

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA ZARPELON ANHALT BRAGA

DIVERSIDADE MICROBIANA AVALIADA PELAS TÉCNICAS MALDI-TOF MS  
E SEQUENCIAMENTO DO 16S EM SUPERFÍCIES HIGIENIZADAS DE  
FRIGORÍFICO DE PEIXE

PALOTINA

2024

GABRIELA ZARPELON ANHALT BRAGA

DIVERSIDADE MICROBIANA AVALIADA PELAS TÉCNICAS MALDI-TOF MS  
E SEQUENCIAMENTO DO 16S EM SUPERFÍCIES HIGIENIZADAS DE  
FRIGORÍFICO DE PEIXE

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 de 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.

B813 Braga, Gabriela Zarpelon Anhalt  
Diversidade microbiana avaliada pelas técnicas MALDI-TOF MS e sequenciamento do 16s em superfícies higienizadas de frigorífico de peixe = (Microbial diversity assessed by maldi-tof ms and 16s sequencing techniques on sanitized surfaces of a fish slaughterhouse / Gabriela Zarpelon Anhalt Braga. – Palotina, PR, 2024.

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

1. Adesão microbiana. 2. Biofilmes. 3. Microbiota ambiental.  
I. Bersot, Luciano Dos Santos. II. Universidade Federal do Paraná.  
III. Título.

CDU 639.6



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -  
40001016077P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GABRIELA ZARPELON ANHALT BRAGA** intitulada: **Diversidade microbiana avaliada pelas técnicas MALDI-TOF MS e Sequenciamento do 16S em superfícies higienizadas de frigorífico de peixe, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa. A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 25 de Junho de 2024.

Assinatura Eletrônica

25/06/2024 15:03:58.0

LUCIANO DOS SANTOS BERSOT  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/06/2024 16:02:27.0

FÁBIO SOSSAI POSSEBON

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE EST. PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO)

Assinatura Eletrônica

25/06/2024 15:53:16.0

ELISABETE TAKIUCHI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Aos sonhos de criança.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo amparo, glória a Ele pelas incontáveis bênçãos.

Agradeço aos meus pais, Alexandre e Zenise, pela criação amorosa que me permitiu sonhar. Ao meu irmão, Arthur, pelo laço de amor e amizade incondicional que tanto nos orgulhamos. Ao meu esposo, Daniel, que partilha dessa e de tantas outras conquistas ao sermos um só. Aos meus sogros, Jorge e Sônia, por me acolherem e me apoiarem. Vocês são a minha conquista mais valiosa, minha família.

Aos companheiros de quatro patas que sempre estiveram ao meu lado, com o olhar mais puro e compreensivo que possa existir. Ser capaz de sentir e reconhecer esse carinho é uma verdadeira dádiva.

A todos os amigos, que torcem e vibram genuinamente pela minha felicidade. Ao LACOMA e a todos os colegas com quem dividi os últimos dois anos, assim como estagiários, alunos de graduação e iniciação científica. Obrigada pelo companheirismo, pela força de trabalho e pelo privilégio de conviver com cada um de vocês. Nomeadamente, a minha dupla, Luiz Gustavo. Te admiro e agradeço imensamente pela amizade que criamos através da pesquisa. Estarei sempre aqui por você, assim como você esteve por mim.

Agradeço a todas as instituições, profissionais e docentes que colaboraram com o desenvolvimento desse projeto, IBTEC (Unesp/Botucatu), Qualileite (FMVZ-USP), Universidade Federal do Paraná (UFPR) e o programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Em especial, ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Dos Santos Bersot, que acreditou no meu potencial. Sou grata pela oportunidade, pelo carinho, paciência e tempo dedicados ao meu aprendizado.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

Muito obrigada!

“Maravilhar-se é o primeiro passo para o descobrimento”

LOUIS PASTEUR, 1822-1895

## RESUMO

As indústrias de alimentos estão sujeitas a contaminação superficial, mesmo após os procedimentos de limpeza e desinfecção. A contaminação microbiológica pode ser transferida para os alimentos, propiciando a transmissão de doenças e também a deterioração precoce dos mesmos. Além disso, muitas espécies de microorganismos coexistem nesse mesmo ambiente, podendo formar e interagir através de biofilmes multiespécies. Esse estudo teve o objetivo de identificar e caracterizar a diversidade microbiana existente em uma planta de abate e processamento de peixes logo após os procedimentos de higienização. As amostras foram coletadas em pontos estratégicos, distribuídos ao longo da sala de cortes do abatedouro de peixes, como em esteiras, utensílios e equipamentos industriais que mantinham contato direto com os alimentos. Os isolados obtidos foram avaliados pelas técnicas de MALDI-TOF MS e Sequenciamento do gene 16S rRNA. Ainda, foram submetidos aos testes de adesão em superfícies de aço inoxidável e poliestireno. A pesquisa de *Listeria monocytogenes* também foi realizada, embora não tenha sido verificada durante o período amostral do estudo. Os principais gêneros identificados pela técnica de MALDI-TOF MS foram *Enterobacter* (17,6%), *Acinetobacter* (12,7%), *Staphylococcus* (11,8%), *Rothia* (9,8%) e *Klebsiella* (5,9%), respectivamente. Quanto às espécies, as cinco mais frequentes foram *Rothia endophytica* (10,8%), *Enterobacter asburiae* (10,8%), *Staphylococcus warneri* (6,5%), *Hafnia alvei* (6,5%) e *Providencia rustigianii* (5,4%), respectivamente. Já pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, as principais famílias identificadas foram Staphylococcaceae (18,8%), Moraxellaceae (16,9%), Microbacteriaceae (14,0%), Enterobacteriaceae (12,3%) e Bacillaceae (8,5%). Quanto aos gêneros, os cinco mais frequentes foram *Staphylococcus* (27,7%), *Acinetobacter* (17,2%), *Bacillus* (12,5%), *Pseudomonas* (9,6%) e *Enterococcus* (7,1%), respectivamente. Os isolados foram considerados ligeiramente mais aderentes para a superfície de poliestireno, embora tenham demonstrado alto poder de adesão *in vitro* para ambas as superfícies avaliadas. Apesar do estudo não alcançar diferença estatística suficiente para a diversidade beta, considera-se que a avaliação da diversidade alfa através de um plano amostral mais abrangente do que o utilizado rotineiramente na indústria trouxe informações relevantes sobre a microbiota ambiental desse tipo de planta de processamento de alimentos, ainda pouco estudado.

Palavras-chave: Adesão microbiana; Higiene pré-operacional; Microbiota ambiental; Biofilmes; Indústria de alimentos.

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the microbial diversity present in a fish processing plant after sanitization procedures. The researchers collected samples from various points in the cutting room, including conveyors, utensils, and equipment that came into direct contact with the food. The isolates obtained were subjected to different tests. Adhesion tests were also conducted on stainless steel and polystyrene surfaces. The study did not find the presence of *Listeria monocytogenes* during the sample period. The findings highlight the potential for surface contamination in food industries even after cleaning and disinfection, emphasizing the importance of effective sanitization procedures to prevent the transfer of microbial contamination to food products. The study utilized two techniques, MALDI-TOF MS and sequencing the 16S rRNA gene, to identify the main genera and families of microorganisms present in industrial fish processing environments. By using MALDI-TOF MS, the main genera identified were *Enterobacter* (17,6%), *Acinetobacter* (12,7%), *Staphylococcus* (11,8%), *Rothia* (9,8%) and *Klebsiella* (5,9%). The most frequent species found were *Rothia endophytica* (10,8%), *Enterobacter asburiae* (10,8%), *Staphylococcus warneri* (6,5%), *Hafnia alvei* (6,5%) and *Providencia rustigianii* (5,4%). When sequencing the 16S rRNA gene, the main families identified were Staphylococcaceae (18,8%), Moraxellaceae (16,9%), Microbacteriaceae (14,0%), Enterobacteriaceae (12,3%) and Bacillaceae (8,5%). The most frequent genera found were *Staphylococcus* (27,7%), *Acinetobacter* (17,2%), *Bacillus* (12,5%), *Pseudomonas* (9,6%) and *Enterococcus* (7,1%). The isolates were slightly more adherent to the polystyrene surface and displayed high adhesion power *in vitro* for both surfaces evaluated. These findings highlight the diversity and adhesion abilities of microorganisms in industrial fish processing environments. Although the study did not achieve sufficient statistical difference for beta diversity, it is considered that the evaluation of alpha diversity through a more comprehensive sampling plan than the one routinely used in the industry brought relevant information about the environmental microbiota of this type of food processing plant, still little studied.

Keywords: Microbial adhesion; Cleaning and disinfection; Environmental microbiota; Biofilms; Food industry.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – GÊNEROS E ESPÉCIES DO TOTAL DE 102 ISOLADOS BACTERIANOS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS OBTIDOS EM SUPERFÍCIES QUE MANTINHAM CONTATO DIRETO COM OS PRODUTOS LOGO APÓS A ETAPA DE HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL EM UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE PEIXES .....35
- FIGURA 2 – FAMÍLIAS E GÊNEROS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA EM 28 AMOSTRAS OBTIDAS EM SUPERFÍCIES QUE MANTINHAM CONTATO DIRETO COM OS PRODUTOS LOGO APÓS A ETAPA DE HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL EM UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE PEIXES .....39
- FIGURA 3 – GÊNEROS E ESPÉCIES DOS ISOLADOS CONSIDERADOS ADERENTES PARA A SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE ADESÃO, EM ESCALA DE CORES PARA FRACO, MODERADO E FORTE .....44
- FIGURA 4 – GÊNEROS E ESPÉCIES DOS ISOLADOS CONSIDERADOS ADERENTES PARA A SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE ADESÃO, EM ESCALA DE CORES PARA FRACO, MODERADO E FORTE.....45

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1 – COMPARAÇÃO DAS PROPORÇÕES DE ADESÃO ENTRE AS SUPERFÍCIES DE AÇO INOX E POLIESTIRENO PARA OS 102 ISOLADOS AVALIADOS .....             | 42 |
| TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CONSIDERADOS ADERENTES PARA AÇO INOX E POLIESTIRENO SUBDIVIDIDOS EM ADESÃO FORTE, MODERADA OU FRACA ..... | 43 |
| TABELA 3 – ORIGEM DOS ISOLADOS CONSIDERADOS FORTEMENTE ADERENTES .....  | 46 |
| <b>APÊNDICE</b> – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS DE CONTAGEM EM log UFC/cm <sup>2</sup> .....   | 61 |

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

|           |  |
|-----------|--|
| APT       | - Água peptonada tamponada                                 |
| BHI       | - Caldo infusão cérebro e coração                          |
| DNA       | - Ácido desoxirribonucleico                                |
| DTA       | - Doenças transmitidas por alimentos                       |
| g         | - Aceleração gravitacional                                 |
| IQF       | - <i>Individually Quick Frozen</i>                         |
| LEB       | - Caldo de enriquecimento seletivo para <i>Listeria</i>    |
| MALDI-TOF | - Espectrometria de Massa de Tempo de Voo por Ionização de |
| MS        | Dessorção a Laser Assistida por Matriz                     |
| OTUs      | - <i>Operational Taxonomic Unit</i>                        |
| OXA       | - Ágar <i>Listeria</i> Oxford                              |
| PBS       | - Tampão fosfato salino                                    |
| PCA       | - Ágar padrão para contagem                                |
| rRNA      | - Ácido ribonucleico ribossomal                            |
| TSA       | - Ágar triptona de soja                                    |
| TSB       | - Caldo triptona de soja                                   |

## LISTA DE SÍMBOLOS

© - *Copyright*

® - *Marca registrada*

™ - *trade mark*

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>16</b> |
| 1.1 OBJETIVOS .....   | 17        |
| 1.1.1 Objetivo geral .....  | 17        |
| 1.1.2 Objetivos específicos.....  | 18        |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | <b>19</b> |
| 2.1 HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....   | 19        |
| 2.2 BIOFILMES .....   | 22        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>26</b> |
| 3.1 Amostragem e local de coleta .....  | 26        |
| 3.2 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....   | 27        |
| 3.3 Isolamento de culturas e caracterização da diversidade microbiana pela técnica de MALDI-TOF MS..... | 28        |
| 3.4 Caracterização da diversidade microbiana pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.....                  | 29        |
| 3.5 Determinação da capacidade de adesão .....  | 30        |
| 3.6 Análise estatística .....   | 31        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | <b>33</b> |
| 4.1 Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> .....   | 33        |
| 4.2 Diversidade microbiana pela técnica de MALDI-TOF MS .....   | 34        |
| 4.3 Diversidade microbiana pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.....                                    | 38        |
| 4.4 Capacidade de adesão dos microrganismos.....  | 42        |
| <b>5 CONCLUSÕES</b> .....   | <b>49</b> |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | <b>50</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>51</b> |
| <b>APÊNDICE 1 – CONTAGEM DE MICRORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE</b> .....                             | <b>61</b> |

## 1 1 INTRODUÇÃO

2 O setor agropecuário é um dos grandes responsáveis por impulsionar a  
3 economia do Brasil, contribuindo com o Produto Interno Bruto (PIB) e figurando  
4 destaque na produção e exportação de alimentos (IBGE, 2024). Dividindo espaço  
5 entre a produção de grãos, insumos e a criação de animais, o setor está  
6 testemunhando um crescimento significativo na área da piscicultura. De acordo com  
7 o levantamento da Associação Brasileira da Piscicultura (2024), no intervalo de 2014  
8 a 2023, observou-se um aumento dessa atividade em território nacional, com a  
9 produção saltando de 578.800 toneladas para 887.029 toneladas. Dentre essas, a  
10 tilapicultura representa uma parcela significativa, contribuindo com 579.080 toneladas  
11 no último ano.

12 Trazendo à tona a diferença entre a pesca extrativista e a criação intensiva de  
13 peixes de cultivo, a Tilápia-do-Nilo, cientificamente conhecida como *Oreochromis*  
14 *Niloticus*, emerge como a espécie de maior relevância, especialmente na região Sul  
15 do Brasil (SIDONIO et al., 2012). O país é o quarto maior produtor de tilápia do mundo,  
16 ficando atrás apenas da China, Indonésia e Egito. O estado do Paraná lidera esse  
17 segmento, com uma produção de 209.500 toneladas, seguido por São Paulo, com  
18 75.700 toneladas (PEIXE BR, 2024).

19 Considerando as métricas de consumo *per capita* e a taxa de exportação  
20 atual, que alcança 4,35kg e 6.815 toneladas de peixes de cultivo (PEIXE BR, 2024),  
21 respectivamente, evidenciam-se questões semelhantes às enfrentadas na avicultura  
22 e na suinocultura, atividades de excelência e já consolidadas no país (ABPA, 2024).  
23 A qualidade e a segurança dos alimentos advindos desses setores tornaram-se  
24 essenciais aos processos de produção, visando o controle efetivo em toda a cadeia  
25 alimentar, desde a produção, armazenagem, distribuição e consumo do alimento *in*  
26 *natura* ou processado (CARDOSO; TESSARI, 2008).

