Technical**
26 **Quaterly**, v. 29, p. 53-56, 1992.
- 27 LOW J.C.; DONACHIE W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. **The**
28 **Veterinary Journal**, v. 153, n. 1, p. 9-29, 1997.
- 29 MAES, S.; HEYNDRICKX, M.; VACKIER, T.; STEENACKERS, H.; VERPLAETSE,
30 A.; DE REU, K. Identification and Spoilage Potential of the Remaining Dominant
31 Microbiota on Food Contact Surfaces after Cleaning and Disinfection in Different
32 Food Industries. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 2, p. 262-275, 2019.
- 33 MANVILLE, E.; KAYA, E. C.; YUCEL, U.; BOYLE, D.; TRINETTA, V. Evaluation of
34 *Listeria monocytogenes* biofilms attachment and formation on different surfaces
35 using a CDC biofilm reactor. **International Journal of Food Microbiology**, v. 399, p.
36 110251, 2023.
- 37 MARCHELLO, C. S.; BIRKHOLO, M.; CRUMP, J. A. Complications and mortality of
38 typhoid fever: a global systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v.
39 81, n. 6, p. 902-910, 2020.

- 1 MARTÍNEZ, L. S.; ÁLVAREZ, E. G.; ÁLVAREZ, P. Á.; ZAPATA, M. R. Infecciones
2 por *Salmonella*. Fiebre tifoidea y salmonelosis no tifoideas. **Medicine-Programa de**
3 **Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 9, n. 53, p. 3439-3448, 2006.
- 4 MARTINEZ, R. C. R; DO MONTE, D. F. M.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.
5 *Salmonella* spp. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. (eds.). **Microbiología**
6 **dos Alimentos (2ª edición)**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2023. p. 83-89.
- 7 MATA, E. E.; MEJÍA, L.; VIILACÍS., J. E.; ALBAN, V.; ZAPATA, S. Detection and
8 genotyping of *Listeria monocytogenes* in artisanal soft cheeses from
9 Ecuador. **Revista argentina de microbiología**, v. 54, n, 1, p. 101-110, 2022.
- 10 MORALES, P. A.; AGUIRRE, J. S.; TRONCOSO, M. R.; FIGUEROA, G.
11 O. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas* spp. present in
12 spoiled poultry fillets sold in retail settings. **LWT**, v. 73, p. 609-614, 2016.
- 13 MØRETRØ, T., SCHIRMER, B. C., HEIR, E., FAGERLUND, A., HJEMLI, P.,
14 LANGSRUD, S. Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may
15 enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. **International**
16 **Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 215-224, 2017.
- 17 MOURA, G.; TOMBORELLI, P.; CARVALHO, R. C.; SIGARINI, C.; CARVALHO, F.;
18 VIEIRA, B.; FIGUEIREDO, E. E. *Listeria monocytogenes* and other species as
19 persistent contaminants in the processing of chicken meat. **Journal of Applied**
20 **Poultry Research**, v. 28, n. 2, p. 470-478, 2019.
- 21 NAHAR, S.; HA, A. J. W.; BYUN, K.H.; HOSSAIN, M.I.; MIZAN, M. F. R.; HA, S.D.
22 Efficacy of flavourzyme against *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, and
23 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on food-contact surfaces. **International Journal**
24 **of Food Microbiology**, v. 336, p. 108897, 2021.
- 25 OBE, T.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, W.; ZHANG, L.; MCDANIEL, C.; KIESS,
26 A. Prevalence of *Salmonella enterica* on poultry processing equipment after
27 completion of sanitization procedures. **Poultry science**, v. 99, n. 9, p. 4539-4548,
28 2020.
- 29 OBE, T.; RICHARDS, A. K.; SHARIAT, N. W. Differences in biofilm formation of
30 *Salmonella* serovars on two surfaces under two temperature conditions. **Journal of**
31 **Applied Microbiology**, v. 132, n. 3, p. 2410-2420, 2022.
- 32 ORSI, R. H.; DEN BAKKER, H.C.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages:
33 Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal**
34 **of Medical Microbiology**, v. 301, n. 2, p. 79-96, 2011.
- 35 O'SULLIVAN, D. J.; GIBLIN, L.; MCSWEENEY, P. L.; SHEEHAN, J. J.; COTTER, P.
36 D. Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality
37 defects. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 1-15, 2013.
- 38 PANG, X.; YUK, H. Effects of the colonization sequence of *Listeria monocytogenes*
39 and *Pseudomonas fluorescens* on survival of biofilm cells under food-related
40 stresses and transfer to salmon. **Food microbiology**, v. 82, p. 142-150, 2019.

