

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

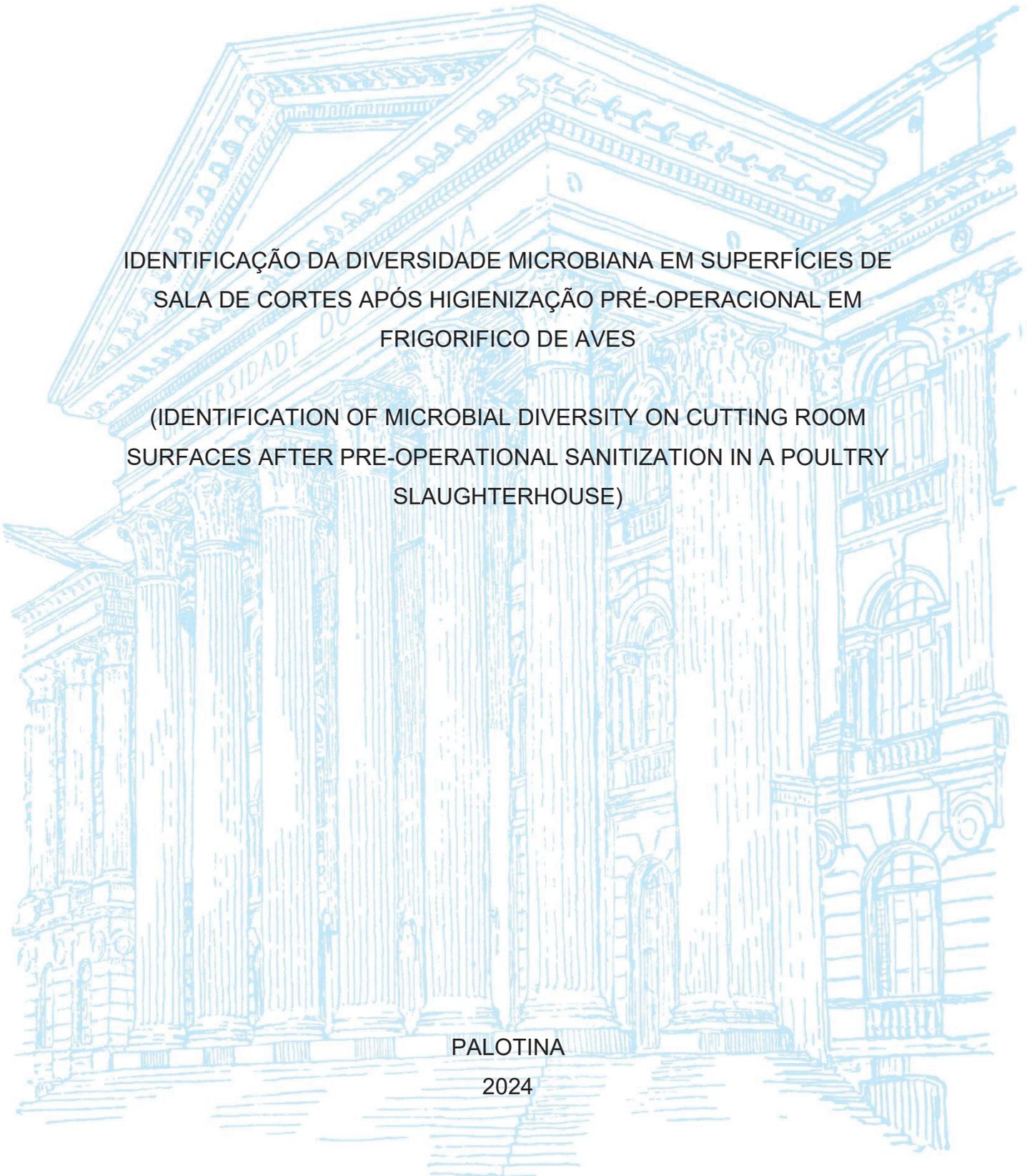
LUIZ GUSTAVO BACH

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/cm<sup>2</sup>, 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/cm<sup>2</sup> 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 <sup>2</sup> ).....	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/cm<sup>2</sup>) PARA CADA GRUPO DE MICRORGANISMO 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