27 Nesse contexto, sabe-se que a carne e seus derivados podem ser facilmente  
28 contaminados durante o beneficiamento, favorecendo a multiplicação de  
29 microrganismos. Durante esse processo, há uma enorme variedade de fontes de  
30 contaminação, como ar, água, fezes, vísceras, equipamentos, utensílios e até mesmo  
31 o contato humano (DESTRO; RIBEIRO, 2014).

32 Se tratando de saúde pública, doenças causadas por agentes de origem  
33 alimentar são uma grande preocupação. Estima-se que, nos países industrializados,

1 10% da população possa adoecer por esse motivo, sendo que esse número pode ser  
2 ainda maior, dependendo das ferramentas de notificação de cada localidade  
3 (DESTRO; RIBEIRO, 2014). Bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes*,  
4 podem persistir na superfície dos equipamentos industriais, mesmo após os  
5 procedimentos de limpeza e desinfecção (CARPENTIER; CERF, 2011).

6 Além disso, entende-se que a relação estabelecida entre os microrganismos,  
7 não necessariamente patogênicos, pode favorecer mecanismos de adesão às  
8 superfícies e de resistência aos produtos utilizados na etapa de desinfecção  
9 (FAGERLUND; LANGSRUD; MØRETRØ, 2011). Ressalta-se, também, que a  
10 diversidade microbiana é única para cada ambiente e material processado, variando  
11 entre indústrias.

12 Procurando entender esse cenário, sugerem-se novas técnicas que possam  
13 contribuir com o monitoramento das entidades oficiais e das equipes de trabalho  
14 envolvidas, como a identificação da diversidade microbiana através da técnica de  
15 Espectrometria de Massa de Tempo de Voo por Ionização de Dessorção a Laser  
16 Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) e o sequenciamento do gene 16S rRNA, mais  
17 avançadas e abrangentes que a contagem padrão de microrganismos indicadores de  
18 higiene (WAGNER et al., 2020; ZHAO et al., 2024).

19 Esse estudo foi desenvolvido diante da necessidade de mais pesquisas sobre  
20 a diversidade microbiana existente no processo de obtenção da proteína animal,  
21 especialmente do pescado, até então considerado minoria na cadeia. Para isso,  
22 avaliou-se a microbiota existente em uma sala de filetagem de tilápias após o  
23 procedimento padrão de higiene pré-operacional, empregando técnicas como MALDI-  
24 TOF MS e sequenciamento do gene 16S rRNA, além da pesquisa de microrganismos  
25 patogênicos como *Listeria monocytogenes*. Ainda, alguns dos isolados obtidos  
26 através da amostragem do estudo foram submetidos aos testes de adesão em placas  
27 de aço inoxidável e de poliestireno, semelhantes aos materiais de origem e sugerindo  
28 o seu potencial de formação de biofilmes.

## 29 1.1 OBJETIVOS

### 30 1.1.1 Objetivo geral

31 Avaliar a diversidade microbiana viável em superfícies que entram em contato  
32 direto com os alimentos em uma sala de filetagem de tilápias após o procedimento de  
33 higiene pré-operacional.

1 1.1.2 Objetivos específicos

- 2 - Avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* nas superfícies abióticas da  
3 sala de cortes de frigorífico de peixes após os procedimentos de higiene operacional  
4 - Utilizar as técnicas de MALDI-TOF MS e sequenciamento do gene 16S rRNA  
5 para avaliação da diversidade microbiana de mesófilos viáveis  
6 - Avaliar a capacidade de adesão dos microrganismos identificados pela  
7 técnica de MALDI-TOF MS em superfícies de poliestireno e de aço inoxidável

## 1 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2 2.1 HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

3 De maneira geral, os protocolos de limpeza e desinfecção adotados na  
4 indústria de alimentos objetivam o controle dos riscos físicos, químicos e biológicos  
5 existentes na cadeia de produção alimentar. São elaborados para estabelecer e  
6 manter um ambiente limpo para a produção, beneficiamento, armazenamento e  
7 distribuição de alimentos, representando um dos instrumentos mais importantes para  
8 garantir alimentos seguros e de qualidade à população (KAKURINOV, 2014;  
9 SANSEBASTIANO; ZONI; BIGLIARDI, 2007; STANGA, 2010).

10 Por definição, tem-se que a limpeza é a completa remoção dos resíduos  
11 provenientes do processo, podendo contar com o auxílio de detergentes e/ou  
12 componentes químicos apropriados e métodos físicos de retirada. Já a desinfecção  
13 diz respeito à redução, através de agentes químicos ou métodos físicos, dos  
14 microrganismos presentes no ambiente ou na superfície em questão, alcançando um  
15 nível que não comprometa a segurança e a qualidade dos alimentos. Enquanto que a  
16 sanitização ou higienização trata do conjunto dessas práticas (BERK, 2013; BRASIL,  
17 2002; KAKURINOV, 2014).

18 Nas indústrias brasileiras, a Higienização Industrial e Operacional é exigida  
19 pela legislação e pelas regulamentações do Ministério da Agricultura e Pecuária  
20 (MAPA) e do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem  
21 Animal (RIISPOA), fazendo parte dos programas de autocontrole. Estes definem os  
22 procedimentos de higienização realizados antes do início das operações, chamado de  
23 pré-operacional, e durante as operações, chamado de operacional (BERTOLINO,  
24 2010; BRASIL, 2017).

25 As variáveis específicas de cada etapa tornam-se essenciais para garantir a  
26 eficácia esperada tanto na limpeza pré-operacional, quanto na limpeza operacional. À  
27 exemplo disso, tem-se o Modelo de Sinner, que explora a relação interdependente e  
28 complementar existente entre a escolha do agente químico, a temperatura da água e  
29 do ambiente, o tempo de ação e a ação mecânica, quando empregada (KUNIGK,  
30 2023; SILVA et al., 2010). Modificações em cada um desses aspectos devem ser feitas  
31 de forma estratégica, considerando o tipo de matéria-prima processada, as condições

1 e os materiais dos equipamentos industriais, a segurança do operador e também a  
2 saúde dos consumidores, evitando resíduos químicos nos alimentos (GAWANDE et  
3 al., 2013; QUINTAVALLA; BARBUTI, 2007).

4 O hipoclorito de sódio e o ácido peracético são dois desinfetantes comumente  
5 utilizados na indústria de alimentos. Ambos são de baixo custo, relativamente baixa  
6 toxicidade e possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana. Além deles,  
7 também é possível mencionar sanitizantes à base de amônia quaternária, iodóforos e  
8 halogênios (FUKUZAKI, 2006; GAWANDE et al., 2013). Em comparação aos métodos  
9 tradicionais de sanitização, estudos recentes exploram novas tecnologias, como óleos  
10 essenciais, bacteriófagos e utilização de nanopartículas. No entanto, fatores  
11 econômicos e políticos influenciam sua implementação, devido à preocupação com o  
12 uso racional de antimicrobianos, o impacto ambiental e a viabilidade de utilização  
13 (DOS SANTOS et al., 2023; FERNANDES et al., 2024; POŁASKA; SOKOŁOWSKA,  
14 2019; RODRIGUES DOS SANTOS et al., 2023).

15 Em todo caso, protocolos de higienização bem estabelecidos atuam de forma  
16 preventiva na indústria, evitando a contaminação dos produtos por microrganismos.  
17 Práticas inadequadas de higiene podem contribuir para surtos de Doenças  
18 Transmitidas por Alimentos (DTA), representando um risco para a saúde pública  
19 (ABEBE; GUGSA; AHMED, 2020; QUINTAVALLA; BARBUTI, 2007). As avaliações  
20 periódicas, chamadas de monitoramento, são ferramentas essenciais para embasar  
21 as decisões das equipes de trabalho e também verificar a eficácia desses protocolos.  
22 Para tal, cada indústria estabelece as análises microbiológicas e os grupos de  
23 microrganismos avaliados, conforme a criticidade de cada atividade e a legislação  
24 aplicável (BRASIL, 2002).

25 A coleta pode ser realizada através de diversas técnicas, como o esfregaço  
26 com auxílio de *swab* estéril e a fricção com o uso de esponja estéril. O conteúdo  
27 amostral é fundamentalmente avaliado por técnicas de microbiologia clássica,  
28 revelando apenas uma parcela dos microrganismos presentes, principalmente  
29 aqueles considerados importantes indicadores de higiene, como mesófilos,  
30 psicrótróficos, *Pseudomonas* spp. e alguns dos considerados patogênicos, como  
31 *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp (DE BOER; BEUMER, 1999; ISMAÏL et al.,  
32 2013).

1 Embora a verificação seja realizada, ainda não há determinações específicas  
2 da legislação brasileira quanto aos limites ou padrões microbiológicos para os  
3 protocolos de Higienização Industrial e Operacional, especialmente em relação aos  
4 equipamentos e utensílios que mantêm contato com os alimentos durante o  
5 beneficiamento (TADIELO et al., 2023). Entretanto, estudos indicam que contagens  
6 de microrganismos indicadores de higiene acima de 10 UFC/cm<sup>2</sup> podem indicar  
7 ineficiência na sanitização e representar uma ameaça à saúde pública, além de causar  
8 danos aos produtos (JULIÃO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018).

9 Além disso, destaca-se a importância que as características das superfícies  
10 desempenham sobre a avaliação de risco. A formação de biofilme depende fortemente  
11 das propriedades da superfície, como a rugosidade, hidrofobicidade ou hidrofili-  
12 cidade, carga superficial, rigidez e composição do material (COOKSEY; WIGGLESWORTH-  
13 COOKSEY, 1995; LORITE et al., 2011), evidenciando as diferenças entre os materiais  
14 mais comumente utilizados na indústria, como o aço inoxidável e os polímeros  
15 plásticos: poliestireno, polipropileno e poliuretano. Superfícies ásperas e com  
16 estrutura porosa são mais propensas à formação de biofilmes, justamente por que  
17 permitem o acúmulo e a retenção de substâncias orgânicas, facilitando o processo de  
18 adesão bacteriana (AMMAR et al., 2015; SPENGLER et al., 2019). Por outro lado,  
19 superfícies mais lisas dificultam o processo de adesão (AMMAR et al., 2015).

20 Em paralelo, o aumento da demanda de mercado e o incremento da  
21 produtividade leva à exaustão da planta de processamento, contribuindo com este  
22 cenário. A microbiota existente nas superfícies que entram em contato com os  
23 alimentos é muito mais diversa do que aquela verificada pelas práticas de  
24 monitoramento da indústria, também pela capacidade de adesão dos microrganismos  
25 e a permanência daqueles que suportam os tratamentos de limpeza e desinfecção.  
26 Quanto maior o tempo de uso de um equipamento, maior a chance de sua  
27 deterioração, apresentando fissuras que facilitam a permanência de bactérias, fungos  
28 e leveduras (HILBERT et al., 2003; KAKURINOV, 2014).

29 Tal qual observado com o uso de fármacos antimicrobianos, tem-se também  
30 a problemática da resistência desenvolvida frente ao uso dos sanitizantes.  
31 Microrganismos que toleram os procedimentos de higiene podem permanecer nas  
32 superfícies através de biofilmes. A formação de biofilmes é um mecanismo de defesa  
33 desses microrganismos, a fim de perpetuar a sua espécie. Por consequência, verifica-

1 se a contaminação das superfícies e também dos alimentos que mantêm contato com  
2 as mesmas (DONAGHY et al., 2019; LANGSRUD et al., 2003).

### 3 2.2 BIOFILMES

4 Os microrganismos desenvolveram diversas estratégias de sobrevivência  
5 para resistirem às diferentes condições impostas pelo ambiente. Dentre elas, a  
6 formação de biofilmes (COSTERTON, 1999; LI et al., 2021). Os biofilmes  
7 compreendem uma comunidade de microrganismos envoltos em substâncias  
8 poliméricas extracelulares (EPS), conhecida como matriz extracelular, composta de  
9 polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, aderidos à uma superfície  
10 biótica ou abiótica (COSTA; RAAIJMAKERS; KURAMAE, 2018). Eles estão presentes  
11 na natureza e também são encontrados em uma variedade de ambientes, como o  
12 industrial. Devido ao seu impacto biológico e sanitário, tem sido amplamente estudado  
13 ao longo dos anos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

14 A formação de biofilmes se dá através de um processo dinâmico, que envolve  
15 a adesão inicial de células microbianas à superfície, seguida pela formação da matriz  
16 extracelular, proliferação e maturação da comunidade microbiana. Durante essas  
17 etapas, o biofilme pode ser considerado reversível ou irreversível. Por fim, depois de  
18 estabelecido, o biofilme maduro propicia a dispersão de bactérias pelo ambiente (SHI;  
19 ZHU, 2009). A matriz, constituída principalmente por polissacarídeos extracelulares,  
20 protege e sustenta a comunidade microbiana, enquanto que proteínas e ácidos  
21 nucleicos atuam na estrutura e estabilidade dos biofilmes (FLEMMING; WINGENDER,  
22 2010). Essa complexa forma de organização em estruturas tridimensionais protege as  
23 células bacterianas perante a alternância de alguns fatores ambientais, como a  
24 temperatura, pH, teor de umidade e a ação de antimicrobianos. Além disso, a  
25 interação entre os microrganismos garante a regulação do metabolismo celular e  
26 também facilita a troca de material genético (ROY et al., 2021).

27 Na indústria de alimentos, biofilmes bacterianos podem se formar nas mais  
28 variadas superfícies, como em equipamentos, utensílios e tubulações. Depois de  
29 aderidos, alguns desses microrganismos podem se desprender e contaminar outras  
30 superfícies ou produtos, desafiando a integridade, a segurança e a qualidade dos  
31 alimentos (CARRASCOSA et al., 2021). Sabe-se que microrganismos presentes em

1 biofilmes são mais resistentes a agentes antimicrobianos, podendo persistir após os  
2 procedimentos de limpeza e desinfecção, acarretando em perdas econômicas e  
3 contribuindo para a veiculação de doenças transmitidas por alimentos (BRIDIER et al.,  
4 2011; LI et al., 2021).

5 Além disso, sugere-se que biofilmes bacterianos formados por diferentes  
6 espécies, comumente observados no ambiente de processamento de alimentos,  
7 representam mais risco no que tange ao desenvolvimento dos mecanismos de  
8 resistência aos agentes antimicrobianos, uma vez que podem proteger umas às outras  
9 durante a aplicação dos sanitizantes ou então favorecer a troca de material genético  
10 entre elas (GIAOURIS et al., 2015). Também se sabe que alguns constituintes têm  
11 sua eficácia reduzida na presença de compostos orgânicos, sendo que a matriz  
12 extracelular pode interagir com os mesmos e causar a inativação dos sanitizantes ou  
13 até mesmo dificultar a penetração do ativo (BRIDIER et al., 2011).

14 Ainda, biofilmes podem agir como camadas isolantes, ocasionando um  
15 processo denominado de corrosão microbiologicamente induzida, prejudicando a  
16 transferência de calor entre as superfícies e reduzindo a vida útil dos equipamentos  
17 industriais (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; MANSFELD, 2007). Ou seja, além da  
18 diminuição da qualidade dos produtos e da ameaça sanitária, há um impacto  
19 econômico considerável dentro das indústrias pela necessidade de substituição das  
20 peças e equipamentos precocemente deteriorados.