- 1 RAHI, P.; VAISHAMPAYAN, P. MALDI-TOF MS application in microbial ecology
2 studies. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1-4, 2020.
- 3 RAIMUNDO, I. T.; MANINI, D. L.; SILVA, M. V.; SARTORI, D.; DE SOUZA, B. M. S.
4 Monitoramento de micro-organismos mesófilos em linha de abate de bovinos em
5 abatedouro-frigorífico sob fiscalização estadual. **Brazilian Journal of Development**,
6 v. 7, n. 1, p. 5685-5693, 2021.
- 7 RICKE, S. C. Poultry food safety and foodborne illness. *In*: DIKEMAN, M. E. (ed.).
8 **Encyclopedia of meat sciences (Third edition)**. Oxford: Elsevier, 2023. p. 47-55.
- 9 ROCOURT, J.; ESPAZE, E. P.; MINCK, R.; HUBERT, B.; COURTIEU, A. L. Cluster
10 of listeriosis isolates with different serovar and phagovar characteristics. **Lancet**, v. 2,
11 p. 1217-1218, 1989.
- 12 RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R. D.; RIZZO, N. N.; FERREIRA, D.; OLIVEIRA, A.
13 P. D.; LEVANDOWSKI, R.; WEBBER, B.; NASCIMENTO, V. P. D. ATP-
14 Bioluminescence and conventional microbiology for hygiene evaluation of cutting
15 room surfaces in poultry slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p. 1-6,
16 2018.
- 17 ROVIRA, J.; DIEZ, A. M.; MELERO, B. Processing Plant Sanitation. *In*: TOLDRÁ, F.;
18 HUI, Y. H.; ASTIASARÁN, I.; SEBRANEK, J. G.; TALON, R. (ed.). **Handbook of**
19 **Fermented Meat and Poultry**. United Kingdom: Wiley- Blackwell, 2014. p. 451-459.
- 20 SARANGI, A. N.; GOEL, A.; AGGARWAL, R. Methods for studying gut microbiota: a
21 primer for physicians. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 9, n. 1,
22 p. 62-73, 2019.
- 23 SILVA, H. R.; GIANOGLU, F. M.; CAMPOS, M. F.; GRACIANO, E. M. A.; TOLEDO,
24 R. C. C. Listeriose: uma doença de origem alimentar pouco conhecida no
25 Brasil. **Higiene alimentar**, v. 30, n. 262-263, p. 17-20, 2016.
- 26 SOARES, V. M.; VIANA, C.; PEREIRA, J. G.; DESTRO, M. T.; NERO, L. A.; DOS
27 SANTOS BERSOT, L.; PINTO, J. P. D. A. N. Absence of a continuous water spray
28 system does not influence the microbiological contamination of the conveyor belts in
29 chicken slaughterhouses. **LWT**, v. 97, p. 414-418, 2018.
- 30 STERNIŠA, M.; KLANČNIK, A.; MOŽINA, S. S. Spoilage *Pseudomonas* biofilm with
31 *Escherichia coli* protection in fish meat at 5 °C. **Journal of the Science of Food and**
32 **Agriculture**, v. 99, n. 10, p. 4635-4641, 2019.
- 33 SU, R.; WEN, Y.; PRABAKUSUMA, A. S.; TANG, X.; HUANG, A.; LI, L. Prevalence,
34 antibiotic resistance and virulence feature of *Listeria monocytogenes* isolated from
35 bovine milk in Yunnan, Southwest China. **International Dairy Journal**, v. 144, p.
36 105703, 2023.
- 37 TADIELO, L. E.; DOS SANTOS, E. A. R.; POSSEBON, F. S.; SCHMIEDT, J. A.;
38 JULIANO, L. C. B.; CERQUEIRA-CÉZAR, C. K.; DE OLIVEIRA, J. P.; SAMPAIO, A.
39 N. C. E.; MELO, P. R. L.; CARON, E. F. F.; PINTO, J. P. A. N.; BERSOT, L. S.;
40 PEREIRA, J. G. Characterization of microbial ecology, *Listeria monocytogenes*, and