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
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
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>4 CAPÍTULO 1: IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA EM SUPERFÍCIES DE SALA DE CORTES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL EM FRIGORÍFICO DE AVES</b> .....	<b>35</b>
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
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>79</b>

## 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.

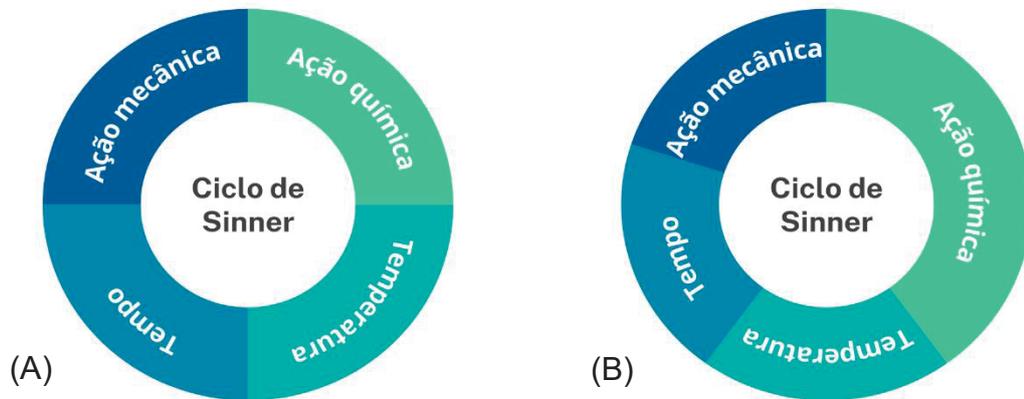
1 O número de etapas da higienização de uma indústria pode variar em função  
2 do tipo de resíduo, pois diferentes detergentes podem ser necessários para remover  
3 de forma eficaz compostos orgânicos e inorgânicos. Em termos gerais, o protocolo de  
4 higienização compreende uma sequência que inclui 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		
<b>Ácido peracético</b>	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
<b>Compostos de amônio quaternário</b>	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/cm<sup>2</sup>  
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 psicrofílos, 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; BIRKHOLO; 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/cm<sup>2</sup>,  
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; ARVANITTOYANNIS, 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 cm<sup>2</sup> (1200 cm<sup>2</sup>), as quais foram divididas  
3 em três tubos Falcon (subamostras), cada um contendo quatro *swabs*, ou seja, 400  
4 cm<sup>2</sup>. Destes, um foi destinado às análises de microrganismos indicadores (aeróbios  
5 mesófilos, psicotróficos 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 cm<sup>2</sup>) 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 psicotróficas, 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/cm<sup>2</sup>.

#### 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 ressuspenso 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 cm<sup>2</sup>) 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 H<sub>2</sub>S, 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 cm<sup>2</sup>.

#### 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 cm<sup>2</sup>) 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,  $\beta$ -hemólise, fermentação de manitol, xilose, dextrose e  
2 ramnose). Finalmente, os resultados foram expressos em presença ou ausência de *L.*  
3 *monocytogenes* em 400 cm<sup>2</sup>.

#### 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  $\mu$ L de ácido  
27 fórmico a 70%, seguido de secagem à temperatura ambiente. Posteriormente,  
28 adicionou-se 1,0  $\mu$ L de solução matriz (ácido  $\alpha$ -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  $36 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  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/cm<sup>2</sup>. 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).