21 As propriedades físico-químicas e a topografia das superfícies são  
22 características que influenciam o fenômeno de adesão bacteriana em superfícies  
23 abióticas (MAFU et al., 2011). Além disso, é importante considerar o efeito da corrosão  
24 dos materiais ou do desgaste decorrente do uso de superfícies, podendo levar à  
25 formação ou expansão de sulcos e irregularidades (TANG et al., 2011). Esses são  
26 locais propícios ao crescimento microbiano, comprometendo a eficácia dos  
27 procedimentos de limpeza e desinfecção (HILBERT et al., 2003).

28 Cepas de *Listeria monocytogenes* são frequentemente encontradas em  
29 instalações de refrigeração industrial, muito provavelmente devido à sua habilidade  
30 de multiplicação em baixas temperaturas (MAZAHERI et al., 2021). Já algumas  
31 bactérias do gênero *Salmonella* se aproveitam da existência de estruturas como  
32 flagelos e fímbrias, que favorecem o processo de adesão e a persistência microbiana  
33 (CHIA et al., 2009). Outras, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*,

1 evidenciam o seu potencial deteriorante dos alimentos ou podem indicar falhas nos  
2 protocolos de higiene, respectivamente (ENCISO-MARTÍNEZ et al., 2022; GRAM et  
3 al., 2002).

4 No entanto, a maioria dos estudos realizados *in vitro* trata da formação de  
5 biofilmes de uma só espécie bacteriana, enquanto que a interação existente em  
6 biofilmes multiespécies é, na realidade, muito importante (IÑIGUEZ-MORENO;  
7 GUTIÉRREZ-LOMELÍ; AVILA-NOVOA, 2019). Como exemplo, sabe-se que bactérias  
8 consideradas patogênicas são favorecidas pela presença de bactérias consideradas  
9 deteriorantes, exacerbando seus mecanismos de resistência e favorecendo a adesão  
10 microbiana mesmo diante de alternativas de controle (GILBERT; ALLISON; MCBAIN,  
11 2002; LI et al., 2021).

12 Levando isso em consideração, o monitoramento dos procedimentos de  
13 limpeza e a identificação e caracterização da diversidade microbiana existente em  
14 uma instalação industrial parecem contribuir com ações preditivas e com a diminuição  
15 dos danos enfrentados (DE FILIPPIS et al., 2021; DELHALLE et al., 2020). O  
16 monitoramento pode ser realizado pela amostragem de superfícies logo após os  
17 protocolos de higienização, seguida pela identificação e caracterização da diversidade  
18 microbiana existente. Para tal, técnicas como as de MALDI-TOF MS e  
19 sequenciamento do gene 16S são consideradas mais abrangentes (AKIMOWICZ;  
20 BUCKA-KOLENDO, 2020; WAGNER et al., 2020).

21 Em comparação às técnicas de identificação e caracterização empregadas na  
22 microbiologia clássica, como métodos fenotípicos de identificação, o sequenciamento  
23 do gene 16S rRNA alcança resultados precisos, sendo possível identificar bactérias  
24 com perfil fenotípico incomum ou até mesmo aquelas de crescimento fastidioso (WOO  
25 et al., 2008). Já o MALDI-TOF MS é considerado rápido, de alta especificidade e  
26 menos custoso, além de não exigir alto nível de treinamento para realização da  
27 técnica, possibilitando a sua implementação na rotina de monitoramento das  
28 indústrias de alimentos (AKIMOWICZ; BUCKA-KOLENDO, 2020).

29 Na técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser  
30 assistida por matriz (MALDI-TOF MS), a amostra é depositada em um alvo sólido, logo  
31 após ter sido misturada com uma matriz orgânica. A amostra é então irradiada por um  
32 feixe de laser que tem a função de ionizar as moléculas. O campo elétrico formado  
33 acelera os íons resultantes em direção à um detector. O tempo que leva para os íons

1 irem do ponto de ionização ao detector é então medido. Com base no tempo de voo  
2 dos íons, obtêm-se um espectro de massa, trazendo informações sobre a massa  
3 molecular das moléculas presentes na amostra. Para identificar e caracterizar essas  
4 moléculas, este espectro é comparado com bibliotecas de espectros de massa já  
5 conhecidos (CAPRIOLI; FARMER; GILE, 1997; LAY, 2001; SINGHAL et al., 2015).

6 Já o sequenciamento do gene 16S rRNA é utilizado para identificação e  
7 caracterização de microrganismos, principalmente bactérias. Este gene é altamente  
8 conservado em todas as células, mas contém regiões variáveis que são únicas o  
9 suficiente para diferenciar as espécies. Nessa técnica, o DNA é extraído de amostras  
10 bacterianas e a região do gene 16S rRNA é amplificada através da Reação em Cadeia  
11 da Polimerase (PCR). Em seguida, através da tecnologia de Sequenciamento Massivo  
12 de DNA, o DNA amplificado é sequenciado. Para identificar as sequências de  
13 nucleotídeos, os dados do sequenciamento são submetidos à análise de  
14 bioinformática. As sequências de nucleotídeos identificadas são então comparadas  
15 com o banco de dados de sequências de referência, para determinar a identidade  
16 taxonômica dos microrganismos presentes na amostra (DELHALLE et al., 2020;  
17 SCHLOSS et al., 2009). Essa análise permite uma caracterização mais abrangente  
18 das comunidades microbianas, elucidando a diversidade e a composição taxonômica  
19 dos microrganismos presentes em um determinado ambiente (CAUCHIE et al., 2017).

20 Além disso, o sequenciamento do gene 16S rRNA pode ser utilizado para  
21 investigar tanto a diversidade microbiana dentro de uma amostra (alfa diversidade)  
22 quanto as diferenças na composição microbiana entre diferentes amostras (beta  
23 diversidade), evidenciando características sobre a ecologia microbiana e a dinâmica  
24 das comunidades em diferentes habitats (SARANGI; GOEL; AGGARWAL, 2019).

25 Ferramentas como essas podem auxiliar as equipes de trabalho e também os  
26 pesquisadores dessa área do conhecimento, trazendo informações valiosas quanto à  
27 constituição dos biofilmes e a diversidade microbiana existente em um mesmo  
28 ambiente, visando a prevenção da formação dos biofilmes ou então a diminuição dos  
29 seus efeitos na cadeia de produção de alimentos. Em conjunto, há a detecção de  
30 patógenos veiculados por alimentos e água, auxiliando na promoção da saúde  
31 pública.

### 1 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2 3.1 Amostragem e local de coleta

3 A amostragem foi realizada na sala de cortes de um abatedouro frigorífico de  
4 peixes localizado no estado do Paraná. Esse possui registro oficial do Serviço de  
5 Inspeção Federal (SIF) e tem a capacidade de abate de até 150 mil peixes por dia,  
6 majoritariamente da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-nylo), sendo  
7 comercializada nacional e internacionalmente, refrigerada ou congelada.

8 As coletas foram realizadas ao longo de 10 semanas consecutivas, no período  
9 de junho a agosto de 2023. As amostras foram obtidas a partir de *swabs* de superfícies  
10 que mantinham contato direto com os produtos na sala de cortes do estabelecimento.  
11 Cinco pontos de coleta foram escolhidos, a fim de representar as principais etapas do  
12 processamento, sendo:

- 13 a) Esteiras de corte; superfície lisa, de poliuretano, com a função de  
14 conduzir a matéria-prima limpa para a etapa de filetagem.
- 15 b) Tábuas de corte; constituída de polietileno, tendo função de apoio para  
16 a realização da filetagem. Apesar de ser considerada uma superfície lisa,  
17 notavam-se ranhuras decorrentes do tempo de uso e do atrito com  
18 utensílios pontiagudos, como as facas utilizadas nesta etapa.
- 19 c) Máquinas de retirada de pele; maquinário constituído de aço inoxidável  
20 com esteiras de poliuretano. Superfície lisa, com a função de retirada da  
21 pele aderida ao filé de tilápia.
- 22 d) Esteiras elevatórias; maquinário constituído de aço inoxidável e esteira  
23 de característica modular constituída de polímeros plásticos. Possuía a  
24 função de resfriar em água e carregar na vertical o produto pronto até a  
25 esteira de congelamento rápido (IQF).
- 26 e) Esteiras alimentadoras do túnel de IQF; superfície modular, constituída  
27 de polímeros plásticos, com a função de conduzir o produto final pelo  
28 túnel de congelamento rápido (IQF).

29 As amostras foram coletadas com o auxílio de *swabs* e gabaritos estéreis  
30 (10x10cm), através do método de fricção, sob uma superfície delimitada de 100cm<sup>2</sup>,  
31 repetindo-se o processo de coleta por quatro vezes, totalizando uma área de 400cm<sup>2</sup>

1 para cada amostra. Os *swabs* foram acondicionados em dois tubos Falcon distintos,  
2 com quatro *swabs* cada, ambos contendo 10mL de solução salina 0,85%,  
3 suplementada com 0,1% de peptona e 0,5% de polissorbato 80 (Tween® 80, Sigma-  
4 Aldrich) como agente neutralizante.

5 Ao todo, obtiveram-se 100 amostras, sendo 50 destinadas à pesquisa de *L.*  
6 *monocytogenes* e outras 50 destinadas à caracterização da diversidade microbiana  
7 pelas técnicas de MALDI-TOF MS e sequenciamento do gene 16S rRNA, conforme  
8 descrito nos itens 3.2 a 3.4.

9 A rotina de coleta aconteceu sempre após o término da higienização pré-  
10 operacional, no turno da madrugada. As coletas foram distribuídas aleatoriamente,  
11 alternando os dias da semana, de segunda a sexta-feira.

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

### 16 3.2 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

17 A pesquisa de *Listeria monocytogenes* seguiu a metodologia estabelecida  
18 pela ISO 11.290-1 (ISO, 2017), com modificações. Em cada coleta, o tubo Falcon  
19 correspondente era submetido a agitação em vórtex por aproximadamente dois  
20 minutos, visando a extração das células bacterianas aderidas aos *swabs*. Em seguida,  
21 as amostras eram hidratadas com 40mL de Caldo de Enriquecimento de *Listeria* (LEB,  
22 Difco™) e incubadas a  $30\pm 1^\circ\text{C}/24\pm 2\text{h}$ . Após esse período, uma alíquota de 0,1mL era  
23 transferida para o caldo Fraser (Difco™) e incubado a  $37\pm 1^\circ\text{C}/24$  a 48h. Dos tubos  
24 com multiplicação característica, ou seja, apresentando uma coloração enegrecida em  
25 razão da hidrólise da esculina, transferia-se uma alçada para placas de Petri com Ágar  
26 *Listeria* Oxford (OXA, Oxoid™), incubados a  $37\pm 1^\circ\text{C}/48\pm 2\text{h}$ . Caso houvesse colônias  
27 características, essas eram purificadas em Ágar Triptona de Soja suplementado com  
28 0,6% de Extrato de Levedura (TSA-YE, Kasvi™) e, posteriormente, eram submetidas  
29 a identificação e confirmação bioquímica (catalase, motilidade,  $\beta$ -hemólise,  
30 fermentação de manitol, xilose, dextrose e ramnose). Os resultados foram expressos  
31 em presença ou ausência de *L. monocytogenes* em 400cm<sup>2</sup>.

### 1 3.3 Isolamento de culturas e caracterização da diversidade microbiana pela técnica 2 de MALDI-TOF MS

3 Em cada coleta, o tubo Falcon correspondente foi submetido à agitação em  
4 vórtex por aproximadamente dois minutos, objetivando a extração dos  
5 microrganismos aderidos aos *swabs*. Em seguida, realizaram-se três diluições  
6 seriadas em solução salina 0,85%.

7 A obtenção dos isolados para avaliação pela técnica de MALDI-TOF MS  
8 ocorreu a partir do cultivo em profundidade de 1mL de cada diluição em placa de Petri  
9 com Ágar Padrão para Contagem (PCA, Kasvi™), incubadas a  $36\pm 1^\circ\text{C}/48\pm 2\text{h}$ . Após  
10 o cultivo, 10% das colônias isoladas presentes em placas que contivessem até 150  
11 colônias foram selecionadas, priorizando aquelas que apresentassem diferentes  
12 morfologias, localizadas tanto na superfície do ágar, quanto no interior.

13 As colônias selecionadas foram transferidas para tubos contendo caldo BHI  
14 (Oxoid™). Os tubos foram incubados a  $37\pm 1^\circ\text{C}/24\pm 2\text{h}$  e, após, transferidos para micro  
15 tubos individuais com Ágar TSA (Kasvi™) e outros com Caldo Triptona de Soja (TSB,  
16 Kasvi™) com 20% de glicerol seguido de estocagem a  $4^\circ\text{C}$  e  $-28^\circ\text{C}$ , respectivamente.

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. Os isolados mantidos em  
20 congelamento foram recuperados em caldo BHI e semeados pela técnica de  
21 esgotamento superficial em placas de Petri com TSA, incubados a  $37\pm 1^\circ\text{C}/24\pm 2\text{h}$ ,  
22 com o intuito de se obter colônias isoladas.

23 A extração de proteínas ribossômicas seguiu o protocolo descrito por  
24 BARCELOS et al., (2019) onde cada colônia foi transferida, em triplicata, para uma  
25 placa alvo de aço polido MSP 96 (Bruker Daltonik), utilizando um palito. Em seguida,  
26 aplicou-se 1,0 µl de ácido fórmico (70%), aguardando a secagem à temperatura  
27 ambiente. Posteriormente, adicionou-se 1,0 µl de solução matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-  
28 hidroxicinâmico diluído com 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético),  
29 seguido por nova secagem à temperatura ambiente. Para leitura das placas, foram  
30 utilizadas as instruções de identificação de extração de proteínas (Bruker Daltonik,  
31 Bremen, Alemanha) e os espectros analisados no Biotyper 3.0.

1 Já a calibração do MALDI-TOF MS foi realizada utilizando-se solução padrão  
2 de proteína, Bacterial Test Standard (BTS, Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha),  
3 sendo que a análise de espectrometria de massa foi executada com o instrumento  
4 Microflex Bruker.

5 A aquisição de dados foi realizada por meio do software FlexControl 3.3  
6 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). Foram realizados 240 disparos de laser para  
7 cada espectro, sendo coletados na faixa de massa entre 2.000 e 20.000 Da. Os  
8 resultados foram então comparados com dados da biblioteca de referência MALDI  
9 Biotyper (MBT) (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). Os extratos proteicos  
10 originaram conjuntos de picos proteicos, os quais foram comparados com a biblioteca  
11 de referência do software MBT 4.1.7. Por último, os resultados entre 1,7 e 2,0 foram  
12 julgados confiáveis apenas para gênero, enquanto os resultados  $\geq 2$  foram  
13 considerados confiáveis para identificação de gênero e espécie.

