

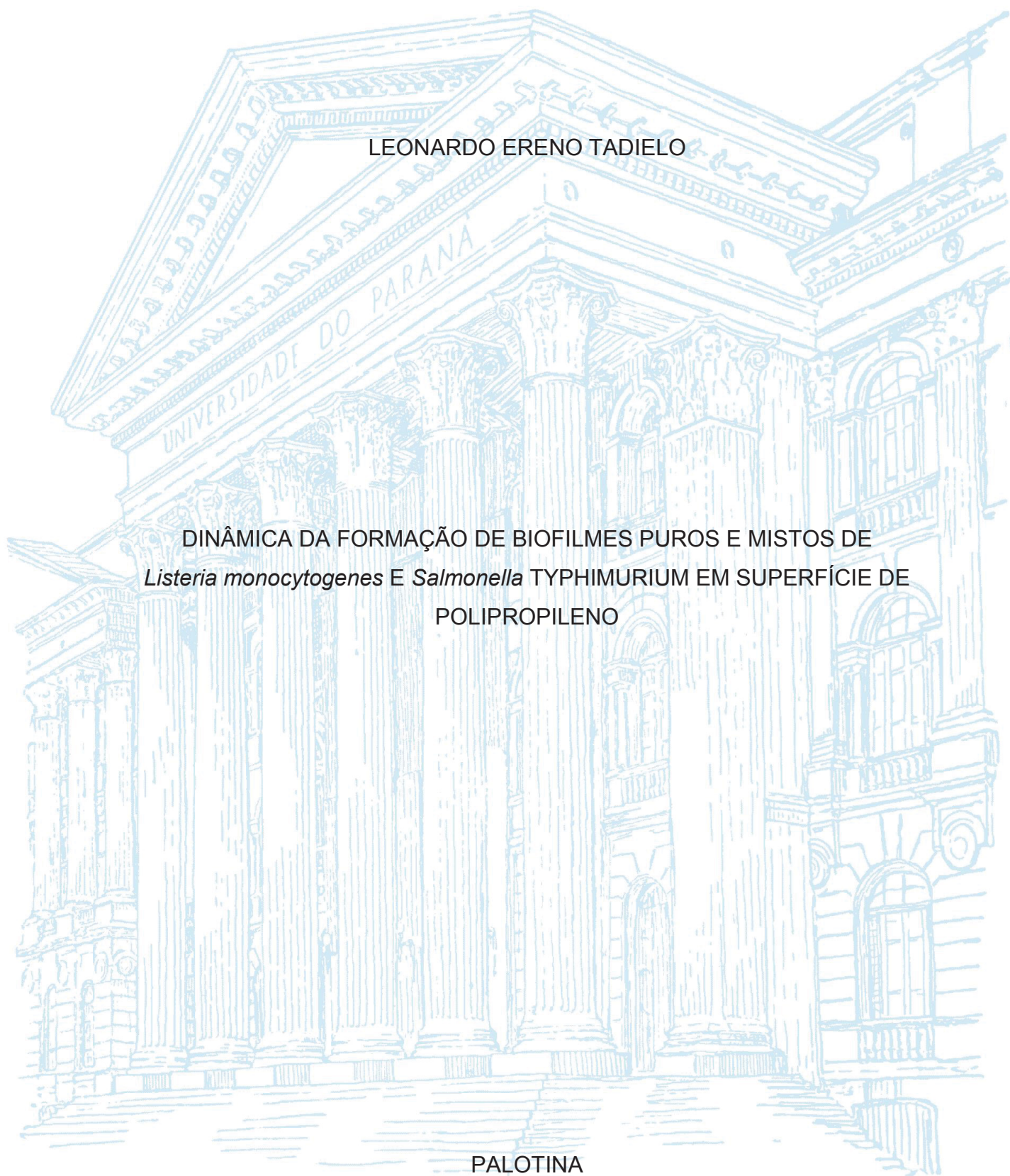
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO ERENO TADIELO

DINÂMICA DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES PUROS E MISTOS DE
Listeria monocytogenes E *Salmonella* TYPHIMURIUM EM SUPERFÍCIE DE
POLIPROPILENO

PALOTINA

2020



LEONARDO ERENO TADIELO

DINÂMICA DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES PUROS E MISTOS DE
Listeria monocytogenes E *Salmonella* TYPHIMURIUM EM SUPERFÍCIE DE
POLIPROPILENO

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot.

PALOTINA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T121 Tadielo, Leonardo Ereno
Dinâmica da formação de biofilmes puros e mistos de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium em superfície de polipropileno / Leonardo Ereno Tadielo – Palotina, 2020.
86f.

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

1. Biofilmes maduros. 2. Expressão gênica. 3. Indústria de alimentos. 4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV). 5. Persistência. I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LEONARDO ERENO TADIELO** intitulada: **Dinâmica da formação de biofilmes puros e mistos de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* em superfície de polipropileno**, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre 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, 20 de Fevereiro de 2020.

LUCIANO DOS SANTOS BERSOT

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

WLADIMIR PADILHA DA SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS)

VINICIUS CUNHA BARCELLOS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Leonardo Ereno Tadielo, filho de Tânia de Fátima Ereno Tadielo e Almerindo Tadielo, nascido em 17 de maio de 1994 no município de Jaguari, estado do Rio Grande do Sul. Técnico Agropecuário pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha (IFFarroupilha), campus São Vicente do Sul no ano de 2012. Médico Veterinário graduado em 2017 pela Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus Uruguaiana. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, na linha de pesquisa Microbiologia Aplicada à Produção Animal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, fonte inesgotável de sabedoria, compaixão e afeto. Parceiro fiel de conversas em forma de orações, de modo a agradecer, suplicar bençãos, e reforçar minha fé.

Aos meus pais, Almerindo e Tânia, meus portos seguros, os quais me ensinaram a ser um homem correto, responsável e educado, e que abdicaram de inúmeras coisas, perderam noites de sono, em prol de minha felicidade, fornecendo apoio fundamental em minhas escolhas. Podem ter certeza, todas as minhas decisões foram tomadas a partir de vossos ensinamentos. Obrigado por entender os momentos que me fiz ausentes, que tive dedicação exclusiva aos estudos.

A minha irmã e amiga Letiani, por todo o afeto, carinho, estímulos, conselhos e preocupações. Por ser minha fiel confidente em momentos de incerteza, sendo fundamental para aliviar os momentos de tensão. E também por repetir incansavelmente a frase: “Calma, tudo dá certo no final, basta você acreditar!”.

A minha amiga e namorada Emanoelli, pelas palavras de amor e incentivo, por ser minha companheira em todas as horas, tanto na vida pessoal como profissional. Obrigado por estar sempre ao meu lado, garantindo o amparo necessário nos momentos em que tudo parecia estar dando errado, mostrando-me a calma, a paz e a fé.

Aos meus amigos, em especial ao Thiago, Jhennifer, Rosana, Victor, Wilson, Marinara e Vanessa por dividir inúmeros momentos, tanto de felicidade como de tristeza, mas sempre torceram por mim.

Ao querido orientador professor Luciano dos Santos Bersot, primeiramente pelo aceite da orientação, e por ter depositado nesses últimos anos a confiança na execução das atividades, sempre buscando meu crescimento. Ao mesmo tempo, agradeço pelo acolhimento das ideias, cobranças e entusiasmo na elaboração do projeto. Sua generosidade, paciência e liderança são características que buscarei levar para minha carreira profissional.