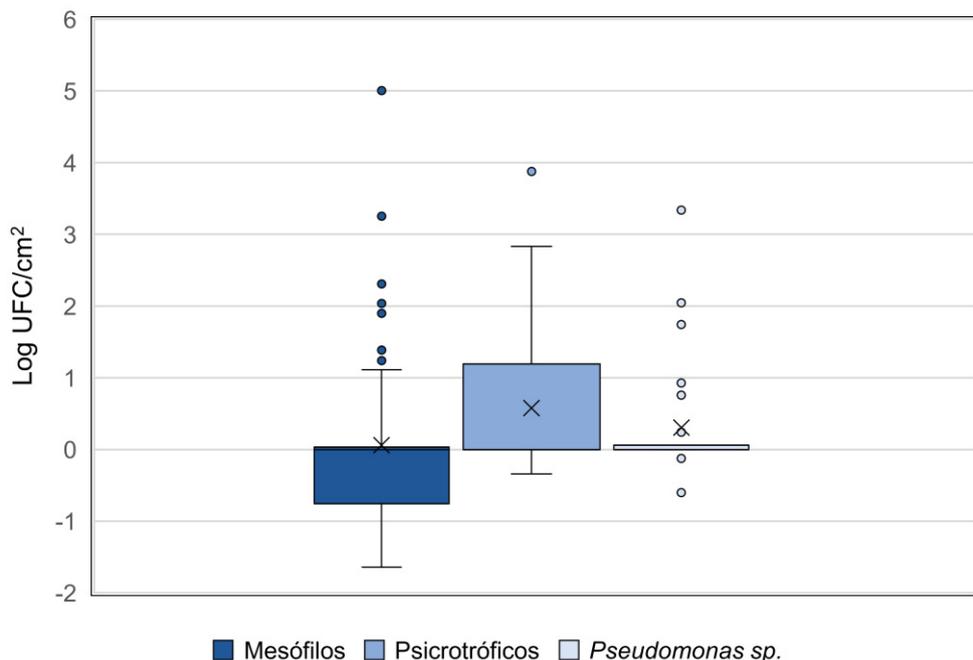
## 5 4.3 RESULTADOS

### 6 4.3.1 Contagem de microrganismos indicadores de higiene

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



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/cm<sup>2</sup>) PARA CADA GRUPO DE MICROORGANISMO EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES MATERIAIS E TIPOS DE ESTEIRA

	Mesófilos	Psicrotróficos	<i>Pseudomonas spp.</i>
<b>Material</b>			
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
<b>Tipo de esteira</b>			
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
<b>Total</b>	<b>32/50</b>	<b>439</b>	<b>219</b>