#### 14 3.4 Caracterização da diversidade microbiana pelo sequenciamento do gene 16S 15 rRNA

16 Para esta análise, utilizaram-se as mesmas subamostras descritas no item  
17 3.3. Nesse caso, 0,1mL das subamostras foram inoculadas pela técnica de  
18 semeadura *spread plate* em placas de Petri contendo Ágar PCA (Kasvi™) e, após a  
19 incubação a  $36\pm 1^\circ\text{C}/24\pm 2\text{h}$ , o crescimento em placa foi colhido através da adição de  
20 3 mL de solução salina estéril sobre as culturas, que foram removidas do ágar através  
21 de raspagem com auxílio de pipeta com ponteira estéril e homogeneização. Após essa  
22 etapa, o conteúdo foi transferido para tubos de 5mL e congelado a  $-20^\circ\text{C}$ .

23 A análise de sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizada pelo Instituto  
24 de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de  
25 Botucatu. A extração do material genético foi realizada através do kit comercial  
26 MagMAX CORE *Nucleic Acid Purification Kit* (Applied Biosystems™). Então, as  
27 amostras extraídas passaram por análise de pureza, utilizando o equipamento  
28 NanoDrop® ND – 1000 UV-Vis (Thermo Fischer). Já a quantificação dos materiais  
29 extraídos foi realizada por meio do fluorômetro Invitrogen Qubit 2.0 (Thermo Fisher)  
30 utilizando o kit Qubit® 1X dsDNA HS (*High Sensitivity*) (Thermo Fisher). Essa

1 sequência de procedimentos garantiram a obtenção de amostras de alta qualidade,  
2 aferindo a concentração precisa do material genético para as análises subsequentes.

3 Para a identificação através do sequenciamento, foram utilizadas as regiões  
4 V3 e V4 do gene 16S rRNA. O mesmo foi conduzido no equipamento MiSeq (Illumina  
5 Inc., EUA), empregando o kit V3 de 600 ciclos. O preparo das bibliotecas consistiu na  
6 utilização de *primers* para a amplificação da região V3-V4 do gene 16S rRNA, sendo:  
7 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-  
8 3';5'TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAA  
9 TCC-3', segundo KLINDWORTH et al., (2013). As etapas de preparo seguiram as  
10 instruções do protocolo *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* proposto  
11 pela Illumina (Illumina Inc., EUA).

12 As análises de bioinformática foram realizadas no software QIIME2, a fim de  
13 processar as sequências (BOLYEN et al., 2019). Enquanto que o programa DEBLUR  
14 (AMIR et al., 2017) foi utilizado para remover *reads* de qualidade inferior e categorizar  
15 as leituras em *features*. Para alinhamento e análise filogenética entre as *features*  
16 foram utilizados dois softwares, o MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier*  
17 *Transform*; (ROZEWICKI et al., 2019) e FastTree (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2010). As  
18 métricas de diversidade alfa e beta foram obtidas por diferentes métodos e inferências  
19 estatísticas (*Shannon's diversity index, Observed Features, Faith's Phylogenetic*  
20 *Diversity* para alfa diversidade; *Evenness e Jaccard distance, Bray-Curtis distance,*  
21 *unweighted UniFrac distance, e weighted UniFrac distance* para beta diversidade), as  
22 quais foram comparadas entre os grupos amostrais utilizando testes não  
23 paramétricos. As *features* foram classificadas taxonomicamente utilizando o banco de  
24 dados SILVA (QUAST et al., 2013) e diferenças nas abundâncias relativas de táxons  
25 foram avaliadas com o ANCOM (MANDAL et al., 2015).

### 26 3.5 Determinação da capacidade de adesão

27 O teste de adesão foi realizado para todos os isolados bacterianos  
28 identificados na análise de MALDI-TOF MS, conforme citado no item 3.3. Os ensaios  
29 foram realizados em microplacas de poliestireno estéreis (Nest®, Kasvi) e de aço  
30 inoxidável esterilizadas, ambas com 96 poços, seguindo a metodologia descrita por  
31 STEPANOVIĆ et al. (2000; 2007).

1 Os isolados foram recuperados em 4 mL de caldo BHI e incubados a  
2  $37\pm 1^\circ\text{C}/24\pm 2\text{h}$ . Depois desse período, os caldos foram ajustados para uma densidade  
3 óptica de 0,5 na escala de McFarland e alíquotas de 200  $\mu\text{l}$  foram transferidas, em  
4 triplicata, para as microplacas de 96 poços. As microplacas foram incubadas a  
5  $37\pm 1^\circ\text{C}/24\pm 2\text{h}$ . Como controle negativo, 12 poços por placa foram preenchidos com  
6 caldo BHI estéril.

7 Após incubação, os poços foram submetidos a três lavagens com 250 $\mu\text{l}$  por  
8 poço de solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,2). As células  
9 aderidas foram fixadas com 200 $\mu\text{l}$  de metanol 99% por 15 minutos e secas à  
10 temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram corados com 200  $\mu\text{l}$  de violeta de  
11 cristal 1% por 15 minutos. O corante foi removido em três etapas de lavagem com  
12 água destilada e as placas foram mantidas à temperatura ambiente até secarem  
13 completamente. Por último, foram adicionados 160  $\mu\text{l}$  de ácido acético glacial 33%,  
14 seguindo-se a realização da absorvância em leitora de microplacas Diatek®, modelo  
15 DR-200B, a 450nm.

16 O teste de adesão foi realizado em duas repetições, para todos os isolados e  
17 para os dois materiais avaliados, poliestireno e aço inoxidável. Os resultados foram  
18 tratados e classificados de acordo com o modelo proposto por STEPANOVIĆ et al.,  
19 (2000) sendo a avaliação média dos resultados de absorvância de cada amostra  
20 (DOa) comparada com a média da absorvância dos controles negativos, acrescido de  
21 três vezes o desvio padrão (DOcn). O grau de adesão foi determinado conforme a  
22 seguinte classificação: não aderente ( $\text{DOa} \leq \text{DOcn}$ ), fracamente aderente ( $\text{DOcn} <$   
23  $\text{DOa} \leq 2 \cdot \text{DOcn}$ ), moderadamente aderente ( $2 \cdot \text{DOcn} < \text{DOa} \leq 4 \cdot \text{DOcn}$ ) e fortemente  
24 aderente ( $4 \cdot \text{DOcn} < \text{DOa}$ ).

25 Por fim, todos aqueles classificados no intervalo de fracamente aderente,  
26 moderadamente aderente e fortemente aderente foram considerados como aderentes  
27 e aqueles classificados no intervalo não aderente, considerados não aderentes.

### 28 3.6 Análise estatística

29 Os dados obtidos foram organizados em planilhas, resultando em um banco  
30 de dados, e submetidos a procedimentos estatísticos. Todas as análises estatísticas  
31 foram realizadas em linguagem R (R CORE TEAM, 2024). Uma análise estatística

1 descritiva foi realizada para compreender, organizar e resumir as variáveis do estudo.  
2 Para as variáveis quantitativas, medidas de tendência central e de dispersão foram  
3 calculadas, e para as variáveis qualitativas, as distribuições de frequências absolutas  
4 e relativas foram obtidas.

5 Para os resultados da identificação por MALDI-TOF MS, as distribuições de  
6 frequências absolutas e relativas dos isolados identificados segundo gênero e família  
7 foram calculadas e exibidas em gráficos de barras ordenadas.

8 O processamento estatístico dos resultados do sequenciamento do gene 16S  
9 rRNA também considerou o cálculo de frequências absolutas e relativas para  
10 investigar a distribuição de famílias e gêneros identificados, sendo exibidas em  
11 gráficos de barras ordenadas. Para cada família, foi calculada a soma do número de  
12 identificados considerando o total de 28 amostras. As famílias que não foram  
13 identificadas pela técnica foram agrupadas em famílias “não identificadas”, sendo  
14 calculado o total de observações em todas as 28 amostras. O mesmo procedimento  
15 foi realizado para a análise dos gêneros.

16 Os resultados dos testes de adesão também foram expressos em termos de  
17 suas frequências absolutas e relativas, na forma de tabelas de contingência e de  
18 gráficos. Além disso, testes de independência de variáveis quantitativas foram  
19 aplicados. Mais especificamente, o teste exato de Fisher foi usado para avaliar a  
20 associação entre a aderência e a superfície, sob a hipótese nula de que as variáveis  
21 são independentes e a hipótese alternativa de que as variáveis são dependentes  
22 (AGRESTI, 2007). Este teste comparou as proporções de microrganismos aderentes  
23 e não aderentes nas superfícies de aço inoxidável e poliestireno. Foi adotado um nível  
24 de 5% significância ( $\alpha$ ), assim, para  $p$ -valor  $\geq 5\%$ , não se deve rejeitar a hipótese nula.

## 1 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2 4.1 Detecção de *Listeria monocytogenes*

3 Durante o período de coletas, a presença de *Listeria monocytogenes* não foi  
4 detectada em nenhuma das superfícies avaliadas na sala de cortes do abatedouro  
5 frigorífico de peixes. No entanto, um estudo conduzido no estado de São Paulo relatou  
6 a presença de *L. monocytogenes* em unidades de abatedouros frigoríficos de tilápias,  
7 atribuindo os achados à capacidade de formação de biofilmes desse patógeno, à  
8 tolerância frente aos sanitizantes utilizados e ao volume de produção das indústrias.  
9 Ainda, sugere-se que o uso de dois princípios ativos muito semelhantes nos  
10 protocolos de higienização pré-operacional, como hipoclorito de sódio e ácido  
11 peracético, por um período de exposição inferior ao preconizado pelos fabricantes  
12 contribuíram com a tolerância e a permanência dos isolados encontrados (VÁZQUEZ-  
13 SÁNCHEZ; GALVÃO; OETTERER, 2017). Da mesma forma, CARPENTIER; CERF,  
14 (2011) e FERREIRA et al., (2014) atribuem a persistência de *L. monocytogenes* em  
15 ambientes relacionados com alimentos à sua capacidade de formar biofilmes,  
16 aumentando consideravelmente a sua tolerância ao estresse ambiental, como a  
17 exposição aos desinfetantes utilizados na indústria.

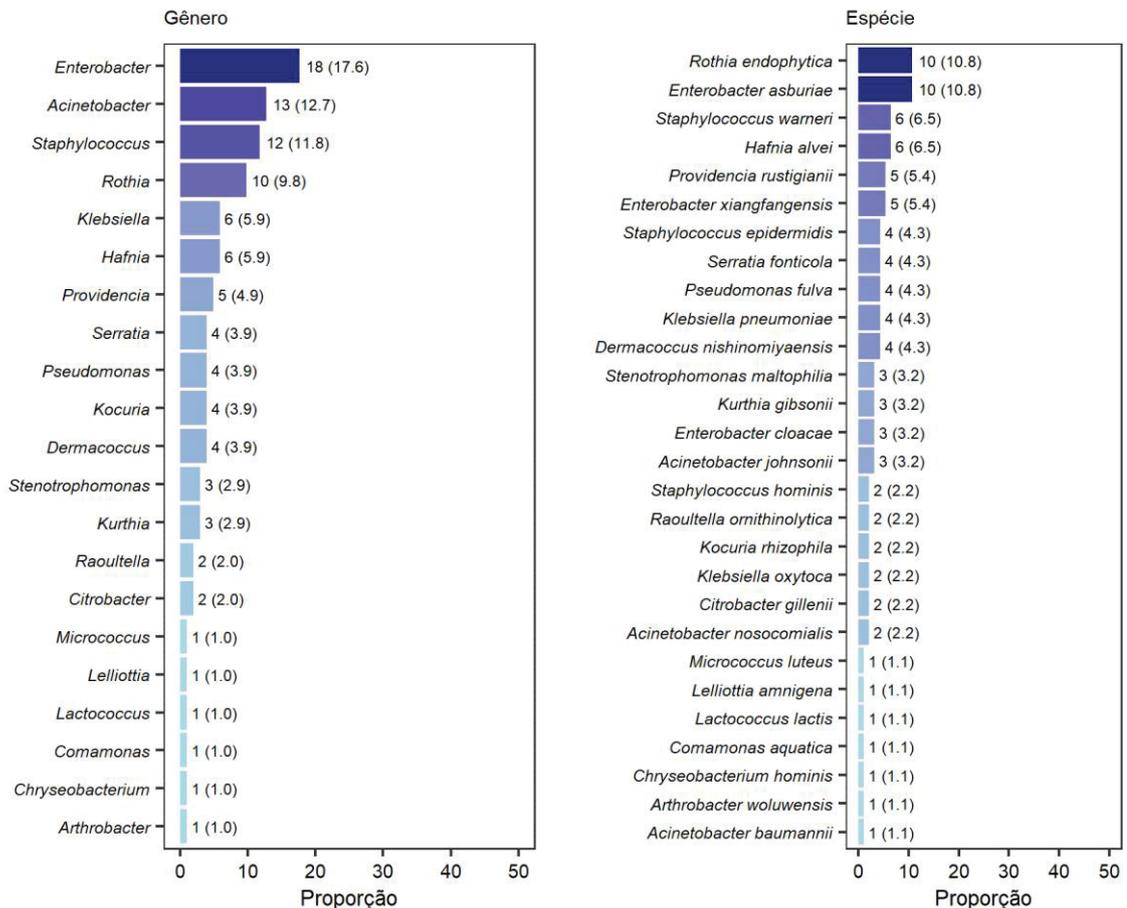
18 Demais estudos abordam o potencial patogênico dessa espécie, encontrada em  
19 produtos e superfícies de contato com alimentos em abatedouros frigoríficos de peixes  
20 (ABDOLLAHZADEH et al., 2016; CHEN et al., 2016; JAMALI et al., 2015;  
21 KRAMARENKO et al., 2013; WU et al., 2015). Ainda, a prevalência de *L.*  
22 *monocytogenes* em ambientes relacionados com a piscicultura parece ter relação com  
23 o grau de atividade humana e com o nível de processamento da matéria-prima, sendo  
24 maior em áreas de criação intensiva de peixes de água doce e em frigoríficos e  
25 abatedouros de peixes do que em lagos e riachos naturais (HANSEN; VOGEL; GRAM,  
26 2006). Assim, entende-se que a eficiência dos protocolos de higienização e dos  
27 programas de autocontrole são cruciais para o controle dessa espécie no ambiente  
28 industrial, diminuindo o risco de contaminação dos alimentos.

## 1 4.2 Diversidade microbiana pela técnica de MALDI-TOF MS

2 O estudo considerou um total de 150 isolados, sendo 34 não identificados e  
3 116 identificados. No geral, foram identificados 21 gêneros e 28 espécies diferentes.  
4 Os gêneros *Candida* e *Trichosporon* foram desconsiderados por se tratarem de  
5 leveduras e fungos, com uma prevalência de 8,7% (13) e 0,7% (1), respectivamente.  
6 Na FIGURA 1 estão citados os gêneros e espécies identificados, com o número de  
7 isolados correspondentes pela técnica MALDI-TOF MS, seguido pela proporção entre  
8 parênteses.