Ao meu amigo professor Juliano, pessoa incrível a qual admiro, por todos os conselhos, ideias, ensinamentos, paciência durante a graduação e pelo papel fundamental na escolha do lugar para realização do mestrado. E mesmo, não participando afetivamente do projeto, sempre mostrou-se solícito em ajudar.

Aos integrantes do Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA) da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, em especial ao Thiago, Emanoelli, Jhennifer, Tais e Victor que foram fundamentais na execução do projeto, seja nas coletas, preparação de meios, pipetagem, lavagem de vidrarias, dentre outras tantas atividades. Nossas convivências diárias, foram regadas de muitos ensinamentos, surpresas, companheirismo, dúvidas e anseios. Ao Professor Vinicius, pelas ideias e auxílio científico na execução de atividades laboratoriais de pesquisa e ensino. A técnica Rosana, por ser uma pessoa cativante, por demonstrar um sorriso farto em todas as manhãs, o que muitas vezes era fonte de ânimo sem igual, e claro por auxiliar nas “finanças” do projeto.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Professor Ricardo Seiti Yamatogi e ao Professor Luís Augusto Nero, por disponibilizar o laboratório e tudo o que era necessário para a realização de importantes etapas desse trabalho. À todos do InsPOA-UFV, em especial a Rafaela e Danilo, com supervisão do Professor Ricardo que me ensinaram e auxiliaram nas análises moleculares, bem como pela amizade e parceira ali concretizadas.

Ao Professor Vinicius Cunha Barcellos e ao Professor Wladimir Padilha da Silva pelo aceite de compor a banca avaliadora.

A Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) pelo auxílio na execução do projeto de pesquisa e ao corpo docente do PPGCA pelo conhecimento adquirido.

A CAPES pela bolsa concedida.

Por fim, à todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para conclusão dessa etapa, meu muito obrigado!

“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes mesmo de terminar.
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

RESUMO

Biofilmes multiespécies são ecossistemas microbianos complexos que podem ser fonte de contaminação entre ambientes industriais e alimentos. O estudo, teve como objetivos realizar a caracterização molecular e avaliar expressão de genes relacionados à formação de biofilme, bem como, a dinâmica de formação e arquitetura de biofilmes puros e mistos de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*. Os três isolados de *L. monocytogenes* foram submetidos a caracterização de genes relacionados a formação de biofilme (*flaA*, *prfA*, *luxS*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*), a resistência a biocidas (*mdrT*, *mdrM*, *mdrL*, *idE*), a adaptação ao pH e a concentrações de sal (*SSI-1 Imo 0444*, *SSI-1 Imo 0445*, *SSI-1 Imo 0446*). Um isolado de *S. Typhimurium* foi submetido a avaliação de genes envolvidos na produção de fímbrias, adesão, virulência, formação de celulose e biofilme (*adrA*, *lpfA*, *agfA*, *sipA*), a *quorum sensing* (*sidA*) e a resistência ao amônio quaternário (*qacED1*). A dinâmica de formação de biofilmes puros e mistos foi avaliada nos tempos de 1 h, 24 h, 96 h e 120 h em superfície de polipropileno a 12 °C e 37 °C. Os biofilmes maduros de *L. monocytogenes* na condição pura e associada com *S. Typhimurium* em superfície de polipropileno a 12 °C e 37 °C foram submetidos a expressão dos genes *flaA*, *prfA*, *luxS* e *agrABCD*. Os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram os genes *flaA*, *prfA*, *luxS*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*, *mdrT*, *mdrM*, *mdrL* e *idE*, e *S. Typhimurium* carregava os genes *adrA*, *lpfA*, *agfA*, *sipA*, *sidA*. O crescimento planctônico e séssil de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* foi relacionado a temperatura de incubação, obtendo-se contagens mais elevadas em 24 h a 37 °C, e em 96 h e 120 h a 12 °C. A adesão inicial de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* foi afetada negativamente pela condição mista ($p < 0,001$). Biofilmes puros de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* apresentaram contagens mais elevadas em 96 h e 120 h quando comparados as populações individuais em biofilmes mistos. Contudo, não foi observado diferença estatística na contagem entre biofilmes puros de *L. monocytogenes*, puros de *S. Typhimurium* e a população total em biofilmes mistos (*Listeria+Salmonella*) a 12 °C. Em MEV, pode-se observar estrutura de aspecto viscoso promovendo a adesão (1 h) bacteriana em biofilmes mistos, e a partir de 24 h a presença de matriz exopolissacarídeos (EPS). Biofilmes puros e mistos foram capazes de manter células viáveis por 3000 h a 10 °C com contagens superiores a 120 h ($p < 0,05$). Biofilmes maduros de *L. monocytogenes* não sofreram interferência da temperatura, superfície e condição mista com *S. Typhimurium* sobre a expressão dos genes *prfA*, *luxS* e *agrBCD*, contudo houve interferência na expressão de *flaA* e *agrA*. Desse modo, a caracterização da dinâmica de formação de biofilmes mistos, juntamente com presença e expressão de genes relacionados a formação de biofilme, demonstrou a associação desses patógenos para a formação e manutenção de biofilmes mistos, e além disso, torna-se resultados importantes para a indústrias de alimentos e saúde pública.

Palavras-chaves: Biofilmes maduros; expressão gênica; indústria de alimentos, microscopia eletrônica de varredura (MEV), persistência

ABSTRACT

Multispecies biofilms are complex microbial ecosystems that can be a source of contamination between industrial environments and food. The study aimed to evaluate the molecular characterization and expression of genes related to biofilm formation and stressful conditions, and the dynamics of formation and architecture of pure and mixed biofilms of *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium*. *L. monocytogenes* isolates were subjected to the characterization of genes related to biofilm formation (*flaA*, *prfA*, *luxS*), to stressful conditions (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*), biocide resistance (*mdrT*, *mdrM*, *mdrL*, *idE*), adaptation to pH and salt concentrations (*SSI-1 Imo 0444*, *SSI-1 Imo 0445*, *SSI-1 Imo 0446*, *LMOF2365_0481*). *S. Typhimurium* was evaluated for genes linked to fimbriae production, adhesion, virulence, cellulose and biofilm formation (*adrA*, *lpfA*, *agfA*, *sipA*), quorum sensing (*sidA*) and resistance to quaternary ammonium (*qacEΔ1*). The formation of pure and mixed biofilms was evaluated at 1h, 24h, 96h and 120h on the polypropylene surface at 12°C and 37°C. The mature biofilms of *L. monocytogenes* were subjected to the gene expression the *flaA*, *prfA*, *luxS*, and *agrABCD*. The isolates of *L. monocytogenes* presented the genes *flaA*, *prfA*, *luxS*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*, *mdrT*, *mdrM*, *mdrL* and *idE*, and *S. Typhimurium* demonstrated the genes *adrA*, *lpfA*, *agfA*, *sipA*, *sidA*. Planktonic and sessile growth was directly related to incubation temperature, obtaining higher counts in 24h at 37°C, and in 96h at 12°C. The initial adhesion of *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* was affected by the mixed condition ($p < 0.001$). Pure biofilms from *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* showed higher counts in 96h and 120h when compared to individual populations in mixed biofilms. However, no statistical difference was observed between pure biofilms of *L. monocytogenes*, pure *S. Typhimurium* and the total population in mixed biofilms (*Listeria+Salmonella*), especially at 120h/12°C. It was observed that the dispersion of adhered cells directly affected the maintenance of planktonic cells, especially after 96h in both temperatures. In SEM, structure of the viscous aspect could be observed promoting bacterial adhesion (1h) in mixed biofilms, and after 24h with the presence of matrix exopolysaccharides (EPS). The pure and mixed biofilms were able to maintain viable cells for 3000h at 10°C with counts greater in 120h ($p < 0.05$). Mature biofilms of *L. monocytogenes* were not affected by temperature, surface, and association with *S. Typhimurium* on the expression of *prfA*, *luxS* and *agrBCD* genes, interfering with the expression of *flaA* and *agrA*. Thus, the dynamics of the formation of mixed biofilms, linked to the presence and expression of genes related to the formation biofilms, are factors that prove the association of these pathogens for the formation and maintenance of mixed biofilms, it becomes important results for the food industries and the public health.