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

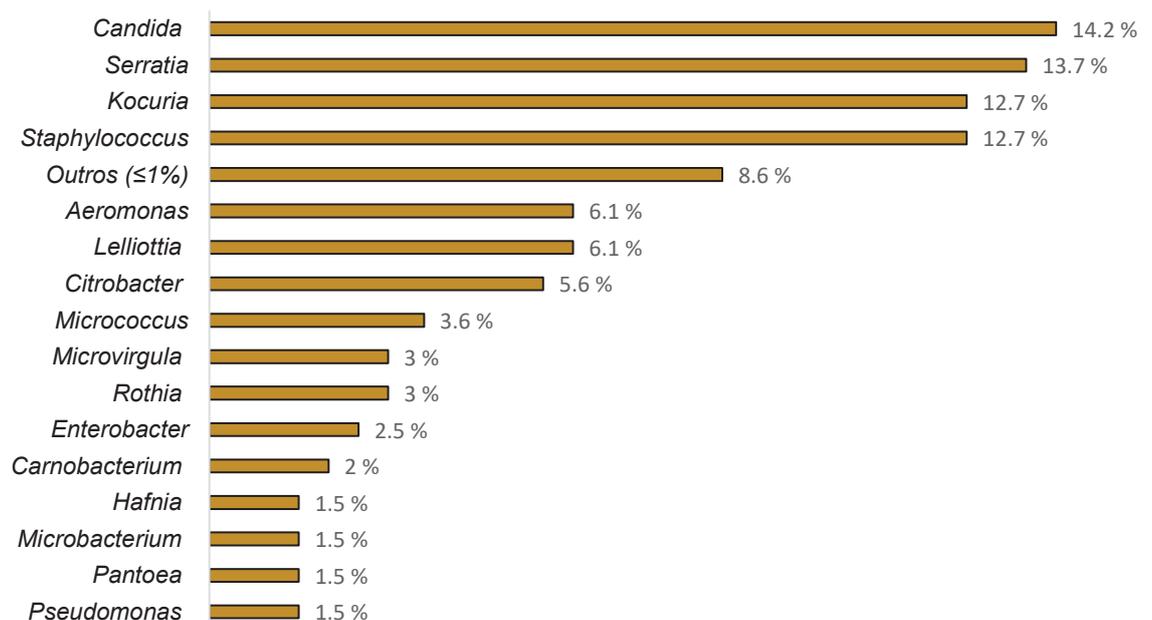
11

12

13

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

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

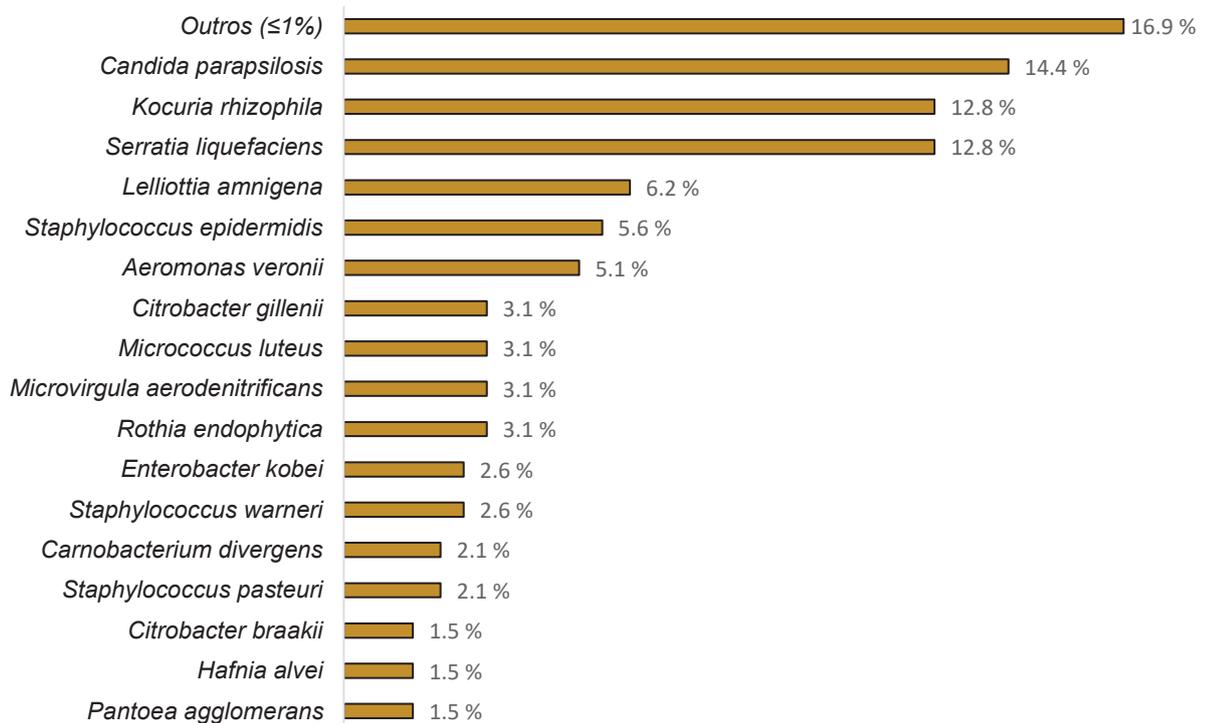


14

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

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