9 A identificação de microrganismos baseada em espectrometria de massa  
10 surgiu após o desenvolvimento da ionização por eletrospray e da ionização e  
11 dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) no final da década de 1980.  
12 Desde então, seu uso vem sendo implementado tanto em instituições de pesquisa,  
13 quanto em instalações hospitalares e operações comerciais (FENN et al., 1989;  
14 KARAS; HILLENKAMP, 1988). A técnica é considerada muito mais rápida e ágil do  
15 que os métodos tradicionais de identificação microbiana, que demandam etapas  
16 adicionais de cultivo, testes bioquímicos e caracterizações fenotípicas. Além disso,  
17 possibilita a identificação direta do conteúdo amostral, de patógenos incomuns, de  
18 bactérias não-fermentadoras e também a análise de culturas mistas (BRAGA et al.,  
19 2013; POPOVIĆ et al., 2017). Os resultados são alcançados através da comparação  
20 dos dados de espectro de massa obtidos com uma biblioteca de espectros de massa  
21 já conhecidos (LAY, 2001).

FIGURA 1 – GÊNEROS E ESPÉCIES DO TOTAL DE 102 ISOLADOS BACTERIANOS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS OBTIDOS EM SUPERFÍCIES QUE MANTINHAM CONTATO DIRETO COM OS PRODUTOS LOGO APÓS A ETAPA DE HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL EM UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE PEIXES



NOTA: Os valores expressos fora dos parênteses dizem respeito aos valores absolutos de ocorrência dos gêneros e espécies avaliados pela técnica de MALDI-TOF MS. Valores expressos entre parênteses dizem respeito aos valores percentuais, baseado no universo de 102 amostras.

1 Observa-se que os cinco maiores grupos de gêneros identificados foram  
 2 respectivamente *Enterobacter* (17,6%), *Acinetobacter* (12,7%), *Staphylococcus*  
 3 (11,8%), *Rothia* (9,8%) e *Klebsiella* (5,9%). Quanto às espécies, as cinco mais  
 4 frequentes foram *Rothia endophytica* (10,8%), *Enterobacter asburiae* (10,8%),  
 5 *Staphylococcus warneri* (6,5%), *Hafnia alvei* (6,5%) e *Providencia rustigianii* (5,4%),  
 6 respectivamente.

7 A importância das bactérias é tamanha, que seu papel no ambiente de  
 8 processamento de alimentos não pode ser ignorado. O seu isolamento, identificação  
 9 e caracterização possibilitam a tomada de decisões da equipe de trabalho e dos

1 órgãos oficiais, além de impactarem diretamente no fornecimento de alimentos  
2 seguros e de qualidade à população. Ao avaliar diferentes indústrias de alimentos  
3 quanto à microbiota remanescente após os procedimentos de limpeza e desinfecção,  
4 MAES et al., (2019) menciona alguns dos mesmos gêneros identificados nesse  
5 estudo, como *Rothia* e *Acinetobacter*.

6 Ainda, FAGERLUND; LANGSRUD; MØRETRØ, (2021) apontam que a  
7 diversidade microbiana de superfícies limpas na indústria de alimentos, em geral, é  
8 formada por dois grandes grupos. Bactérias Gram-negativas como *Acinetobacter*,  
9 *Enterobacteriaceae*, *Psychrobacter* e *Stenotrophomonas* em indústrias com um  
10 ambiente de produção úmido, como em abatedouros frigoríficos de peixes, unidades  
11 de processamento de carnes e de produtos frescos. E bactérias Gram-positivas como  
12 *Staphylococcus* e *Bacillus* em ambientes de produção seco, em laticínios ou em  
13 produtos a base de peixe fermentados ou dessecados. Em concordância,  
14 *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* também foram verificados nesse  
15 estudo.

16 MØRETRØ; LANGSRUD, (2017) ressaltam que muitos microrganismos  
17 pertencentes à família Enterobacteriaceae são comumente isoladas de superfícies de  
18 processamento em diversos tipos de indústrias alimentícias, após os protocolos de  
19 higienização, como microbiota persistente. Algumas indústrias de alimentos  
20 consideram amostras de Enterobacteriaceae em seu programa de monitoramento  
21 sanitário como um indicador de contaminação fecal (VAN SCHOTHORST;  
22 OOSTEROM, 1984). No entanto, isso pode ser um equívoco. Embora muitos gêneros  
23 de Enterobacteriaceae estejam presentes no intestino dos mamíferos, outros estão  
24 amplamente distribuídos na natureza. Ao falar de bactérias residentes em superfícies  
25 alimentares e as suas implicações para a segurança e a qualidade dos alimentos,  
26 MØRETRØ; LANGSRUD, ([s.d.]) afirma que diversos gêneros de Enterobacteriaceae  
27 já foram relatados como parte da diversidade microbiológica de ambientes de  
28 processamento de alimentos, como *Enterobacter*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*,  
29 *Pantoea*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Rahnella*, *Providencia*, *Escherichia*, *Yersinia* e *Shigella*.  
30 Quatro desses também foram verificados nesse estudo, sendo eles *Enterobacter*,  
31 *Klebsiella*, *Hafnia* e *Providencia*.

32 A diferença na temperatura mínima de crescimento dentro de um mesmo  
33 gênero, o *Enterobacteriaceae*, pode explicar por que alguns dos gêneros mais

1 abundantes na natureza não são verificados como os mais prevalentes em ambientes  
2 de processamento de carne, como em frigoríficos e abatedouros de peixes. Isso por  
3 que a temperatura do ambiente nem sempre condiz com a temperatura ótima de um  
4 microrganismo, favorecendo aquele que se beneficia de temperaturas mais próximas  
5 das enfrentadas no ambiente industrial, de resfriamento ou congelamento dos  
6 alimentos. Por exemplo, *Hafnia* spp. e *Serratia* spp. crescem em temperaturas tão  
7 baixas quanto +0,2 °C, embora a temperatura mínima de crescimento para  
8 *Escherichia coli* seja de 8 °C (RIDELL; KORKEALA, 1997), sendo um dos motivos  
9 pelos quais essa última raramente é encontrada como parte dominante da diversidade  
10 microbiana residente em ambientes de produção industrial.

11 Já *Acinetobacter* compartilha de muitas das mesmas características de  
12 comportamento do gênero *Pseudomonas*, explicando por que são relativamente  
13 comuns nos mesmos ambientes (MØRETRØ; LANGSRUD, 2017). Bactérias do  
14 gênero *Acinetobacter* são comumente encontradas em indústrias de alimentos e  
15 também em alimentos refrigerados, estando envolvidas nos processos de  
16 deterioração (CERVENY; MEYER; HALL, 2009). São sensíveis às condições secas e  
17 desenvolvem-se melhor em instalações úmidas, como nas indústrias de abate e  
18 processamento de peixes (KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006). Além disso, são  
19 encontradas em uma variedade de ambientes externos, como solo, água e esgoto,  
20 crescendo em baixas temperaturas e possuindo a capacidade de formar biofilmes  
21 (HABIMANA et al., 2010).

22 Bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. podem ser  
23 encontradas em matérias-primas e também na pele e mucosas de seres humanos e  
24 animais (GÖTZ; BANNERMAN; SCHLEIFER, 2006). Embora a presença de *S. aureus*  
25 em ambientes industriais já tenha sido relatada, sua presença é mais relevante do  
26 ponto de vista clínico. Podem ser utilizadas como culturas *starter* na produção de  
27 alimentos fermentados e não são reconhecidas como bactérias importantes na  
28 deterioração dos alimentos. No entanto, quando ocorrem, são prevalentes em  
29 alimentos frescos, desidratados ou salgados (CERVENY; MEYER; HALL, 2009).  
30 Sobrevivem bem em ambientes secos e com alta concentração de sal, são resistentes  
31 à dessecação e sua persistência pode ser verificada pela produção de biofilmes em  
32 ambientes de processamento de alimentos (MARQUES et al., 2007).

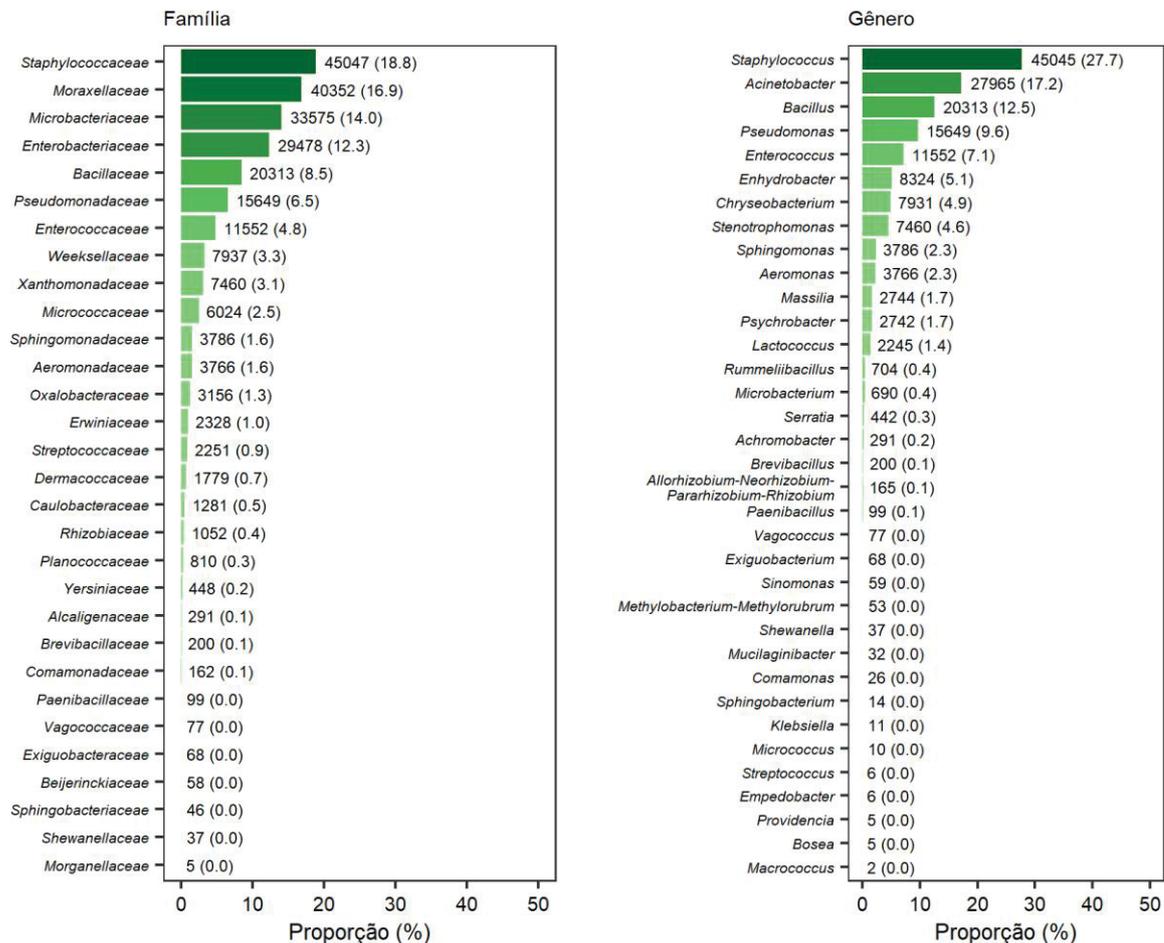
1           Por fim, assim como mencionado em outros estudos (ALONSO; LEMOS;  
2 NASCIMENTO, 2023; BELLEGGIA; OSIMANI, 2023; PITT; HOCKING, 2009), os  
3 gêneros *Candida* e *Trichosporon* também foram identificados. No entanto, optou-se  
4 por trabalhar somente com isolados bacterianos, de forma a especificar o estudo em  
5 questão e também possibilitar o uso da ferramenta de sequenciamento do gene 16S  
6 rRNA. Sugere-se incluí-los em análises futuras, a fim de verificar o papel de leveduras  
7 e fungos na formação de biofilmes e no estabelecimento da diversidade microbiana.

#### 8 4.3 Diversidade microbiana pelo sequenciamento do gene 16S rRNA

9           De 50 amostras coletadas, apenas 28 demonstraram crescimento em placa e  
10 quantidades suficientes de DNA para avaliação pela técnica de sequenciamento do  
11 gene 16S rRNA. Além disso, ao avaliarmos beta e alfa diversidades, obteve-se  
12 significância estatística apenas para diversidade alfa.

13           Na FIGURA 2, estão descritos as famílias e gêneros identificados, com a  
14 frequência absoluta e a relativa entre parênteses. Observa-se que os cinco maiores  
15 grupos de famílias identificados foram Staphylococcaceae (18,8%), Moraxellaceae  
16 (16,9%), Microbacteriaceae (14,0%), Enterobacteriaceae (12,3%) e Bacillaceae  
17 (8,5%). Quanto aos gêneros, os cinco mais frequentes foram *Staphylococcus* (27,7%),  
18 *Acinetobacter* (17,2%), *Bacillus* (12,5%), *Pseudomonas* (9,6%) e *Enterococcus*  
19 (7,1%), respectivamente. Ao todo, foram identificadas 30 famílias diferentes e 35  
20 gêneros diferentes.

FIGURA 2 – FAMÍLIAS E GÊNEROS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA EM 28 AMOSTRAS OBTIDAS EM SUPERFÍCIES QUE MANTINHAM CONTATO DIRETO COM OS PRODUTOS LOGO APÓS A ETAPA DE HIGIENIZAÇÃO PRÉ-OPERACIONAL EM UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE PEIXES



NOTA: Os valores expressos fora dos parênteses dizem respeito aos valores absolutos verificados pela técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA. Valores expressos entre parênteses dizem respeito aos valores percentuais, baseado no universo de 28 amostras.

1 Os gêneros bacterianos *Staphylococcus* e *Acinetobacter* já foram discutidos  
 2 no item 3.3 deste trabalho. Já o gênero *Bacillus* é muito diverso e compreende  
 3 microrganismos altamente heterogêneos. Sua morfologia depende da espécie,  
 4 podendo ser Gram-positivos, Gram-negativos, aeróbios, anaeróbios facultativos ou  
 5 estritamente anaeróbios. Estão amplamente distribuídos no solo ou em locais  
 6 correlatos, sendo que sua presença também é verificada em produtos farmacêuticos,  
 7 alimentos e água (Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 2015;  
 8 PARTE et al., 2020).

1 A ocorrência de *Bacillus* em uma gama tão ampla de habitats pode ser  
2 atribuída à grande capacidade adaptativa de suas espécies, podendo ser psicrófilicas,  
3 termofílicas, acidófilas e alcalifílicas. Ainda, podem desenvolver esporos, que são  
4 estruturas resistentes às condições extremas, como calor, radiação, escassez de  
5 nutrientes e ação de desinfetantes (Bergey's Manual of Systematics of Archaea and  
6 Bacteria, 2015). No entanto, o ambiente aquático não é considerado ideal para o  
7 crescimento de *Bacillus* spp., sendo que a ocorrência em ambientes relacionados a  
8 piscicultura é relacionada à contaminação das matérias-primas durante o processo  
9 produtivo, à fermentação de alguns produtos ou à sua notável capacidade de  
10 sobrevivência em ambientes adversos (BELLEGGIA; OSIMANI, 2023).