Keywords: food industry; gene expression; mature biofilms; persistence; scanning electron microscopy (SEM)

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

- FIGURA 1: ESTÁGIO DO DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME BACTERIANO. 1) ADSORÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA E CÉLULAS BACTERIANAS; 2) ADESÃO BACTERIANA REVERSÍVEL COM FORMAÇÃO DE MICROCOLÔNIAS E INÍCIO DO MECANISMO DE *QUORUM SENSING* (QS); 3) AGREGADOS DE MICROCOLÔNIAS COM INÍCIO DA DEPOSIÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS; 4) BIOFILME MADURO COM ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL E RUPTURA DA ESTRUTURA COM (5) DISPERSÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS. ADAPTADO DE MACEDO E ABRAHAM (2009).24
- FIGURA 2: DIAGRAMA CONCEITUAL DA SEÇÃO DE MATERIAL E MÉTODOS DA DISSERTAÇÃO.....34

Capítulo 1

- FIGURA 1: BIOFILMES DE *L. monocytogenes* EM SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO EM 1h/12°C (A), 24h/12°C (B), 96h/12°C (C) E 120h/12°C (D); E EM 1h/37°C (E), 24h/37°C (F), 96h/37°C (G) E 120h/37°C (H); BIOFILMES DE *S. TYPHIMURIUM* EM 1h/12°C (I), 24h/12°C (J), 96h/12°C (K) E 120h/12°C (L); E EM 1h/37°C (M), 24h/37°C (N), 96h/37°C (O) E 120h/37°C (P).BIOFILMES DE *L. monocytogenes* + *S. TYPHIMURIUM* EM 1h/12°C (Q), 24h/12°C (R), 96h/12°C (S) E 120h/12°C (T); E EM 1h/37°C (U), 24h/37°C (V), 96h/37°C (W) E 120h/37°C (X)...48
- FIGURA 2: DINÂMICA DE CRESCIMENTO PLANCTÔNICO (Log UFC/mL) E SÉSSIL (Log UFC/cm²) DE *L. monocytogenes* pura a 12 °C (A); *L. monocytogenes* associada *S. TYPHIMURIUM* a 12 °C (B); *L. monocytogenes* pura a 37 °C (C); *L. monocytogenes* associada *S. TYPHIMURIUM* a 37 °C (D); *S. TYPHIMURIUM* PURA a 12 °C (E); *S. TYPHIMURIUM* associada a *L. monocytogenes* 12 °C (F); *S. TYPHIMURIUM* PURA a 37 °C (G); *S. TYPHIMURIUM* associada a *L. monocytogenes* 37 °C (H).49

FIGURA 3: DINÂMICA DE CRESCIMENTO SÉSSIL DE BIOFILMES PUROS DE *L. monocytogenes*, PUROS DE *S. TYPHIMURIUM* COM AS CONTAGENS TOTAIS DE *L. monocytogenes* E *S. TYPHIMURIUM* EM BIOFILMES MISTOS (*Listeria+Salmonella*) A 12 °C (A) E 37 °C (B)51

FIGURA 4: BIOFILMES DE *L. monocytogenes* (A), *S. TYPHIMURIUM* (B) E *L. monocytogenes* + *S. TYPHIMURIUM* (C) EM SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO MANTIDOS A 10 °C POR 3000 h.52

Apêndice

FIGURA 1: CURVAS DE PRESENÇA E AUSÊNCIA DE EXPRESSÕES GÊNICAS DOS GENES *rlpD1*, *invA*, *prfA*, *flaA*, *luxS*, *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD* EM BIOFILMES PUROS DE *L. monocytogenes* e MISTOS COM *S. TYPHIMURIUM* A 12 °C e 37 °C.....82

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

TABELA 1: GENES ALVO, SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E POSITIVIDADE DOS ISOLADOS DE *L. monocytogenes* e *S. TYPHIMURIUM*.40

TABELA 2: DINÂMICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES PUROS E MISTOS DE *L. monocytogenes* E *S. TYPHIMURIUM* SOBRE A POPULAÇÃO INDIVIDUAL DE CADA MICRORGANISMO EM SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO A 12 E 37°C EM DIFERENTES TEMPOS DE CONTATO.46

TABELA 3: DINÂMICA DE CRESCIMENTO PLANCTÔNICO (Log UFC/mL) DE *L. monocytogenes* E *S. TYPHIMURIUM* EM CONDIÇÃO PURA E ASSOCIADA A 12 °C E 37 °C EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO.....50

Apêndice

TABELA 1: DINÂMICA DE CRESCIMENTO PLANCTÔNICO (Log UFC/mL) E SÉSSIL (Log UFC/cm²) DE *L. monocytogenes* E *S. TYPHIMURIUM* EM RELAÇÃO A POPULAÇÃO TOTAL DOS BIOFILMES PUROS E MISTOS A 12 °C E 37 °C.81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	– Autoindutores
AI-1	– Autoindutor 1
AI-2	– Autoindutor 2
AI-3	– Autoindutor 3
CDC	– Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	– Ácido desoxirribonucleico complementar
CLSI	– <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DPD	– 4,5 di-hidroxi-2,3-pentanodiona
EPS	– Exopolissacarídeos
MEV	– Microscopia eletrônica de varredura
OXA	– <i>Oxford Listeria Agar</i>
PBS	– <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
PFGE	– <i>Pulsed Field Gel Eletroforese</i>
pH	– Potencial hidrogeniônico
QS	– <i>Quorum sensing</i>
RNA	– Ácido ribonucleico
SAH	– S-adenosil-homocisteína
SRH	– S-ribosil-homocisteína
TSB	– <i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	– Unidade Formadora de Colônia
XLD	– <i>Xylose Lysine Deoxycholate Agar</i>
YE	– <i>Yeast extract</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 CARACTERÍSTICAS DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	19
2.2 CARACTERÍSTICAS DE <i>SALMONELLA SP.</i>	21
2.3 BIOFILMES MICROBIANOS NAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS	23
2.4 FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> E <i>SALMONELLA SP.</i>	26
2.5 ASPECTOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> E <i>SALMONELLA SP.</i>	28
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.1.1 Objetivos específicos.....	33
4 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES PUROS E MISTOS DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> E <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> EM SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO	35
4.1 INTRODUÇÃO	36
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.2.1 Obtenção dos isolados.....	37
4.2.2 Caracterização molecular dos isolados de <i>L. monocytogenes</i>	38
4.2.3 Caracterização molecular de <i>S. Typhimurium</i>	39
4.2.4 Dinâmica de formação de biofilmes puros e mistos de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. Typhimurium</i> em cupons de polipropileno.....	42
4.2.5 Avaliação da expressão de genes relacionados a formação de biofilme em biofilme maduros de <i>L. monocytogenes</i>	43
4.2.6 Avaliação da arquitetura dos biofilmes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
4.2.7 Análise estatística	45
4.3 RESULTADOS	45
4.3.1 Caracterização molecular dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S.</i> <i>Typhimurium</i>	45