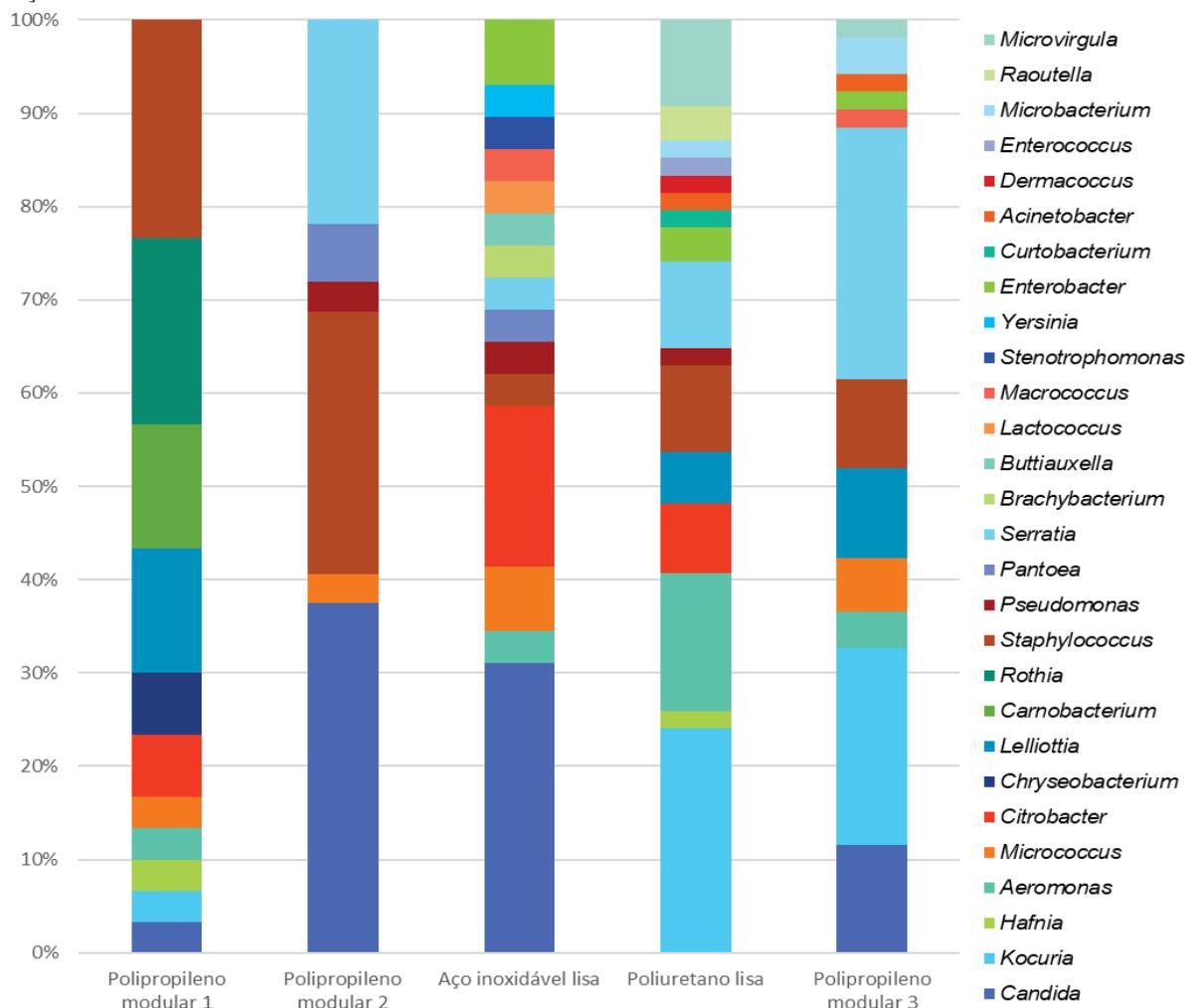
18 Na mesa de aço inoxidável lisa foram identificados 15 gêneros diferentes entre  
 19 os 34 isolados submetidos à análise, com destaque para *Candida* (31%), *Citrobacter*  
 20 (17,2%), *Micrococcus* (6,9%) e *Enterobacter* (6,9%). Nessa superfície foram  
 21 encontradas 16 espécies, das quais *Candida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