11 Também, os dados de contagem viável do estudo de BELLEGGIA; OSIMANI,  
12 (2023) demonstraram a ocorrência de grupos microbianos normalmente associados à  
13 fermentação de alimentos, nomeadamente bactérias lácticas, estafilococos, *Bacillus*  
14 spp. e leveduras, sugerindo a predominância de bactérias lácticas em produtos  
15 fermentados à base de peixe e a sua ocorrência nas matérias-primas utilizadas.

16 Em sequência, o gênero *Pseudomonas* spp. é o mais relatado em estudos  
17 conduzidos em ambientes industriais, permanecendo em superfícies de  
18 processamento de alimentos após os procedimentos de sanitização. Isso por que sua  
19 presença é verificada em diversos pontos de um mesmo ambiente, como em  
20 equipamentos, esteiras, pedilúvios, pisos e ralos. Semelhante ao observado nesse  
21 estudo, tem-se que sua prevalência é ainda mais importante em abatedouros  
22 frigoríficos de peixes e em instalações pesqueiras (MØRETRØ; LANGSRUD, 2017).

23 Pesquisadores caracterizaram isolados de *Pseudomonas* spp. que  
24 sobreviveram aos procedimentos de limpeza e desinfecção em ambiente industrial e  
25 sugeriram que a habilidade de produção de biofilme em baixas temperaturas poderia  
26 explicar, em partes, o seu estabelecimento na diversidade microbiana verificada. A  
27 formação de biofilme é notavelmente extensa para o gênero *Pseudomonas* a  
28 temperaturas semelhantes àquelas enfrentadas nos ambientes industriais de  
29 produção de alimentos (LIU et al., 2013, 2015). Concomitantemente, sugere-se que a  
30 tolerância aos desinfetantes também possa explicar a sobrevivência desse gênero  
31 após os protocolos de higiene adotados na indústria de alimentos. *Pseudomonas*  
32 isoladas após a desinfecção demonstraram crescimento em concentrações  
33 recomendadas pelo fabricante dos desinfetantes utilizados e, ainda, algumas cepas

1 foram capazes de se multiplicarem mesmo em soluções puras de desinfetante, sem  
2 quaisquer outros nutrientes disponíveis (LANGSRUD; SUNDHEIM; BORGMANN-  
3 STRAHSEN, 2003; SUNDHEIM; LANGSRUD, 1995).

4 Por fim, além do seu potencial de deterioração dos alimentos, sinaliza-se a  
5 importância desse gênero no ambiente industrial, sendo que diversos estudos  
6 sugerem que alimentos ou qualquer outro substrato com altas cargas de  
7 *Pseudomonas* spp. podem favorecer a sobrevivência de *Listeria monocytogenes*,  
8 *Staphylococcus aureus* e também de cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli*  
9 (STEC), (CARPENTIER; CHASSAING, 2004; STERNIŠA; KLANČNIK; SMOLE  
10 MOŽINA, 2019) ambas bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos.

11 Já os microrganismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* são cocos Gram-  
12 positivos, isolados de diversos ambientes, como água, efluentes, solo e também no  
13 sistema digestivo de humanos, animais e insetos (KRAWCZYK et al., 2021). Apesar  
14 disso, algumas espécies podem causar deterioração nos alimentos (HUGAS;  
15 GARRIGA; AYMERICH, 2003) e também podem ser consideradas patogênicas,  
16 através da produção de aminas termoestáveis, como tiramina, histamina,  
17 feniletilalanina, cadaverina e putrescina (GIRAFFA, 2002).

18 A presença de enterococos nos alimentos pode ser resultado de  
19 contaminação por condições inapropriadas de higiene. Sabe-se que as espécies *E.*  
20 *faecalis* e *E. faecium* são frequentemente responsáveis pela contaminação de queijos  
21 (FRACALANZZA et al., 2007) e também relatadas na contaminação da carne de  
22 frango durante o processamento (BORTOLAIA; ESPINOSA-GONGORA;  
23 GUARDABASSI, 2016). Ainda, estudos apontam para o uso generalizado de  
24 antimicrobianos e o aumento do perfil de resistência desse grupo de microrganismos.  
25 A cadeia de alimentos é considerada como o principal local onde a resistência é  
26 transmitida entre o meio ambiente e os seres humanos, sinalizando cautela na  
27 detecção desse gênero (FRACALANZZA et al., 2007).

28 Estudos procuram elucidar o papel do gênero *Enterococcus* na piscicultura.  
29 MENDOZA; AQUINO; REYES, (2023) exploraram a abundância de Enterococos em  
30 Tilápias-do-Nilo e em seus ambientes de criação, investigando a relação entre a  
31 qualidade do ambiente de cultivo e a presença desse gênero. Já ARAÚJO;  
32 GRASSOTTI; FRAZZON, (2021) verificaram a presença de enterococos resistentes à  
33 diversos antimicrobianos em águas e sedimentos de tanques de produção de tilápias

1 no sul do Brasil, sugerindo que a origem desses microrganismos não seja só de  
 2 contaminação fecal, indicando que a piscicultura pode favorecer a manutenção  
 3 desses micro-organismos no ambiente. Mais estudos são necessários para melhorar  
 4 a compreensão da distribuição de enterococos em ambientes de piscicultura,  
 5 avaliando se a contaminação proveniente do campo tem interferência no ambiente  
 6 industrial de beneficiamento dos produtos e, em consequência, dos alimentos.

7 Por fim, trabalhos como MAES et al., (2019) exemplificam a utilização da  
 8 tecnologia de sequenciamento do gene 16S rRNA para a identificação e  
 9 caracterização da diversidade microbiana em ambientes industriais, bem como na  
 10 avaliação da microbiota residente nas superfícies, valorizando os resultados  
 11 alcançados em relação às técnicas mais tradicionais. Ainda, suporta a hipótese de  
 12 que bactérias podem ser transferidas das superfícies para os produtos, levando à  
 13 contaminação dos alimentos.

#### 14 4.4 Capacidade de adesão dos microrganismos

15 Cento e dois isolados caracterizados por MALDI-TOF MS foram submetidos ao  
 16 teste de adesão em duas superfícies diferentes. Considerando as duas superfícies,  
 17 193 (94,6%) foram considerados aderentes, enquanto 11 (5,4%) foram considerados  
 18 não aderentes. Para o material poliestireno, 100 (98%) dos isolados foram  
 19 considerados aderentes, enquanto 2 (2%) foram considerados não aderentes. Para o  
 20 material aço inox, 93 (91,2%) foram considerados aderentes e 9 (8,8%) foram  
 21 considerados não aderentes. Observa-se uma maior proporção de isolados aderentes  
 22 na superfície de poliestireno em comparação ao aço inox. Na TABELA 1, tem-se a  
 23 comparação das proporções de aderência por superfície entre aço inox e poliestireno.

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DAS PROPORÇÕES DE ADESÃO ENTRE AS SUPERFÍCIES DE AÇO INOX E POLIESTIRENO PARA OS 102 ISOLADOS AVALIADOS

| <b>Aderência</b> | <b>Aço inox</b> | <b>Poliestireno</b> | <b>Fisher p</b> |
|------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Aderente         | 93              | 100                 | 0.058           |
| Não aderente     | 9               | 2                   |                 |
| Total            | 102             | 102                 |                 |

24 O teste de Fisher foi aplicado para avaliar a significância estatística da diferença  
 25 entre as proporções de aderência nas duas superfícies. O valor de p é 0,058, o que  
 26 sugere uma tendência para diferença, mas não atinge significância de 5%. Isso sugere

- 1 que há uma possível diferença nas proporções de aderência entre as superfícies, mas  
 2 essa diferença não é estatisticamente significativa.

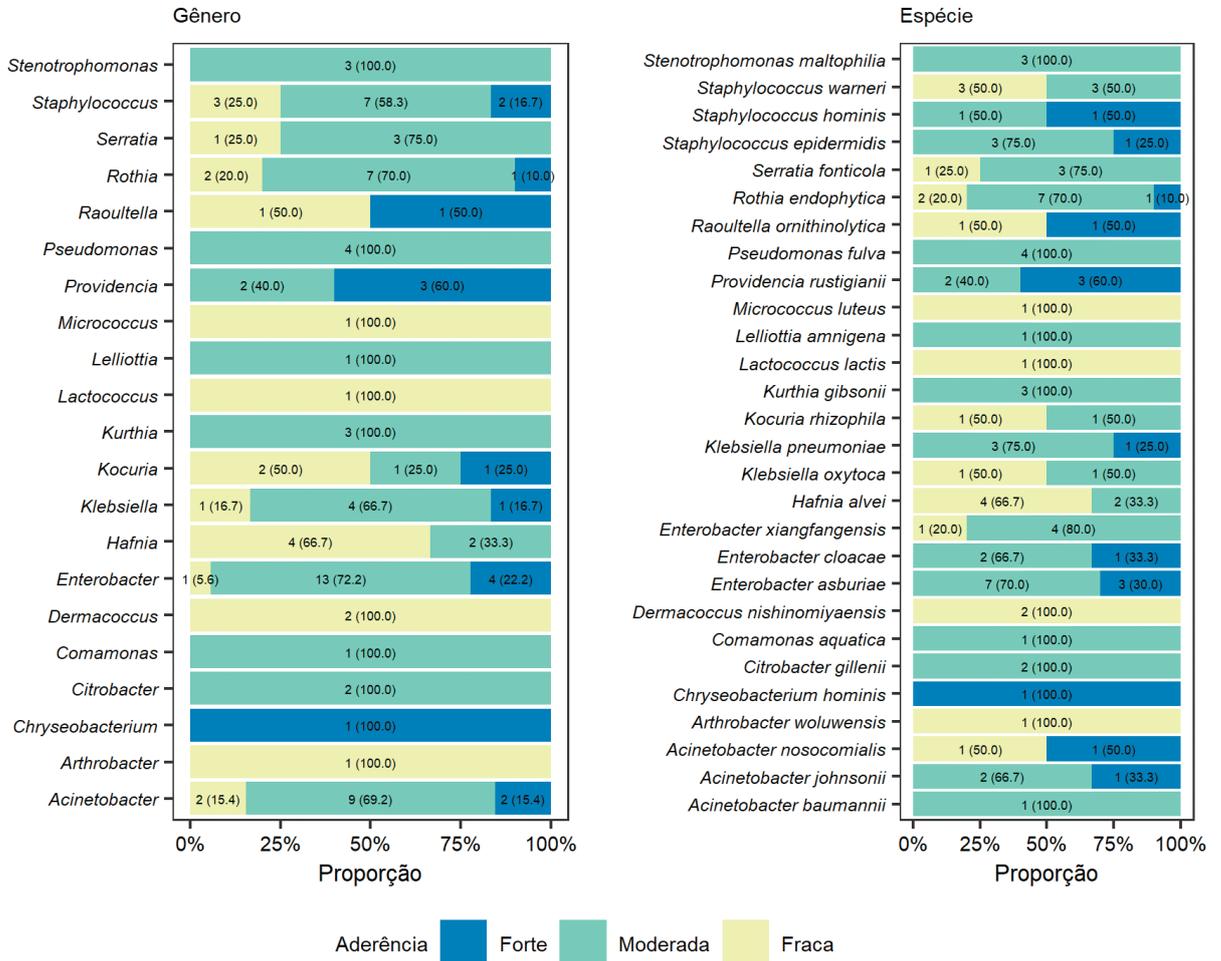
TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CONSIDERADOS ADERENTES PARA AÇO INOX E POLIESTIRENO SUBDIVIDIDOS EM ADESÃO FORTE, MODERADA OU FRACA

| <b>Material</b> | <b>Adesão</b> | <b>n (%)</b> |
|-----------------|---------------|--------------|
| Poliestireno    | Forte         | 16 (16.0)    |
|                 | Moderada      | 62 (62.0)    |
|                 | Fraca         | 22 (22.0)    |
| Aço inox        | Forte         | 29 (31.2)    |
|                 | Moderada      | 32 (34.4)    |
|                 | Fraca         | 32 (34.4)    |

- 3 A classificação de aderência dos microrganismos de acordo com o material em  
 4 que foram observados, poliestireno e aço inox, classificada como Forte, Moderada ou  
 5 Fraca consta na TABELA 2. Para o poliestireno, 16 microrganismos (16,0%)  
 6 mostraram adesão forte, 62 (62,0%) adesão moderada e 22 (22,0%) adesão fraca. Já  
 7 para o aço inox, 29 microrganismos (31,2%) apresentaram adesão forte, 32 (34,4%)  
 8 adesão moderada e 32 (34,4%) adesão fraca.

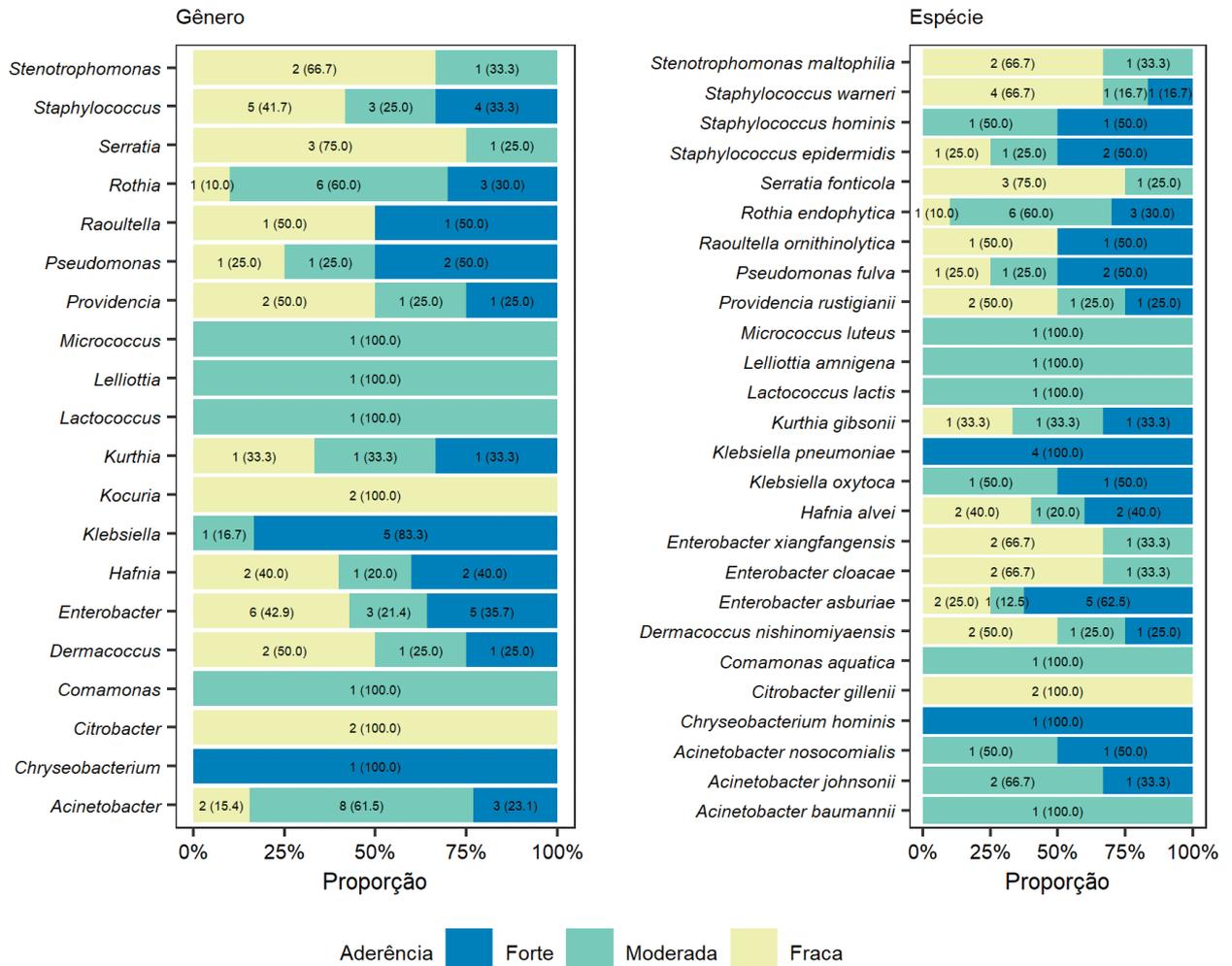
- 9 Na FIGURA 3 tem-se um demonstrativo gráfico contendo gênero e espécie  
 10 dos isolados considerados aderentes para a superfície de poliestireno, segundo a  
 11 classificação de adesão. Na figura, para cada gênero e espécie é mostrada a  
 12 proporção de identificados classificados segundo as diferentes categorias de adesão  
 13 em fraco, moderado e forte em escala de cores.