4.3.2 Efeito da condição de crescimento (cultivo puro ou misto) na dinâmica de formação de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. Typhimurium</i> em superfície de polipropileno	45
4.3.4 Dinâmica de formação de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. Typhimurium</i> compondo a população total	50
4.3.5 Viabilidade de biofilmes persistentes por 3000 h a 10 °C	52
4.3.5 Presença e ausência da expressão de genes de formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> em biofilmes maduros de 120 h puros e em associação com <i>Salmonella</i> , a 12 °C e 37 °C em superfície de polipropileno	53
4.4 DISCUSSÃO	53
4.5 CONCLUSÃO	58
4.6 REFERÊNCIAS	58
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE	81

1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes são caracterizados como ecossistemas microbianos complexos formados de uma ou mais espécies imersas em uma matriz de polímeros extracelulares, composta principalmente por proteínas, polissacarídeos e DNA. Essas estruturas proporcionam a sobrevivência e persistência de microrganismos patogênicos nos ambientes industriais, pois confere proteção, adaptabilidade e resistência aos processos tecnológicos. A formação de biofilme é uma das grandes preocupações das indústrias de alimentos pois afeta a qualidade microbiológica dos produtos, aumentando as perdas econômicas e expondo os consumidores ao risco biológico, através da biotransferência de microrganismos patogênicos entre ambientes e produtos.

As áreas de manipulação e processamento de matérias-primas alimentares, especialmente na indústria de abate e processamento de produtos de origem animal, possuem inúmeras superfícies que entram em contato com os produtos, sendo consideradas fontes de contaminação por microrganismos. Vários materiais como aço inoxidável, poliuretano, poliestireno, polipropileno são utilizados nesses ambientes, apresentando características distintas principalmente em relação a sua hidrofobicidade, fator que interfere diretamente na adesão bacteriana. Desse modo, há entendimento que o processo de formação do biofilme depende da interação entre as células bacterianas, da superfície de fixação e das condições ambientais, contribuindo para a adesão inicial, consolidação, maturação e dispersão dos biofilmes formados (MACEDO e ABRAHAM, 2009).

Listeria monocytogenes e *Salmonella* sp. são patógenos microbianos veiculados por alimentos e apresentam a capacidade de aderir e formar biofilmes em diferentes superfícies de uso industrial, dependendo da temperatura ambiente e da presença de nutrientes, entre outros fatores. Inúmeros estudos científicos realizados nas últimas duas décadas tem procurado simular a formação de biofilmes de bactérias patogênicas para entender o comportamento dos microrganismos na matriz, seu tempo de formação, os métodos de eliminação e sua resistência a sanitizantes. Contudo, tais estudos descrevem a formação de biofilme desses microrganismos em culturas monoespécies e, mais recentemente, em biofilmes multiespécies. Porém, não foi verificado até o momento, estudos demonstrando a interação entre isolados de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. sob condições industriais. Os biofilmes multiespécie

podem exibir mecanismos sinérgicos, antagônicos ou de competição, promovendo uma variedade de comportamentos da microbiota participante, facilitando sua maior resistência e dificuldade de eliminação (KOSTAKI et al., 2012; HEIR et al., 2018).

A resistência de um biofilme em ambientes industriais está relacionada a mecanismos genéticos ligados a virulência, a formação de biofilmes propriamente dita e a tolerância a condições de estresse. Os níveis de expressão dos genes que regulam estas características são relacionados com a capacidade de adesão dos isolados, as temperaturas de incubação, ao material da superfície estudada, a presença de substratos orgânicos e de distintos microrganismos, como exemplo, os genes de detecção de *quorum sensing* em *L. monocytogenes* (sistema *agr*) e *Salmonella* sp. (*luxS* e *sidA*) modulam a comunicação celular, formação e manutenção dos biofilmes (BAI e RAI, 2011; JU et al. 2018; LAMAS et al, 2018).

A arquitetura dos biofilmes pode variar de acordo as condições hidrodinâmicas, disponibilidade de nutrientes, temperaturas, tipo de microrganismos, motilidade bacteriana, comunicação celular, além da quantidade de EPS produzido, sendo que a presença de poros e canais na matriz de EPS auxiliam na distribuição de nutrientes, e a deposição de estrutura de aspecto viscoso contribui para consolidação do biofilme, formando estrutura tridimensional que promove a ramificação sobre as superfícies (PILCHAVÁ et al., 2014; REIS-TEIXEIRA et al., 2017).

Desse modo, justifica-se o desenvolvimento desse estudo, pois os isolados de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* utilizados neste estudo são provenientes de superfícies de equipamentos e utensílios após a higienização pré-operacional em indústria de abate e processamento de suínos, e é fundamental entender a dinâmica de formação de biofilmes multiespécies em condições industriais e seus mecanismos genéticos, possibilitando desenvolver estratégias para a prevenção e controle desses nichos ecológicos em ambientes industriais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DE *Listeria monocytogenes*

Atualmente, o gênero *Listeria*, pertencente à família Listeriaceae é compreendido por dezessete espécies, classificadas de acordo com características bioquímicas e avaliações moleculares. São elas: *L. monocytogenes* (PIRIE, 1940), *L. grayi* (LARSEN e SEELIGER, 1966), *L. innocua* (SEELIGER, 1981), *L. welshimeri*, *L. seeligeri* (ROCOURT & GRIMONT, 1983), *L. ivanovii* (SEELIGER et al., 1984), *L. marthii* (GRAVES et al., 2010), *L. rocourtiae* (LECLERCQ et al., 2010), *L. fleischmannii* (BERTSCH et al., 2013), *L. weihenstephanensis* (HALTER et al., 2013), *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis* (DEN BAKKER et al., 2014), *L. booriae* e *L. newyorkensis* (WELLER et al., 2015).