- 1 *Salmonella* sp. on equipment and utensil surfaces in Brazilian poultry, pork, and dairy
2 industries. **Food Research International**, v. 173, p. 113422, 2023a.
- 3 TADIELO, L. E.; DOS SANTOS, E. A. R.; POSSEBON, F. S.; SCHMIEDT, J. A.;
4 ORISIO, P. H. S.; JULIANO, L. C. B.; CERQUEIRA-CÉZAR, C. K.; PINTO, J. P. A.
5 N.; PEREIRA, J. G.; BERSOT, L. S. Preoperational cleaning processes interfere with
6 microbial ecology and presence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on
7 food conveyor belts of a poultry slaughterhouse in Brazil. **LWT**, v. 184, p. 115037,
8 2023b.
- 9 TAGAR, S.; QAMBRANI, N. A. Avaliação da qualidade bacteriológica da carne de
10 frango e das superfícies de contato com a carne quanto à presença de bactérias-
11 alvo e determinação da resistência a antibióticos de *Salmonella* spp. No
12 Paquistão. **Controle Alimentar**, v. 151, p. 109786, 2023.
- 13 TANG, X.; FLINT, S. H.; BROOKS, J. D.; BENNETT, R. J. Factors affecting the
14 attachment of micro-organisms isolated from ultrafiltration and reverse osmosis
15 membranes in dairy processing plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n.
16 2, p. 443-451, 2009.
- 17 TORTORELLO, M. L. Indicator organisms for safety and quality—uses and methods
18 for detection: minireview. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 6, p. 1208-1217,
19 2003.
- 20 WAGNER, E. M.; FISCHER, K.; RAMMER, N.; BEER, E.; PALMETZHOFFER, A. L.;
21 CONRADY, B.; ROCH, F. F.; HANSON, B. T.; WAGNER, M.; RYCHLI, K. Bacteria of
22 eleven different species isolated from biofilms in a meat processing environment
23 have diverse biofilm forming abilities. **International Journal of Food Microbiology**,
24 v. 349, p. 109232, 2021.
- 25 WAGNER, E. M.; PRACSER, N.; THALGUTER, S.; FISCHER, K.; RAMMER, N.;
26 POSPÍŠILOVÁ, L.; RYCHLI, K. Identification of biofilm hotspots in a meat processing
27 environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. **International**
28 **Journal of Food Microbiology**, v. 328, n. 108668, 2020.
- 29 WANG, J.; SU, Y.; GU, L.; CHANG, C.; XU, L.; YANG, Y.; LI, J. The inhibition of cell-
30 free supernatants of several lactic acid bacteria on the selected psychrophilic
31 spoilage bacteria in liquid whole egg. **Food Control**, v. 123, p. 107753, 2021.
- 32 WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food Safety. Disponível em:
33 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 24 dez
34 2023.
- 35 WICKRAMASINGHE, N. N.; RAVENSDALE, J.; COOREY, R.; CHANDRY, S. P.;
36 DYKES, G. A. The predominance of psychrotrophic *Pseudomonads* on aerobically
37 stored chilled red meat. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food**
38 **Safety**, v. 18, n. 5, p. 1622-1635, 2019.
- 39 YAN, W.; QIAN, J.; GE, Y.; YE, K.; ZHOU, C.; ZHANG, H. Principal component
40 analysis of MALDI-TOF MS of whole-cell foodborne pathogenic bacteria. **Analytical**
41 **biochemistry**, v. 592, p. 113582, 2020.

- 1 YÜCEL, N.; BALCI, Ş. Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish
2 used for human consumption in Turkey. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 2, p.
3 380-384, 2010.
- 4 ZAREI, M.; YOUSEFVAND, A.; MAKTABI, S.; BORUJENI, M. P.;
5 MOHAMMADPOUR, H. Identification, phylogenetic characterisation and proteolytic
6 activity quantification of high biofilm-forming *Pseudomonas fluorescens* group
7 bacterial strains isolated from cold raw milk. **International Dairy Journal**, v. 109, p.
8 104787, 2020.
- 9 ZENG, H.; DE REU, K.; GABRIËL, S.; MATYHEUS, W.; DE ZUTTER, L.;
10 RASSCHAERT, G. *Salmonella* prevalence and persistence in industrialized poultry
11 slaughterhouses. **Poultry science**, v. 100, n. 4, p. 100991, 2021.
- 12 ZHANG, J.; DING, X.; GUAN, R.; ZHU, C.; XU, C.; ZHU, B., ZHANG, H.; XIONG, Z.;
13 XUE, Y.; TU, J.; LU, Z. Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring
14 bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. **Science of the Total Environment**,
15 v. 618, p. 1254-1267, 2018.
- 16 ZHANG, Y., ZHANG, J., CHANG, X., QIN, S., SONG, Y., TIAN, J., MA, A. Analysis of
17 90 *Listeria monocytogenes* contaminated in poultry and livestock meat through
18 whole-genome sequencing. **Food Research International**, v. 159, p. 111641, 2022.
- 19 ZHAO, X.; ZHAO, F.; WANG, J.; ZHONG, N. Biofilm formation and control strategies
20 of foodborne pathogens: food safety perspectives. **RSC advances**, v. 7, n. 58, p.
21 36670-36683, 2017.
- 22 ZHOU, G.; DONG, P.; LUO, X.; ZHU, L.; MAO, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y. Combined
23 effects of cold and acid on dual-species biofilms of *Pseudomonas fluorescens* and
24 *Listeria monocytogenes* under simulated chilled beef processing conditions. **Food**
25 **Microbiology**, v. 117, p. 104394, 2024.
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35