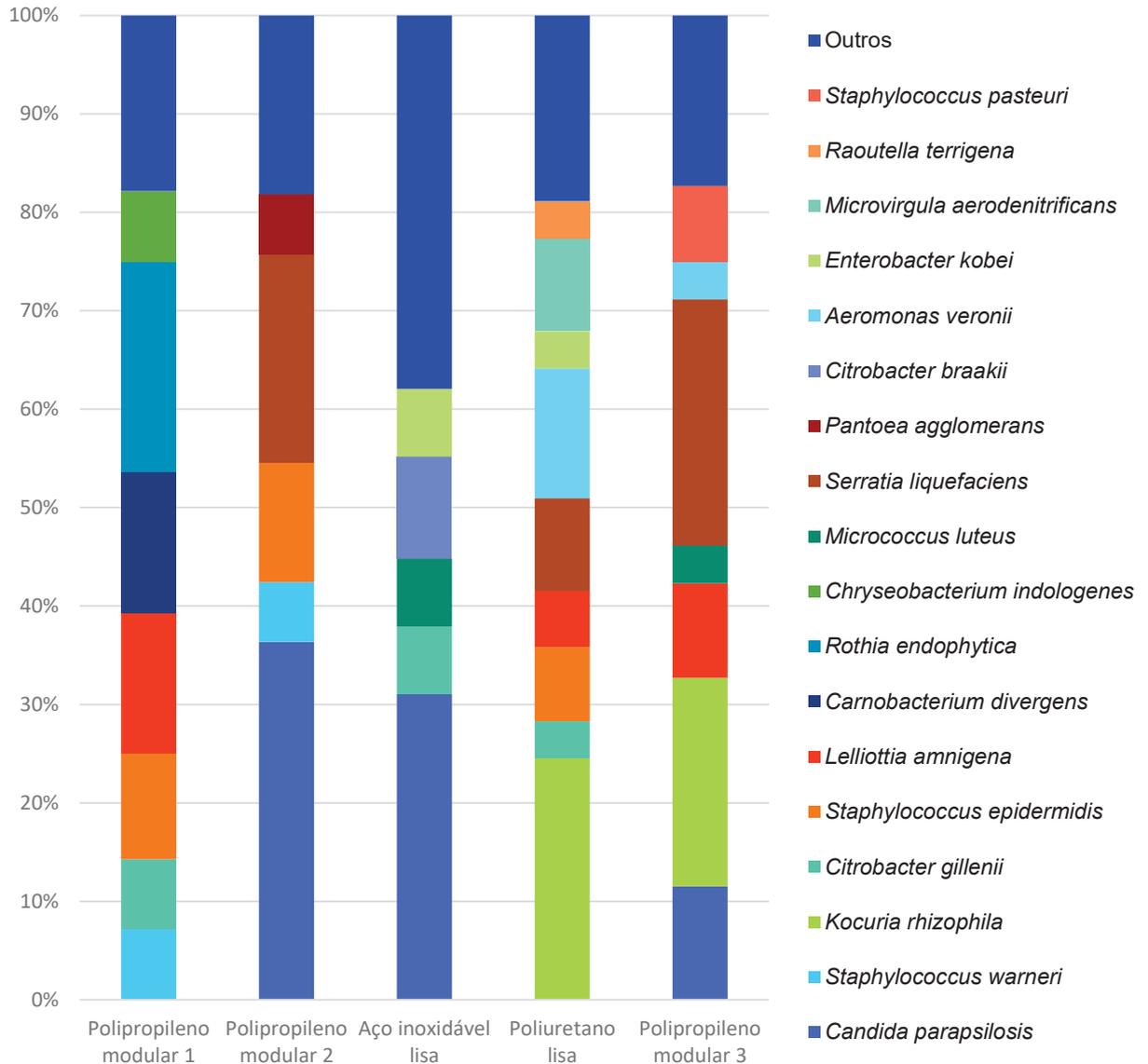
3 Na esteira de poliuretano lisa foram identificados 16 gêneros dentre os 57  
4 isolados analisados, destacando-se *Kocuria* (24%), *Aeromonas* (14,8%), *Serratia*  
5 (9,3%), *Microvirgula* (9,3%) e *Staphylococcus* (9,3%). Adicionalmente, identificaram-  
6 se 19 espécies, com destaque para *Kocuria 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
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>23</b>