Listeria monocytogenes é considerada a espécie de maior importância na epidemiologia de casos e surtos veiculados por alimentos em humanos e animais. A listeriose, dependendo das condições imunológicas dos indivíduos hospedeiros, pode apresentar dois quadros: quadro não invasivo, expresso através de gastroenterite leve e febril; quadro invasivo, caracterizado por meningites, encefalites, abscessos cerebrais e aborto, acometendo principalmente grupos de riscos, incluindo gestantes, crianças, idosos e indivíduos com sistema imunológico comprometido (BUCHANAN et al., 2017). Além disso, *L. ivanovii* possui importância epidemiológica por desenvolver doenças que acometem o sistema nervoso de ruminantes (HOFER et al., 2000; ROCHA et al., 2017), e *L. innocua* que pode ser considerada indicativo ambiental para a presença de *L. monocytogenes* (D'AMICO e DONNELLY, 2009), e pode apresentar capacidade hemolítica compreendida pelo agrupamento de genes de virulência regulada por *prfA* (Ilha 1 de patogenicidade de *Listeria*) de *L. monocytogenes* (JOHNSON et al., 2004; MORENO et al., 2014)

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Listeria* são caracterizados por serem bacilos curtos (0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 0,5 a 2 µm de comprimento), Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e móveis a 25°C devido à presença de flagelos peritríquios. *L. monocytogenes* possui capacidade de se adaptar e sobreviver a uma ampla faixa de condições estressantes como privação de nutrientes, oscilações de pH (4,6 a 9,6), concentrações elevadas de sal (>10%), baixa atividade de água (>0,92) e ampla faixa de temperatura (0 a 45°C), sendo reconhecido

como microrganismo psicrotrófico (DOYLE et al., 1997; SLEATOR et al, 2003; LIU et al, 2005; SILVA et al, 2008; KADAM et al., 2013; LEE et al., 2017). Assim, estas características podem contribuir para a ocorrência de cepas persistentes em ambientes de processamento de alimentos, muitas vezes relacionado a capacidade de adesão e formação de biofilmes (MAGALHÃES et al., 2016; SERENO et al., 2019; CARVALHO et al., 2019).

L. monocytogenes pode apresentar diversos mecanismos genéticos relacionados a fatores de virulência e patogenicidade, bem como a estruturas antigênicas através de antígenos somáticos (O) e flagelares (H) onde apresenta treze sorotipos identificados (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) (DOUMITH et al., 2004; HENRIQUES et al., 2017; KANKI et al., 2018). Todos os sorotipos são capazes de causar doenças em humanos, contudo, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são os mais identificados em alimentos e surtos (LIU et al., 2007; BURALL et al., 2017; LOTFOLLAHI et al., 2017; POIMENIDOU et al., 2018).

L. monocytogenes por apresentar natureza ubíqua, pode ser encontrada na vegetação, solo, fezes de humanos e animais, esgoto e água. Além disso, os alimentos de origem animal e vegetal podem ser fontes de veiculação do microrganismo, com destaque para leite e seus derivados, carnes *in natura* e congeladas, peixes, frutos do mar, frutas e verduras, além de sobreviver em equipamentos e utensílios dos ambientes de processamento de alimentos (JAMALI et al., 2013; HADJILOUKA et al., 2018; MOHAMED et al., 2018; GONÇALVES-TENÓRIO et al., 2018, SERENO et al, 2019; CARVALHO et al., 2019).

Com relação aos casos e surtos de listeriose via alimentos, nos Estados Unidos da América (EUA), foram notificados 80 surtos de listeriose entre os anos de 1998 a 2017, com 945 pessoas envolvidas, 691 hospitalizações e 140 óbitos (CDC, 2019). Na União Europeia (UE), em 2017, foram confirmados 2480 casos de listeriose humana de origem alimentar, causando 225 óbitos (EFSA, 2018). Assim, esse microrganismos, embora apresente baixa incidência demonstra a maior taxa de letalidade dentre os patógenos de origem alimentar (EFSA, 2018; CDC, 2019). No Brasil, apesar de existir inúmeros trabalhos de isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos (JAMALI et al., 2013; MOHAMED et al., 2018; GONÇALVES-TENÓRIO et al., 2018) e de infecções clínicas (SCHWAB e EDELWEISS, 2003; ALMEIDA et al., 2017) ainda são inexistentes a associação entre patógeno encontrado em alimentos

e a casos clínicos, provavelmente devido ao longo período de incubação e subnotificação dos casos.

2.2 CARACTERÍSTICAS DE *Salmonella* sp.

Salmonella sp. pertence à família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase e catalase positiva, urease negativa, produzem H₂S, utilizam o citrato como fonte de carbono e fermentam a glicose produzindo ácido e gás (exceto *S. Typhi*) (JAY, 2005). São móveis devido a presença de flagelos peritríquios, exceto os sorotipos *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* que são imóveis. Exibem diversos mecanismos de tolerância a condições de estresse como resistência à antibióticos, a acidificação e ao tratamento térmico, produção de enzimas betalactamases de espectro ampliado (ESBL), formação de biofilmes e resistência à sanitizantes (TAMBER, 2018; LAMAS et al., 2018; ZWE et al., 2018; MORAIS et al., 2019; PERIN et al, 2019; VIANA et al, 2019; CRUCCELLO et al; 2019; DJEBBI-SIMMONS et al., 2019; PEREIRA et al., 2020).

O gênero *Salmonella* consiste de duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *S. enterica* é dividida em seis subespécies, sendo elas: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Devido a grande variedade de antígenos somáticos (O) e flagelares (H), o gênero *Salmonella* apresenta 2.659 sorotipos descritos, e por sua vez a espécie *S. enterica* é a mais estudada atualmente, pois apresenta o maior número de sorotipos (GUIBOURDENCHE et al., 2010; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). *S. enterica* subsp. *enterica* apresenta 1586 sorotipos, e dentre eles *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* se destacam por serem os principais responsáveis por causar infecções em humanos (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

Salmonella sp. está amplamente distribuída na natureza, tendo o trato gastrointestinal dos animais como seu principal reservatório. Principalmente por esta via, ingressa nas plantas de abate e processamento industrial, contaminando os produtos e suas superfícies de contato (KICH et al., 2011; IGLESIAS et al., 2017; PERIN et al., 2019; VIANA et al, 2019), sendo constantemente apontado como principal patógeno responsável por ocasionar surtos (BRASIL, 2018a, CDC, 2019;

EFSA, 2018). Nos EUA, foram notificados 3.467 surtos de salmonelose entre 1998 e 2017, com 83.061 pessoas envolvidas, 10.335 hospitalizações e 127 mortes (CDC, 2019). Na União Europeia, *Salmonella* sp. foi causa de 91.661 casos de doenças em humanos, levando a 225 óbitos, sendo o segundo principal patógeno reportado em causas hospitalizações no ano de 2017 (EFSA, 2018).

Inúmeros alimentos de origem animal e vegetal podem ser fonte para veiculação do patógeno, dentre eles destacam-se leite cru e seus derivados, carnes bovinas, suínas, aves, peixes, frutos do mar, frutas, legumes e vegetais (DHINGANI et al., 2018; CAVALIN et al., 2018; VERMA et al., 2018; ZWE et al., 2018; RUBINI et al., 2018; SANTOS et al., 2019; PERIN et al., 2019; ZENG et al., 2019; CUNHA-NETO et al., 2019) sendo que, estes podem ser contaminados em qualquer ponto da cadeia alimentar, desde a produção, processamento, comercialização, preparo e consumo (JARVIS et al., 2016).