FIGURA 3 – GÊNEROS E ESPÉCIES DOS ISOLADOS CONSIDERADOS ADERENTES PARA A SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE ADESÃO, EM ESCALA DE CORES PARA FRACO, MODERADO E FORTE



1 Enquanto que na FIGURA 4 há a demonstração dos gêneros e espécies dos  
 2 isolados considerados aderentes para a superfície de aço inox, segundo a  
 3 classificação de adesão.

FIGURA 4 – GÊNEROS E ESPÉCIES DOS ISOLADOS CONSIDERADOS ADERENTES PARA A SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE ADESÃO, EM ESCALA DE CORES PARA FRACO, MODERADO E FORTE



1 Por fim, a apresentação da origem dos isolados fortemente aderentes para  
 2 cada tipo de superfície, distinguindo entre aço inox e poliestireno está descrita na  
 3 TABELA 3. Para o aço inox, dos microrganismos fortemente aderentes, 7 (24,1%) têm  
 4 origem no aço inox, enquanto 22 (75,9%) têm origem em superfícies plásticas  
 5 utilizadas na indústria, como esteiras de corte e tábuas de corte. No caso do  
 6 poliestireno, 4 microrganismos (25,0%) fortemente aderentes têm origem no aço inox,  
 7 enquanto 12 (75,0%) têm origem em superfícies plásticas.

TABELA 3 – ORIGEM DOS ISOLADOS CONSIDERADOS FORTEMENTE ADERENTES

| Superfície testada | Origem do isolado | n (%)     |
|--------------------|-------------------|-----------|
| Aço inox           | Aço inox          | 7 (24.1)  |
|                    | Plástico          | 22 (75.9) |
| Poliestireno       | Aço inox          | 4 (25.0)  |
|                    | Plástico          | 12 (75.0) |

1 Os resultados obtidos nos testes de adesão com os isolados oriundos desse  
2 estudo estão em concordância com os conceitos de adesão microbiana, de biofilmes  
3 e também da interferência dos procedimentos de higienização realizados na indústria  
4 de alimentos. Diversos fatores influenciam o processo de adesão bacteriana, tanto por  
5 parte dos microrganismos envolvidos, quanto pelas características do ambiente e das  
6 superfícies em questão. Para o primeiro caso, podemos citar o tempo de exposição  
7 das bactérias às superfícies, a diversidade microbiana existente e suas características  
8 morfológicas e os nutrientes disponíveis naquele ambiente. Já em relação à  
9 superfície, especificamente, tem-se que a densidade de carga superficial, a  
10 molhabilidade, rugosidade, rigidez e topografia são determinantes para a ocorrência  
11 da adesão e o estabelecimento do biofilme (AN; FRIEDMAN, 1998; CARNIELLO et  
12 al., 2018; CHIEN et al., 2020; SONG; KOO; REN, 2015).

13 O biofilme é uma estrutura tridimensional formada através da interação entre  
14 a superfície e os microrganismos. Inicialmente, a adesão se dá pela percepção da  
15 superfície através de mecanismos de *Quorum-Sensing*, seguida pela adesão  
16 superficial, colonização através da multiplicação microbiana e, por fim, pela produção  
17 de substrato, a matriz extracelular de polissacarídeos (EPS) (FLEMMING et al., 2016).  
18 No estágio final de adesão, há uma modulação citoplasmática que permite e  
19 estabelece uma interação entre as bactérias e as superfícies, através de forças  
20 atrativas nomeadas de forças de Lifshitz-van der Waals (CARNIELLO et al., 2018).

21 Uma vez que esses mecanismos de adesão ocorrem e que o biofilme é  
22 estabelecido, a eliminação desses microrganismos ou a remoção mecânica dos  
23 biofilmes torna-se muito difícil (ZHENG et al., 2021). Outro aspecto muito importante  
24 é que biofilmes podem se formar tanto em superfícies bióticas, quanto em superfícies  
25 abióticas. Por essa razão, são muitas vezes associados com o ambiente industrial,  
26 especialmente em superfícies que mantenham contato com os alimentos durante o  
27 processo de beneficiamento dos mesmos (HALL-STOODLEY; COSTERTON;  
28 STOODLEY, 2004).

1 Superfícies de corte como tábuas, de transporte como esteiras, utensílios,  
2 maquinários e também sistemas fechados, como tubos e válvulas estão susceptíveis  
3 à adesão microbiana. Microrganismos aderidos, principalmente bactérias, podem ter  
4 efeitos prejudiciais à saúde do consumidor e também à economia. A diversidade  
5 microbiana é tão ampla que um mesmo biofilme pode agrupar bactérias patogênicas  
6 e deteriorantes, representando uma fonte de contaminação aos alimentos (FAILLE et  
7 al., 2002; GIAOURIS et al., 2014). Ainda, sabe-se que biofilmes conferem proteção  
8 aos microrganismos frente às variáveis ambientais, principalmente impedindo ou  
9 reduzindo a ação dos desinfetantes utilizados nos protocolos de higienização  
10 industrial, seja pela interferência da matéria orgânica ou pela expressão de  
11 mecanismos de resistência antimicrobiana (BRIDIER et al., 2011; DONAGHY et al.,  
12 2019; LI et al., 2021).

13 Portanto, interromper os mecanismos de adesão inicial às superfícies seria a  
14 melhor forma de prevenir a ocorrência da adesão irreversível e da formação de  
15 biofilmes nesses ambientes (ZHENG et al., 2021). Para tal, novas tecnologias estão  
16 sendo desenvolvidas, como a implementação de substâncias antibacterianas na  
17 composição dos materiais mais comumente utilizados em equipamentos e superfícies,  
18 como os polímeros plásticos e o aço inoxidável (COUGHLAN et al., 2016).

19 Como comentado anteriormente, o material é determinante para os  
20 fenômenos de adesão e persistência microbiana em uma superfície ou ambiente.  
21 Diversos autores relataram a capacidade das bactérias em formar biofilmes em  
22 materiais como aço inoxidável, vidro, borracha, policarbonato, poliuretano,  
23 poliestireno, polipropileno, titânio, alumínio e cerâmica, todos comumente utilizados  
24 no setor (DI CICCIO et al., 2015). Os testes do estudo em questão foram conduzidos  
25 em aço inoxidável e poliestireno por serem mais amplamente utilizados no ambiente  
26 em que a amostragem foi conduzida, por possuírem características físico-químicas  
27 diferentes e também pela disponibilidade do material em placas de 96 poços.

28 O poliestireno é um dos plásticos mais utilizados na indústria de alimentos. É  
29 conhecido por ser um material hidrofóbico, tendo sido demonstrado que tal  
30 característica contribui para a fixação de bactérias à superfície e a consequente  
31 formação de biofilme (DI CICCIO et al., 2015), podendo explicar o verificado nos testes  
32 desse estudo, com o maior percentual de adesão para o material poliestireno.

1            Já o aço inoxidável é considerado hidrofílico, sendo o material mais  
2 amplamente utilizado na composição de utensílios, equipamentos e tubulações dentro  
3 da indústria de alimentos, principalmente devido à sua resistência mecânica,  
4 resistência à corrosão e resistência aos possíveis danos oriundos dos procedimentos  
5 de limpeza (PIMENTEL-FILHO et al., 2014). Porém, mesmo com sua característica  
6 de resistência, estudos realizados com microscopia evidenciaram que superfícies  
7 consideradas lisas como as feitas de aço inoxidável também podem ser danificadas  
8 pelas práticas de limpeza industrial. Nesse processo, pequenas erosões são  
9 formadas, favorecendo a permanência de resíduos orgânicos e a adesão de  
10 microrganismos (WIRTANEN; HUSMARK; MATTILA-SANDHOLM, 1996). Tal  
11 contraponto pode explicar o observado nesse estudo, em que apesar de ligeiramente  
12 menor, também foi possível verificar o potencial de adesão dos isolados avaliados  
13 para este material.

14            Por fim, é interessante observar a relação entre a origem dos isolados e a  
15 demonstração do potencial de adesão de cada um. Isolados obtidos em superfícies  
16 plásticas tiveram maior potencial de adesão nos testes com material semelhante,  
17 poliestireno. Enquanto que alguns isolados obtidos em superfícies de aço inoxidável  
18 exacerbaram seu potencial de adesão ao serem submetidos ao teste em poliestireno,  
19 muito provavelmente pelas características intrínsecas desse material, que podem  
20 favorecer o processo de adesão microbiana.

## 1 5 CONCLUSÕES

2 Através das técnicas de MALDI-TOF MS e Sequenciamento do gene 16S  
3 rRNA foi possível avaliar a diversidade microbiana viável em superfícies que entram  
4 em contato direto com os alimentos na sala de filetagem de tilápias avaliada, após os  
5 procedimentos de higiene pré-operacional. Mais especificamente, foi possível verificar  
6 a diversidade alfa, concluindo que ela é muito mais ampla do que aquela revelada  
7 pelas avaliações rotineiramente conduzidas pela indústria. Observaram-se diferentes  
8 gêneros e espécies bacterianas, sugerindo a tolerância e a permanência desses  
9 microrganismos frente aos procedimentos de limpeza e desinfecção.

10 Além disso, grande parte dos isolados identificados pelo MALDI-TOF MS e  
11 submetidos ao teste de adesão *in vitro* foram considerados aderentes para os dois  
12 materiais avaliados, aço inoxidável e poliestireno, alertando para o potencial de  
13 formação de biofilmes desses microrganismos.

14 A presença de *Listeria monocytogenes* não foi detectada durante o período  
15 do estudo, sugerindo que essa espécie tem sido efetivamente eliminada pelas práticas  
16 de higienização adotadas, podendo não ser parte integrante da microbiota residente  
17 do ambiente avaliado.

18 Essas descobertas enfatizam a importância e a necessidade de elaboração  
19 de protocolos de limpeza bem direcionados, monitoramento constante por parte das  
20 equipes de trabalho e a implementação de medidas preventivas, todos fatores  
21 relevantes para a produção de alimentos seguros e de qualidade.

## 1 **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2 A segurança dos produtos alimentares depende de diversos fatores, dentre  
3 eles a qualidade das matérias-primas e também das práticas de higiene nas indústrias  
4 de processamento e beneficiamento de alimentos. A contaminação verificada nas  
5 superfícies, principalmente aquelas que mantêm contato direto com os alimentos,  
6 desempenha um papel primordial na contaminação cruzada de produtos finais,  
7 podendo causar prejuízos de ordem financeira e sanitária ao consumidor final e à  
8 cadeia produtiva como um todo.

9 De maneira geral, o monitoramento aplicado na rotina das indústrias de  
10 alimentos oferece pouca ou nenhuma informação sobre a diversidade microbiana  
11 existente naquele ambiente. Essa problemática é ainda maior se considerarmos que  
12 a constituição dessa diversidade, embora semelhante, é exclusiva de cada indústria.  
13 O presente estudo teve o intuito de contribuir com o recolhimento de dados da  
14 diversidade microbiana verificada em uma instalação de abate e processamento de  
15 peixes, nicho ainda pouco explorado. A contaminação superficial foi verificada,  
16 considerando a formação de biofilmes. Tal fato contribui com a persistência desses  
17 microrganismos e com o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos  
18 antimicrobianos, utilizados na saúde animal e humana.

19 A área de amostragem foi propositalmente maior e as análises de  
20 identificação e caracterização dos microrganismos foram conduzidas com técnicas de  
21 alto padrão, não dependendo de resultados quantitativos. Ao contrário, assume-se  
22 que a problemática seja em decorrência da permanência desses microrganismos no  
23 ambiente. Entender quais os microrganismos presentes e os motivos pelos quais eles  
24 permanecem nos pareceu mais importante do que a validação dos protocolos de  
25 higiene, embora procedimentos de limpeza e desinfecção otimizados e eficazes  
26 possam reduzir ou eliminar a grande maioria dos microrganismos encontrados.

27 Por fim, entende-se a necessidade constante de estudos na área e a  
28 possibilidade de ampliação das análises com os isolados obtidos, sugerindo trabalhos  
29 futuros e complementares ao demonstrado nesse primeiro momento.

## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, E. et al. Prevalence and molecular characterization of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from fish, shrimp, and cooked ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran. **LWT**, v. 73, 2016.

ABEBE, E.; GUGSA, G.; AHMED, M. **Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. Journal of Tropical Medicine**. Hindawi Limited, 2020.

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2024** (2024). Disponível em: <<https://abpa-br.org/abpa-relatorio-anual/>>. Acesso em: 04 mai. 2024.

IBGE. AGÊNCIA DE NOTÍCIAS. **Com alta recorde da Agropecuária, PIB fecha 2023 em 2,9%**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/39306-com-alta-recorde-da-agropecuaria-pib-fecha-2023-em-2-9>>. Acesso em 04 mai.2024.

AGRESTI, A. **An Introduction to Categorical Data Analysis: Second Edition**.2007.

AKIMOWICZ, M.; BUCKA-KOLENDO, J. MALDI-TOF MS-Application in food microbiology. **Acta Biochimica Polonica**, v. 67, n. 3, 2020.

ALONSO, V. P. P.; LEMOS, J. G.; NASCIMENTO, M. DA S. DO. **Yeast biofilms on abiotic surfaces: Adhesion factors and control methods. International Journal of Food Microbiology**, 2023.