1

APÊNDICE

TABELA 1- ESPÉCIES E NÚMEROS DE ISOLADOS IDENTIFICADOS ATRAVÉS DO MALDI-TOF MS POR PONTO DE COLETA (continua)

Superfície	Espécies	Nº isolados
Esteira de polipropileno modular 1	<i>Candida parapsilosis</i>	1
	<i>Kocuria rhizophila</i>	1
	<i>Hafnia alvei</i>	1
	<i>Aeromonas media</i>	1
	<i>Micrococcus luteus</i>	1
	<i>Staphylococcus warneri</i>	2
	<i>Citrobacter gillenii</i>	2
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2
	<i>Staphylococcus warneri</i>	2
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
	<i>Lelliottia amnigena</i>	4
<i>Carnobacterium divergens</i>	4	
<i>Rothia endophytica</i>	6	
	Total	30
Esteira de polipropileno modular 2	<i>Hafnia alvei</i>	1
	<i>Micrococcus luteus</i>	1
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	1
	<i>Staphylococcus capitis</i>	1
	<i>Staphylococcus condimenti</i>	1
	<i>Staphylococcus hominis</i>	1
	<i>Staphylococcus warneri</i>	2
	<i>Pantoea agglomerans</i>	2
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4
<i>Serratia liquefaciens</i>	7	
<i>Candida parapsilosis</i>	12	
	Total	33
Mesa de aço inoxidável lisa	<i>Aeromonas veronii</i>	1
	<i>Brachybacterium rhamnosum</i>	1
	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	1
	<i>Lactococcus garvieae</i>	1
	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	1
	<i>Pantoea agglomerans</i>	1
	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1
<i>Serratia fonticola</i>	1	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	

1

TABELA 1- ESPÉCIES E NÚMEROS DE ISOLADOS IDENTIFICADOS ATRAVÉS DO MALDI-TOF MS POR PONTO DE COLETA (continuação)

Superfície	Espécies	Nº isolados
Mesa de aço inoxidável lisa	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1
	<i>Enterobacter kobei</i>	2
	<i>Micrococcus luteus</i>	2
	<i>Citrobacter gillenii</i>	2
	<i>Citrobacter braakii</i>	3
	<i>Candida parapsilosis</i>	9
	Total	29
Esteira de poliuretano lisa	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	1
	<i>Aeromonas media</i>	1
	<i>Citrobacter freundii</i>	1
	<i>Citrobacter murlinae</i>	1
	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	1
	<i>Enterococcus gilvus</i>	1
	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	1
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1
	<i>Hafnia alvei</i>	1
	<i>Citrobacter gillenii</i>	2
	<i>Enterobacter kobei</i>	2
	<i>Raoutella terrigena</i>	2
	<i>Lelliottia amnigena</i>	3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4
	<i>Microvirgula aerodenitrificans</i>	5
	<i>Serratia liquefaciens</i>	5
<i>Aeromonas veronii</i>	7	
<i>Kocuria rhizophila</i>	13	
	Total	53
Esteira de polipropileno modular 3	<i>Enterobacter kobei</i>	1
	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	1
	<i>Micrococcus lylae</i>	1
	<i>Staphylococcus warneri</i>	1
	<i>Microvirgula aerodenitrificans</i>	1
	<i>Serratia marcescens</i>	1
	<i>Microbacterium levaniformans</i>	1
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	1	

1

TABELA 1- ESPÉCIES E NÚMEROS DE ISOLADOS IDENTIFICADOS ATRAVÉS DO MALDI-TOF MS POR PONTO DE COLETA (conclusão)

Superfície	Espécies	Nº isolados
Esteira de polipropileno modular 3	<i>Acinetobacter junni</i>	1
	<i>Micrococcus luteus</i>	2
	<i>Aeromonas veronni</i>	2
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	4
	<i>Lelliottia amnigena</i>	5
	<i>Candida parapsilosis</i>	6
	<i>Kocuria rhizophila</i>	11
	<i>Serratia liquefaciens</i>	13
	Total	52

2