No Brasil, entre os anos de 2000 a 2017, foi o principal agente etiológico identificado em surtos de doenças veiculadas por alimentos (BRASIL, 2018a). Segundo o Programa de Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus, instituído pela Instrução Normativa nº 20/2016, houve 17,97% (466/2592) de amostras contaminadas pelo patógeno no ano de 2016 (BRASIL, 2018b). Dentre os principais sorotipos identificados nos abatedouros frigoríficos e cortes cárneos de aves no Brasil estão, *S. Minnesota* (4 a 90%), *S. Heidelberg* (27 a 56%); *S. Typhimurium* (0,4 a 43%), *S. Enteritidis* (0,8% a 17%), *S. Saintpaul* (7%), *S. Ndolo* (6%) (PANZENHAGEN et al., 2016; RISTORI et al., 2017; MACHADO et al., 2017; MIRANDA et al., 2017; BRITO et al., 2019; PERIN et al., 2019; DANTAS et al., 2020).

No Programa de avaliação de *Salmonella* sp. em carne bovina *in natura*, foi identificado 1,60% (21/1310) de amostras positivas no ano de 2016 (BRASIL, 2018b). Iglesias et al. (2017), detectaram 8,5% (17/200) de carcaças bovinas positivas para *Salmonella* sp. em dois abatedouros frigoríficos no sul do Brasil, e com isolados demonstrando perfil de resistência a mais de uma classe de antimicrobiano. Kich et al. (2011), avaliando 12 rebanhos suínos abatidos em uma planta de processamento de carne suína no estado de Santa Catarina, Brasil, detectaram 38,71% (487/1258) de *Salmonella* sp., tendo como principais sorotipos: *S. Typhimurium*, *S. Panamá*, *S. Senftenberg*, *S. Derby* e *S. Mbandaka*. Viana et al. (2019) obtiveram 12,5% (105/840) de amostras positivas, com isolados contendo genes de resistência a antimicrobianos

e perfil de resistências a múltiplas drogas, corroborando com os resultados obtidos por Bersot et al. (2019) que apresentaram 10,2% (160/1568) de amostras positivas em que o sorovar Typhimurium foi o mais prevalente.

Assim, a salmonelose é uma doença veiculada por alimentos que apresenta distribuição mundial, e sua gravidade é variável de acordo o sorovar, dose infectante, natureza dos alimentos contaminados e estado de saúde do hospedeiro (VÁZQUEZ et al., 2014). Os sintomas caracterizam-se por dor abdominal, calafrios, febre, vômito, desidratação e dores de cabeça, com período de incubação de 5 a 72 horas. A recuperação ocorre entre 1 a 3 dias após sintomas, sendo na maioria autolimitante (ANDRADE et al., 2010). No entanto, os grupos de riscos, instituídos por idosos, gestantes, crianças e imunocomprometidos merecem atenção, já que seu sistema imune pode não ser capaz de debelar a infecção necessitando de antibioticoterapia (ENG et al., 2015)

2.3 BIOFILMES MICROBIANOS NAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS

Os biofilmes microbianos são um modo de sobrevivência de muitos microrganismos encontrados na natureza, pois permite a adaptação e permanência em diferentes ambientes através do desenvolvimento de agregados celulares aderidos em superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON et al. 1999; GIAOURIS et al., 2015). Os biofilmes podem contribuir de forma benéfica para a saúde de animais, plantas e seres humanos, pois são comensais da microbiota desses seres vivos, e tem como objetivos principais auxiliar em processos metabólicos relacionados a digestão e no combate a microrganismos patogênicos (JONES e VERSALOVIC, 2009; SENEVIRATNE et al., 2011; GUTT et al., 2018; GUTT et al., 2018). Quando produzidos em escala controlada, contribuem em processos biotecnológicos para a produção de biocombustíveis e elaboração de aditivos para aplicação em indústrias químicas e alimentares (KUMAR et al., 2017; HOSSAIN et al., 2020).

No entanto, a presença de microrganismos patogênicos e deterioradores no ambiente industrial pode contaminar os alimentos nas várias etapas da produção, desde a obtenção inicial da matéria-prima até o seu processamento final (GU et al, 2019) quando apresenta a capacidade de formar biofilmes, torna um risco maior para a saúde pública (KADAM et al., 2013; BONSOGLIA et al., 2014; PANDE et al., 2016; WANG et al., 2016; LEE et al., 2017). A capacidade de aderir e formar biofilmes em

condições ambientais como diferentes superfícies, temperaturas, presença de matriz orgânica e outros microrganismos, e apresentar tolerância a biocidas, os biofilmes formados com microrganismos patogênicos são alvos de inúmeros estudos que buscam entender a dinâmica de adesão e formação de biofilmes sob condições industriais (KADAM et al., 2013; LEE et al., 2017). Invariavelmente, a dinâmica de formação de biofilme é composta por cinco etapas: adsorção, adesão, consolidação, maturação e dispersão (FIGURA 1) (MACEDO e ABRAHAM, 2009).

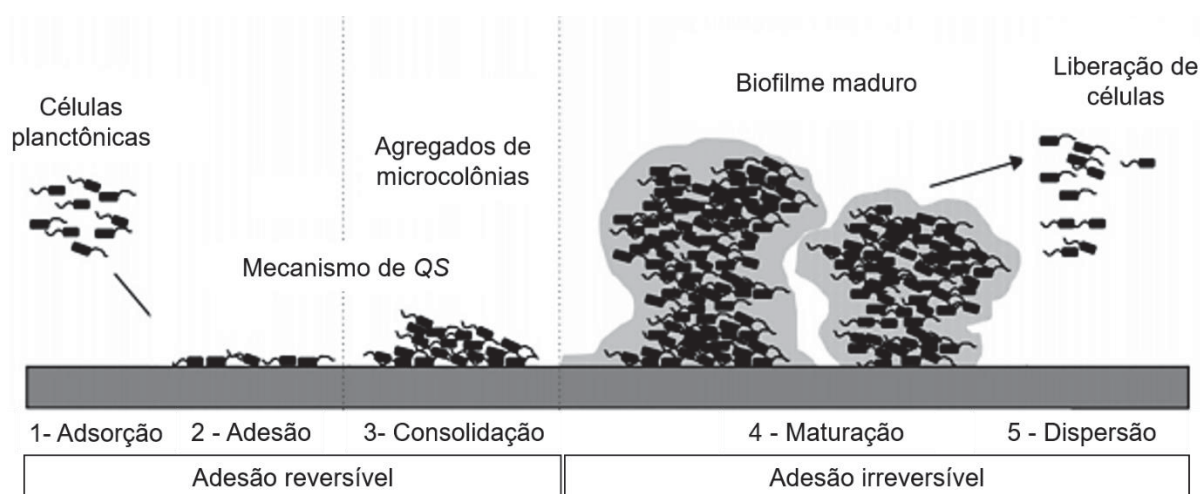


FIGURA 1: ESTÁGIO DO DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME BACTERIANO. 1) ADSORÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA E CÉLULAS BACTERIANAS; 2) ADESÃO BACTERIANA REVERSÍVEL COM FORMAÇÃO DE MICROCOLÔNIAS E INÍCIO DO MECANISMO DE *QUORUM SENSING* (QS); 3) AGREGADOS DE MICROCOLÔNIAS COM INÍCIO DA DEPOSIÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS; 4) BIOFILME MADURO COM ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL E RUPTURA DA ESTRUTURA COM (5) DISPERSÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS. ADAPTADO DE MACEDO E ABRAHAM (2009).