AMIR, A. et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. **mSystems**, v. 2, n. 2, 2017.

AMMAR, Y. et al. Influence of surface roughness on the initial formation of biofilm. **Surface and Coatings Technology**, v. 284, 2015.

ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA 2024 **ANUÁRIO 2024**. PEIXE BR (Brasil). Associação Brasileira da Piscicultura (org.). Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2024: anuário 2024 peixe br da piscicultura. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2024. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-2024/>>. Acesso em: 04 mai. 2024

AN, Y. H.; FRIEDMAN, R. J. **Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. Journal of Biomedical Materials Research**, 1998.

ARAÚJO, A. J. G.; GRASSOTTI, T. T.; FRAZZON, A. P. G. Characterization of enterococcus spp. Isolated from a fish farming environment in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4, 2021.

BARCELOS, M. M. et al. Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, 2019.

BELLEGGIA, L.; OSIMANI, A. **Fermented fish and fermented fish-based products, an ever-growing source of microbial diversity: A literature review.** **Food Research International**, 2023.

**Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.** 14 set. 2015.

BERK, Z. Cleaning, Disinfection, Sanitation. **Food Process Engineering and Technology**, p. 637–650, 1 jan. 2013.

BERTOLINO, M. T. **Gerenciamento da Qualidade na Indústria Alimentícia: Ênfase em Segurança dos Alimentos.** ARTMED ed. 2009.

BOLYEN, E. et al. **Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2.** **Nature Biotechnology**, 2019.

BORTOLAIA, V.; ESPINOSA-GONGORA, C.; GUARDABASSI, L. **Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and Staphylococcus aureus on poultry meat.** **Clinical Microbiology and Infection**, 2016.

BRAGA, P. A. C. et al. **Bacterial identification: From the agar plate to the mass spectrometer.** **RSC Advances**, v. 3, n. 4, p. 994-1008, 2013.

BRASIL; AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA; MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 275 de 21/10/2002. RDC nº 275 de 21/10/2002** Brasil  
<https://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/27002>, 21 out. 2002.

BRASIL; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. (MAPA). **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal. Decreto Nº 9.013** Diário Oficial da União, 29 mar. 2017.

BRIDIER, A. et al. **Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: A review.** **Biofouling**, 2011.

CAPRIOLI, R. M.; FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 23, 1997.

CARDOSO, A.; TESSARI, E. **DIVULGAÇÃO TÉCNICA SALMONELA NA SEGURANÇA DOS ALIMENTOS.** n. 1, p. 11–13, jan. 2008.

CARNIELLO, V. et al. **Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth.** **Advances in Colloid and Interface Science**, 2018.

CARPENTIER, B.; CERF, O. **Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises.** 2011.

CARPENTIER, B.; CHASSAING, D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 2, 2004.

CARRASCOSA, C. et al. **Microbial biofilms in the food industry—a comprehensive review.** **International Journal of Environmental Research and Public Health.** MDPI, 2 fev. 2021.

CAUCHIE, E. et al. The use of 16S rRNA gene metagenetic monitoring of refrigerated food products for understanding the kinetics of microbial subpopulations at different storage temperatures: the example of white pudding. **International Journal of Food Microbiology**, v. 247, 2017.

CERVENY, J.; MEYER, J. D.; HALL, P. A. Microbiological Spoilage of Meat and Poultry Products. Em: **Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages.**

CHEN, B. Y. et al. Prevalence and persistence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat tilapia sashimi processing plants. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 11, 2016.

CHIA, T. W. R. et al. Attachment of different Salmonella serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, 2009.

CHIEN, H. W. et al. Inhibition of biofilm formation by rough shark skin-patterned surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 186, 2020.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 1, 2003.

COOKSEY, K. E.; WIGGLESWORTH-COOKSEY, B. **Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: A review.** **Aquatic Microbial Ecology**, 1995.

COSTA, O. Y. A.; RAAIJMAKERS, J. M.; KURAMAE, E. E. **Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation.** **Frontiers in Microbiology**, 2018.

COSTERTON, J. W. **Introduction to biofilm.** International Journal of Antimicrobial Agents. **Anais...** 1999.

COUGHLAN, L. M. et al. **New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry.** **Frontiers in Microbiology**, 2016.

DE BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1–2, p. 119–130, 15 set. 1999.

DE FILIPPIS, F. et al. **Environmental microbiome mapping as a strategy to improve quality and safety in the food industry. Current Opinion in Food Science**, 2021.

DELHALLE, L. et al. Evaluation of Enzymatic Cleaning on Food Processing Installations and Food Products Bacterial Microflora. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 11 ago. 2020.

DESTRO, M. T.; RIBEIRO, V. B. **FOODBORNE ZOOSES**. Em: **Encyclopedia of Meat Sciences**. Elsevier, 2014. v. Volume 2p. 17–21.

DI CICCIO, P. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, 2015.

DONAGHY, J. A. et al. Relationship of sanitizers, disinfectants, and cleaning agents with antimicrobial resistance. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 5, 2019.

DOS SANTOS, E. A. R. et al. Activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis*-Family: Lamiaceae) essential oil compared to peracetic acid in *Listeria monocytogenes* biofilms. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 45, 22 mar. 2023.

ENCISO-MARTÍNEZ, Y. et al. **Relevance of tracking the diversity of *Escherichia coli* pathotypes to reinforce food safety. International Journal of Food Microbiology**, 2022.

ERENO TADIELO, L. et al. Preoperational cleaning processes interfere with microbial ecology and presence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on food conveyor belts of a poultry slaughterhouse in Brazil. **LWT**, v. 184, 2023.

FAGERLUND, A.; LANGSRUD, S.; MØRETRØ, T. **Microbial diversity and ecology of biofilms in food industry environments associated with *Listeria monocytogenes* persistence**. *Current Opinion in Food Science*, v. 37, p. 171-178, 2021.

FAILLE, C. et al. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: Role of surface hydrophobicity. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 8, 2002.

FENN, J. B. et al. **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science**, 1989.

FERNANDES, S. et al. **Novel chemical-based approaches for biofilm cleaning and disinfection. Current Opinion in Food Science**, 2024.

FERREIRA, V. et al. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food Protection**, jan. 2014.

FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology** 2016 14:9, v. 14, n. 9, p. 563–575, 11 ago. 2016.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. **The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology**, 2010.

FRACALANZZA, S. A. P. et al. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, 2007.

FUKUZAKI, S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. **Biocontrol Science**, v. 11, n. 4, 2006.

GAWANDE, M. H. et al. Peroxyacetic Acid: A Potent Food Industry Sanitizer. **Indian Food Industry Magazine**, v. 32, n. 3, 2013.

GIAOURIS, E. et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, v. 97, n. 3, 2014.

GIAOURIS, E. et al. **Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. Frontiers in Microbiology**, 2015.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. **Biofilms in vitro and in vivo: Do singular mechanisms imply cross-resistance?** Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement. **Anais**. 2002.

GIRAFFA, G. **Enterococci from foods. FEMS Microbiology Reviews**, 2002.

GÖTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K.-H. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. Em: **The Prokaryotes**.

GRAM, L. et al. Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, 2002.

HABIMANA, O. et al. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* 0157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, 2010.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. **Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology**, 2004.

HANSEN, C. H.; VOGEL, B. F.; GRAM, L. Prevalence and Survival of *Listeria monocytogenes* in Danish aquatic and fish-processing environments. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 9, 2006.

HILBERT, L. R. et al. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 52, n. 3, 2003.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M. T. **Functionality of enterococci in meat products**. International Journal of Food Microbiology. **Anais...**2003.

IÑIGUEZ-MORENO, M.; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M.; AVILA-NOVOA, M. G. Kinetics of biofilm formation by pathogenic and spoilage microorganisms under conditions that mimic the poultry, meat, and egg processing industries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 303, 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **ISO. 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method**. Geneva, Switzerland, 2017.

ISMAÏL, R. et al. **Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: A review of the literature**. International Journal of Environmental Research and Public Health. MDPI, 14 nov. 2013.

JAMALI, H. et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, 2015.

JULIÃO, T. A. et al. Influence of the cleaning system of conveyor belts on microbiological quality of poultry meat. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 4, p. 1325–1332, 1 jul. 2018.

KAKURINOV, V. Food Safety Assurance Systems: Cleaning and Disinfection. Em: **Encyclopedia of Food Safety**. Elsevier, 2014. v. 4p. 211–225.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. **Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons**. **Analytical Chemistry**, 1988.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, 2013.

KRAMARENKO, T. et al. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. **Food Control**, v. 30, n. 1, 2013.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. **How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review**. **BMC Infectious Diseases**, 2006.

KRAWCZYK, B. et al. **The many faces of *Enterococcus* spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen.** *Microorganisms*, 2021.

KUNIGK, L.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Higienização na indústria de alimentos. Em: **Microbiologia dos Alimentos**. 2° edição ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2023. p. 203–220.

LANGSRUD, S. et al. **Bacterial disinfectant resistance - A challenge for the food industry.** *International Biodeterioration and Biodegradation*. **Anais...**Elsevier Ltd, 2003.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G.; BORGMANN-STRAHSEN, R. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 4, 2003.

LAY, J. O. **MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria.** *Mass Spectrometry Reviews*, 2001.

LI, Q. et al. **Formation of Multispecies Biofilms and Their Resistance to Disinfectants in Food Processing Environments: A Review.** *Journal of Food Protection*, 2021.

LIU, N. T. et al. Native microflora in fresh-cut produce processing plants and their potentials for biofilm formation. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 5, 2013.

LIU, Y. J. et al. Biofilm formation characteristics of *Pseudomonas lundensis* isolated from meat. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, 2015.

LORITE, G. S. et al. The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 359, n. 1, 2011.

MAES, S. et al. Identification and Spoilage Potential of the Remaining Dominant Microbiota on Food Contact Surfaces after Cleaning and Disinfection in Different Food Industries. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 2, p. 262-275, 2019.

MAFU, A. A. et al. Adhesion of pathogenic bacteria to food contact surfaces: Influence of pH of culture. **International Journal of Microbiology**, 2011.

MANDAL, S. et al. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, n. 0, 2015.

MANSFELD, F. **The interaction of bacteria and metal surfaces.** *Electrochimica Acta*, 2007.

MARQUES, S. C. et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, 2007.

MAZAHERI, T. et al. *Listeria monocytogenes* biofilms in the food industry: Is the current hygiene program sufficient to combat the persistence of the pathogen? **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2021.

MENDOZA, D. M.; AQUINO, M. G. B.; REYES, A. T. Assessment of enterococcus in fish and its environment: A study in tilapia farms operating in the budamasa areas of minalin, pampanga, philippines. **AACL Bioflux**, v. 16, n. 2, 2023.

MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 16, n. 5, p. 1022-1041, 2017.

PARTE, A. C. et al. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, 2020.

PIMENTEL-FILHO, N. DE J. et al. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, 2014.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer, 2009.

POŁASKA, M.; SOKOŁOWSKA, B. **Review bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry**. **AIMS Microbiology**. AIMS Press, 2019.

POPOVIĆ, N. T. et al. **Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS**. **Environmental Research**, 2017.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, 2013.

QUINTAVALLA, S.; BARBUTI, S. **Handbook of Fermented Meat and Poultry**. Em: TOLDRÁ FIDEL (Ed.). 1. ed. Blackwell Publishing, 2007. p. 483–490.

R CORE TEAM. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria**. URL <http://www.R-project.org/>, 2014.

RIDELL, J.; KORKEALA, H. Minimum growth temperatures of *Hafnia alvei* and other Enterobacteriaceae isolated from refrigerated meat determined with a temperature gradient incubator. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, n. 3, 1997.

RODRIGUES DOS SANTOS, E. A. et al. Inhibitory effects of piperine and black pepper essential oil on multispecies biofilm formation by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. **LWT**, v. 182, 1 jun. 2023.

RODRIGUES, L. B. et al. ATP-Bioluminescence and conventional microbiology for hygiene evaluation of cutting room surfaces in poultry slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1, 2018.

ROY, P. K. et al. Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, 2021.

ROZEWICKI, J. et al. MAFFT-DASH: Integrated protein sequence and structural alignment. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, 2019.

SANSEBASTIANO, G.; ZONI, R.; BIGLIARDI, L. Cleaning and disinfection procedures in the food industry general aspects and practical applications. Em: **Food Safety: A Practical and Case Study Approach**. Springer US, 2007. p. 253–280.

SARANGI, A. N.; GOEL, A.; AGGARWAL, R. **Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians**. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, 2019.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, 2009.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 9, 2009.

SIDONIO, L. et al. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. Em: **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades**. v. 35p. 421–463.

SILVA, G. et al. **Técnico em Alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010.

SINGHAL, N. et al. **MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis**. **Frontiers in Microbiology**, 2015.

SONG, F.; KOO, H.; REN, D. **Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation**. **Journal of Dental Research**, 2015.

SPENGLER, C. et al. Strength of bacterial adhesion on nanostructured surfaces quantified by substrate morphometry. **Nanoscale**, v. 11, n. 42, 2019.

STANGA, M. **Sanitation: Cleaning and Disinfection in the Food Industry**. Wiley-VCH, 2010.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, 2000.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, 2007.

STERNIŠA, M.; KLANČNIK, A.; SMOLE MOŽINA, S. Spoilage *Pseudomonas* biofilm with *Escherichia coli* protection in fish meat at 5 °C. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 10, 2019.

SUNDHEIM, G.; LANGSRUD, S. Natural and acquired resistance of bacteria associated with food processing environments to disinfectant containing an extract from grapefruit seeds. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 36, n. 3–4, 1995.

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

VAN SCHOTHORST, M.; OOSTEROM, J. Enterobacteriaceae as indicators of good manufacturing practices in rendering plants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 1, 1984.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. Contamination sources, serogroups, biofilm-forming ability and biocide resistance of *Listeria monocytogenes* persistent in tilapia-processing facilities. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 12, 2017.

WAGNER, E. M. et al. Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 328, p. 108668, 2020.

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

WOO, P. C. Y. et al. **Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories.** **Clinical Microbiology and Infection**, 2008.

WU, S. et al. *Listeria monocytogenes* prevalence and characteristics in retail raw foods in China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.

ZHAO, N. et al. A promoted MALDI-TOF-MS platform towards rapid and accurate identifications of bacteria. **Microchemical Journal**, v. 200, p. 110356, 2024.

ZHENG, S. et al. Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 643722, 2021.

**APÊNDICE 1 – CONTAGEM DE MICRORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE**TABELA – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS DE CONTAGEM EM log UFC/cm<sup>2</sup>

| <b>MO</b>              | <b>Obs.</b> | <b>NA</b> | <b>Min-Max</b> | <b>Média</b> | <b>Desvio-padrão</b> |
|------------------------|-------------|-----------|----------------|--------------|----------------------|
| Mesófilos              | 33          | 17        | -0.9-3.8       | 0.40         | 1.26                 |
| Psicrotróficos         | 25          | 25        | 0.1-4.0        | 1.64         | 1.06                 |
| <i>Pseudomonas</i> spp | 16          | 34        | -0.6-3.0       | 1.09         | 1.13                 |