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

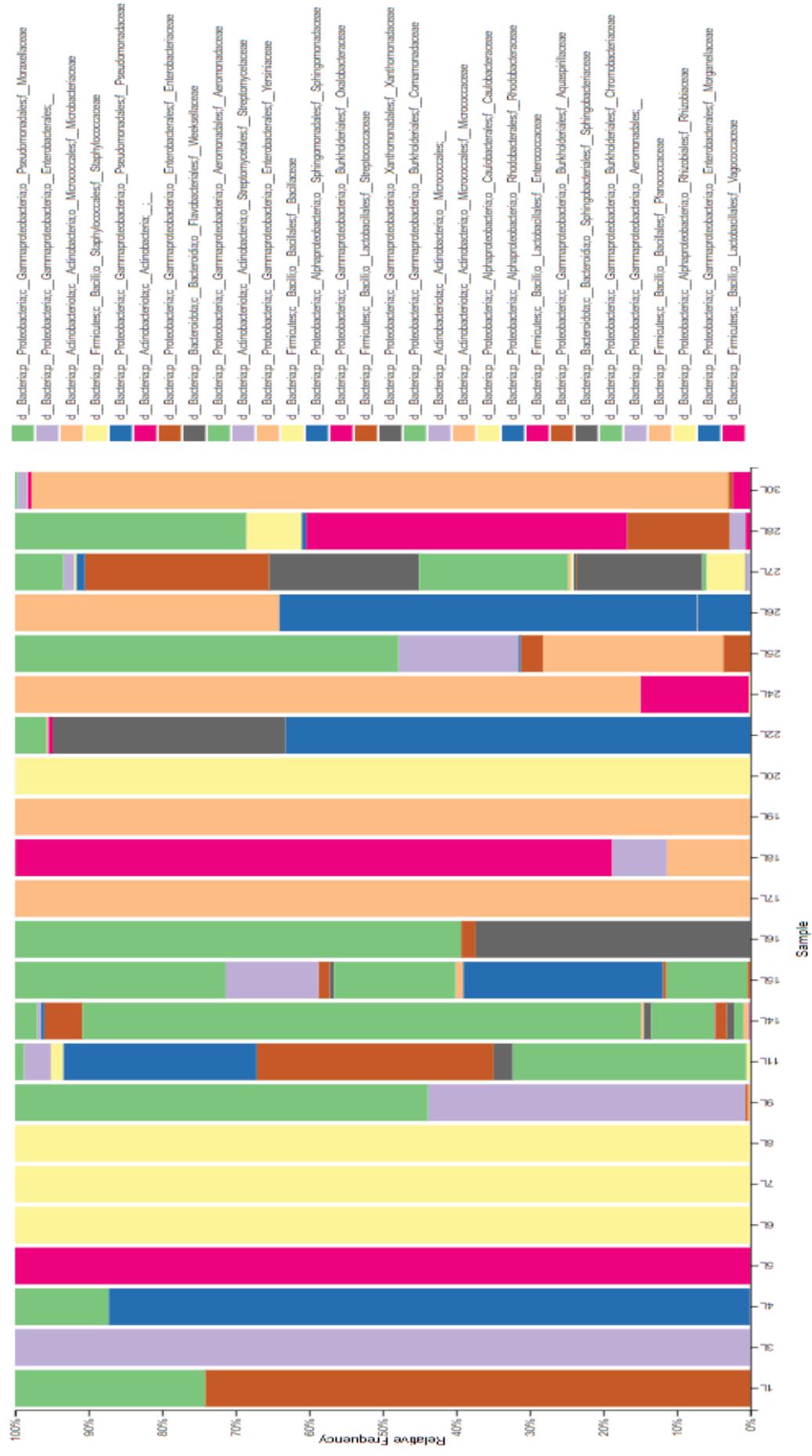


FIGURA 8- FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GÊNEROS DE MICROORGANISMOS DA SALA DE ABATEDOURO DE AVES APÓS HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL



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

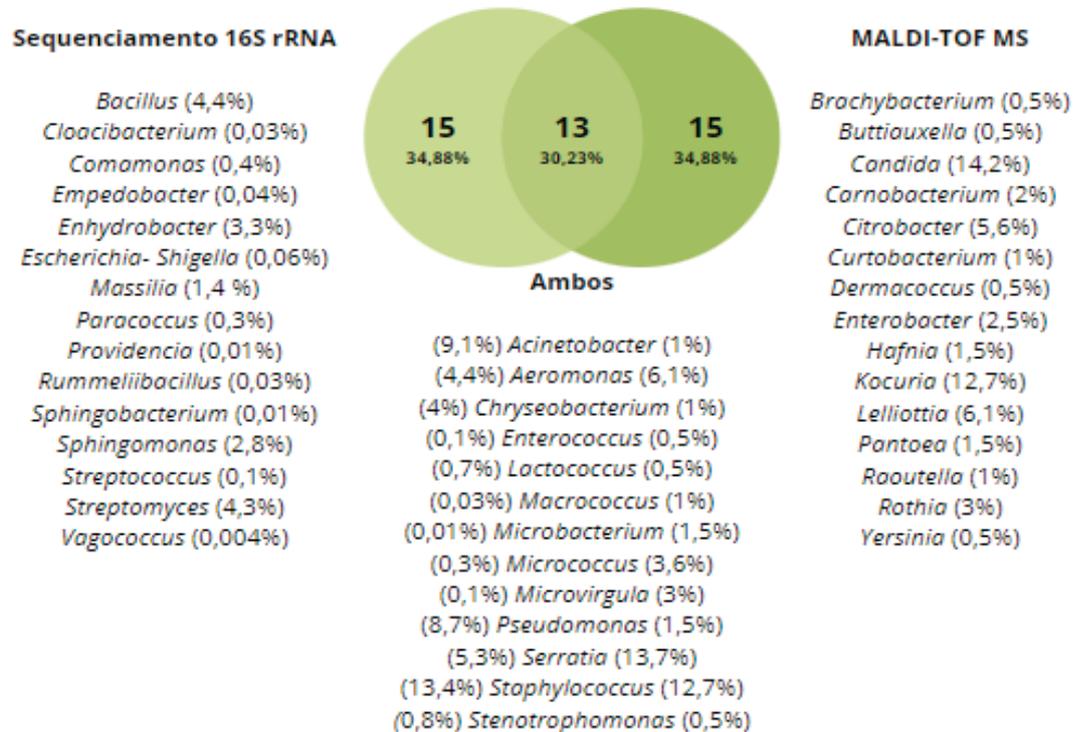
27

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/cm<sup>2</sup> 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/cm<sup>2</sup>,  
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 (1<sup>st</sup> 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-<br/>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  $\beta$ -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.; HEYNDRIKX, 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.; HEYNDRIKX, 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

## REFERÊNCIAS

- 1
- 2 AASE, B.; SUNDHEIM, G.; LANGSRUD, S.; RØRVIK, LM. Occurrence of and a  
3 possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria*  
4 *monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 57-63,  
5 2000.
- 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 ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da**  
10 **adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412p.
- 11 ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L. D.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C.  
12 C.; MAGALHÃES, M. M. D. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias  
13 psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2250-  
14 2255, 2008.
- 15 ASHRAFUDOULLA, M.; NA, K. W.; BYUN, K.H.; KIM, D.H.; YOON, J.W.; MIZAN,  
16 M.F.R.; KANG, I. Isolamento e caracterização de *Salmonella* spp. de alimentos e  
17 superfícies de contato com alimentos em uma fábrica de processamento de  
18 frango. **Poultry Science**, v. 100, n. 8, pág. 101234, 2021.
- 19 BAKIN, B. C.; MCGOVERN, C. J.; MELENDEZ, M.; KESSLER, C.; CRITZER, F.;  
20 ROCK, C. M.; BUCHANAN, R. L.; SCHAFFNER, D. W.; DANYLUK, M. D.;  
21 KOWALCYK, B. B.; MORGAN, K. M.; STRAWN, L. K.; HAMILTON, A. M. Ranking  
22 Food Safety Priorities of the Fresh Produce Industry in the United States. **Journal of**  
23 **Food Protection**, v. 86, n. 12, p. 100167, 2023.
- 24 BERNARDES, P. C.; ARAÚJO, E. A.; DOS SANTOS, A. C. P.; FIALHO JÚNIOR, J.  
25 F. Q.; LELIS, C. A.; DE ANDRADE, N. J. Work of adhesion of dairy products on  
26 stainless steel surface. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1261-1268,  
27 2012.
- 28 BESSER; J.M. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. **Food**  
29 **Microbiology**, v. 71, p. 55-59, 2018.
- 30 BÍSCOLA, V.; FRANCO, B. D. G. M. Microrganismos indicadores e critérios  
31 microbiológicos. *In*: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. (eds.). **Microbiologia**  
32 **dos Alimentos (2ª edição)**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2023. p. 27-38.
- 33 BOHRZ, D. D. A. S.; WEBBER, B.; VANCIN, F. R.; DAROIT, L.; PILOTTO, F.;  
34 SANTOS, L. R. D.; RODRIGUES, L. B. Quantificação de *Staphylococcus aureus* e  
35 bactérias mesófilas aeróbias para avaliar higienização de equipamentos de ordenha.  
36 **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, p. 1696-1701, 2019.
- 37 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto Nº 9.013, de**  
38 **29 de março de 2017**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos  
39 de Origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2017a.

- 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 psicrotóxicos 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 (1<sup>st</sup> 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	
	<b>Total</b>	<b>30</b>
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	
	<b>Total</b>	<b>33</b>
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
	<b>Total</b>	<b>29</b>
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	
	<b>Total</b>	<b>53</b>
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)

<b>Superfície</b>	<b>Espécies</b>	<b>Nº isolados</b>
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
	<b>Total</b>	<b>52</b>

2