A adesão bacteriana em ambientes industriais é formada a partir da interação da célula bacteriana com a superfície, regulado por mecanismos físico-químicos, genotípicos e fenotípicos, variáveis de acordo a presença e diversidade de microrganismos planctônicos, virulência e disponibilidade de nutrientes e água (VAN HOUTT e MICHIELS, 2010; BONSOGLIA et al., 2014).

Além disso, a presença de flagelos e fímbrias também auxiliam na etapa inicial de formação de biofilme, bem como as propriedades físico-químicas do material das superfícies (RÖMLING et al., 1999; JONAS et al., 2007; LEMON et al., 2007; PIERCEY et al., 2016; BORGES et al., 2018). A hidrofobicidade celular e de diferentes polímeros é baseada na capacidade de atrair ou repelir um filme de água sobre a superfície, desse modo, superfícies hidrofóbicas como poliuretano, polipropileno

apresentam características que melhoram a adesão bacteriana quando comparadas ao aço inoxidável e o vidro, que são hidrofílicos (DONLAN & COSTERTON, 2002; SILVA et al., 2008; CHATURONGKASUMRIT et al., 2011; BONSOGLIA et al., 2014).

A partir da interação celular com a superfície, os microrganismos começam a sintetizar e excretar substâncias ligantes de exopolissacarídeos como adesinas, formando uma adesão mais forte, tornando-a irreversível (ROHDE et al., 2010; HANCOCK et al., 2011). Quando as células bacterianas iniciam o mecanismo de *quorum sensing* (QS) ocorre o recrutamento de novas células, formando agregados de microcolônias, promovendo a formação de biofilmes multiespécies (RIEU et al., 2007; KARAVOLOS et al., 2008; MERINO et al., 2019; GRANDRA et al., 2019).

Os mecanismos de QS estão presentes em todas as etapas de formação de biofilmes, sendo responsável pela comunicação celular através de sinais químicos promovidos por meio de moléculas autoindutoras (AI) que são secretadas para o ambiente, originando a percepção da densidade populacional e regulação da expressão gênica (RIEU et al., 2007; KARAVOLOS et al., 2008; BAI e RAI, 2011; JU et al., 2018). Além disso, são capazes de modular outras funções, como mecanismos de patogenicidade, aquisição de nutrientes, motilidade e produção de metabólitos (JU et al., 2018).

A etapa de maturação do biofilme é caracterizada pela síntese e excreção de polissacarídeos e outras biomoléculas como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos que compõe a matriz de exopolissacarídeos (EPS), promovendo a aproximação, a comunicação, a transferência horizontal de genes e o aumento das células que compõe o biofilme, conferindo-o a arquitetura característica (FLEMMING e WINGENDER, 2010). Há também a formação de canais em sua estrutura que auxiliam no sequestro de nutrientes e oxigênio dissolvidos no ambiente, garantindo a nutrição, desenvolvimento e manutenção do biofilme (MCLANDBOROUGH et al., 2006). Desse modo, a matriz de EPS confere proteção, adaptabilidade e resistência as condições adversas, como dessecação, ação de biocidas e antibióticos.

De uma maneira geral a arquitetura, conferida através do tamanho, estrutura e forma dos biofilmes varia de acordo com fatores como condições hidrodinâmicas, concentração de nutrientes, temperatura, tipo de microrganismo, motilidade bacteriana, comunicação celular, além da quantidade de EPS produzido (FLEMMING e WINGENDER, 2010; PILCHAVÁ et al., 2014). Estudos avaliando a arquitetura dos biofilmes de *L. monocytogenes* mostram estruturas com aspecto de favo de mel ou

formas ovais, com presença de poros formando canais que auxiliam na distribuição de nutrientes (RIEU et al. 2008; REIS-TEIXEIRA et al., 2017). A deposição de estrutura de aspecto viscoso com presença de células lado a lado são características da adesão bacteriana e início da consolidação do biofilme e, observam-se em biofilmes maduros estruturas com aspecto tridimensional com orientação em formas de galhos, promovendo a ramificação dos biofilmes sobre as superfícies (PILCHAVÁ et al., 2014). A disponibilidade de nutrientes interfere diretamente na morfologia dos biofilmes de *Salmonella* spp., como exemplo, a presença de caldo de carne oriundo do descongelamento confere forma de nuvem aos biofilmes maduros quando comparados ao caldo TSB, que apresentaram forma reticular, bem como, os biofilmes formados a partir do caldo TSB demonstram formação de múltiplas camadas de células sobrepostas com estrutura tridimensional (WANG et al., 2013a).

O estágio final, é caracterizado pela dispersão das células bactérias ou fragmentos da matriz de EPS. A criação de um ambiente anaeróbio no interior dos biofilmes muitas vezes favorece a formação de ácidos e gases, que são capazes de enfraquecer sua estrutura resultando em seu desprendimento, o que também pode ser realizado pela ação mecânica de alimentos sobre a superfície, favorecendo a contaminação cruzada (OLIVEIRA et al., 2010).

2.4 FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES DE *L. monocytogenes* E *Salmonella* sp.

Nos últimos anos, tem-se desenvolvidas pesquisas com *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. em distintas condições para formação de biofilmes monoespécies (KADAM et al., 2013; BONSOGLIA et al., 2014; PANDE et al., 2016; WANG et al., 2016; LEE et al., 2017). No entanto, torna-se difícil reproduzir nos ensaios *in vitro* as condições encontradas nos ambientes industriais uma vez que, na natureza, os biofilmes são formados por múltiplas espécies, envolvendo bactérias, fungos e algas que desempenham interações relacionadas ao desenvolvimento, estrutura e função das comunidades (BURMØLLE et al., 2014; GIAOURIS et al., 2015). Assim, a realização de estudo com formação de biofilmes multiespécies pode auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos de sinergismo, antagonismo e competição, promovendo a persistência ou eliminação bacteriana (RIEU et al., 2008; KOSTAKI et al., 2012; FERNANDES et al., 2015; HEIR et al., 2018).

Na última década, estudos têm sido realizados para avaliar a influência de microrganismos encontrados nos ambientes indústrias para a formação, estrutura e fisiologia de biofilmes multiespécies. Wang et al. (2013b), identificaram que biofilmes mistos de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga e *S. Typhimurium* aumentaram a resistência a sanitizantes, com acréscimo na produção de EPS. Também foi identificado que culturas mistas de *Pseudomonas aeruginosa* e *S. Enteritidis* aumentaram a tolerância aos tratamentos com cloro, contudo, a presença de *P. aeruginosa* reduziu as contagens de *S. Enteritidis*, quando comparado aos biofilmes puros (PANG e YUK, 2018).

Biofilmes mistos de *S. Typhimurium* e *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável mostraram redução de aproximadamente 10 vezes no número de células sésseis, porém essa diferença não foi observada nos tratamentos com cloreto de benzalcônio, cloro e ácido peracético, identificando que a presença de mecanismos genéticos relacionados a resistência as condições adversas afetou nos resultados (GKANA et al., 2017). Iñiguez-Moreno et al. (2018), mostraram que a cultura mista de *Salmonella* spp. e *S. aureus* favoreceu a adesão bacteriana de *Salmonella* spp. em polipropileno, e o biofilme misto apresentou densidades celulares mais elevadas de ambos os microrganismos em comparação a monoespécies, entretanto, quando submetidos a sanitização, a cultura mista desempenhou efeito negativo na resistência dos microrganismos.

Biofilmes mistos de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* melhoraram a adesão, resistência a dessecação e a sanitizantes de *L. monocytogenes*, pois maiores quantidades de EPS estavam presentes em biofilmes multiespécies (PANG e YUK, 2019). Já a associação de *P. putida* e *L. monocytogenes* aceleraram a formação de biofilme e conseqüentemente a resistência ao cloreto de benzalcônio (IBUSQUIZA et al., 2012). Papaioannou et al. (2018), mostraram redução nas contagens de células viáveis de *L. monocytogenes* em biofilmes mistos com *Pseudomonas* spp. e Enterobacteriaceae, no entanto, todos os biocidas testados não foram capazes de reduzir a contagem bacteriana de *L. monocytogenes*, mostrando que a ecologia microbiana interferiu diretamente na resistência bacteriana.

A disponibilidade de células planctônicas possui efeito direto com a capacidade de formação biofilmes mistos de *L. monocytogenes* e *E. coli*, e a associação de *L. monocytogenes*, *Listeria* sp. e bactérias Gram-negativas, afetou diretamente a contagem populacional de *L. monocytogenes*, contudo as associações

desses microrganismos desenvolveram biofilmes com densidade populacional mais elevadas quando comparados aos biofilmes monoespécies, proporcionando a persistência em instalações de processamento de alimentos (HEIR et al., 2018; GRANDI et al., 2018).

Acredita-se que a resistência às condições adversas encontradas por biofilmes multiespécies é facilitada pela variedade de espécies bacterianas que os habitam (RØDER et al., 2015; GIAOURIS et al., 2015). Estudar a ecologia microbiana associada a presença de microrganismos patogênicos pode auxiliar a entender a dinâmica de formação e manutenção de biofilmes multiespécies e a persistência de cepas patogênicas nos ambientes industriais (RØDER et al., 2015; FERNANDES et al., 2015; FAGERLUND et al., 2017), uma vez que eles são encontrados no ambiente industrial e são uma preocupação para os programas de higiene pré-operacional das indústrias, devido aos efeitos protetores, e devem ser levados em consideração em estudos de programas de risco e na escolha de protocolos de higienização das indústrias de alimentos para garantir a efetiva eliminação dos microrganismos patogênicos (GIAOURIS et al., 2015; RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2017).

2.5 ASPECTOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Listeria monocytogenes* E *Salmonella* sp.

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas e suas células apresentam resistência a diversas condições estressantes, contudo, existem mecanismos genotípicos que regulam a expressão de constituintes importantes para a adesão, colonização, formação e manutenção dos biofilmes. O gene *prfA*, é um ativador transcricional que regula positivamente a expressão da maioria dos genes de virulência de *L. monocytogenes*, dentre eles *inlA*, *inlB*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB* (SHEEHAN et al., 1995). Além disso, regula a expressão de genes envolvidos na formação de biofilmes e sobrevivência. Estudos têm demonstrado que deleções na sequência do gene *prfA* promoveram redução na capacidade de formação de biofilme, principalmente na etapa de maturação (LEMON et al. 2010; ZHOU et al. 2011). O gene *prfA*, apresenta a capacidade de regular outros genes que podem estar envolvidos na formação de biofilme, como na biossíntese da parede celular, no metabolismo e divisão celular e nas adaptações a condições atípicas (BRUNO JR, et al. 2010; LUO et al., 2013). Gandra et al. (2019), mostraram que diferentes graus de

adesão das culturas microbianas (não aderente e fortemente aderente) e distintas superfícies (poliestireno e aço inoxidável) não apresentaram interferência nos níveis de expressões de *prfA*, no entanto, quando utilizadas variáveis de temperatura e tempo de incubação, a maior expressão de *prfA* foi conferida a 37°C a partir de 24h quando comparados a 10°C nos demais tempos de avaliação. Contudo, Pieta et al. (2014) apresentaram em seu estudo níveis maiores de expressões para *prfA* a 7°C quando comparado a 37°C. Assim, a expressão de *prfA* devido a suas características de regulação gênica sobre a virulência e formação de biofilmes, torna-se constantemente alvo de estudos para reprimir suas expressões com o objetivo de controlar a formação de biofilmes em ambientes industriais (LI et al., 2018; VAZQUEZ-ARMENTA et al., 2020).

A adesão inicial de *L. monocytogenes* pode ser afetada pela presença de flagelos, que são sintetizados após a transcrição do gene *flaA*. Os flagelos, fornecem recursos importantes para a motilidade, adesão, invasão celular e formação de biofilme, bem como variações em sua regulação pode afetar a quimiotaxia e a sobrevivência das células bacterianas em condições adversas (MORIMOTO e MINAMINO, 2014). Em condições industriais, os flagelos aumentam a probabilidade de encontrar uma superfície de contato, principalmente quando as células estão em suspensão, contribuindo para a fixação inicial e subsequente formação do biofilme, sendo mínima a função como adesinas (O'NEIL e MARQUIS, 2006; LEMON et al., 2007; PIERCEY et al., 2016; ZHANG et al., 2018).

Salmonella sp. apresenta a capacidade de adesão em superfícies bióticas e abióticas, e estruturas bacterianas de superfície como flagelos, pili, curli e síntese de exopolissacarídeos desempenham aspectos importantes na formação de biofilme (BARNHART et al. 2006, TSAI et al., 2019). A síntese desses compostos é controlada pela expressão de alguns genes, dentre eles *agfA*, *lpfA* e *adrA*, transcritos através dos operons *agfBAC* e *csgAB* (HAMMAR et al., 1995; COLLINSON et al., 1996). Desse modo, a presença de flagelos permite a adesão em polipropileno e aço inoxidável contribuindo na etapa inicial do desenvolvimento do biofilme, sendo componente da matriz de exopolissacarídeos, juntamente com a celulose (AUSTIN et al., 1998; WHITE et al., 2003; BARNHART et al. 2006). Diferentes tipos de superfícies (poliestireno e aço inoxidável), baixas temperaturas, diferentes níveis de oxigênio, presença de constituintes orgânicos e conservantes de alimentos (nitrito de sódio, sulfito de sódio e ácido cítrico e acetato de sódio) reduziram os níveis de expressão

destes genes (WANG et al., 2016; LAMAS et al., 2018; BORGES et al., 2018), juntamente com os antimicrobianos químicos e naturais que demonstram efeito negativo nos genes *adrA* e *csg*, interferindo negativamente na formação e manutenção de biofilmes (ARTEAGA et al., 2019).

A presença de mecanismos QS é empregada por diversos grupos bacterianos, incluindo microrganismos patogênicos, os quais produzem moléculas de sinalização caracterizadas como autoindutores (AI) (BAI e RAI, 2011). Essas moléculas são produzidas e excretadas a baixos níveis durante o crescimento bacteriano, a medida que a população se expande aumentam a concentração de AI no meio ou na matriz extracelular e, como consequência induzem efeitos fenotípicos ao regular a expressão de genes alvos dependentes de QS (CZAJKOWSKI e JAFRA, 2009). Essas moléculas em biofilmes são responsáveis pela comunicação inter e intracelular, interação com o ambiente, densidade populacional e regulação da expressão gênica dos microrganismos (BAI e RAI, 2011).

Desse modo, as bactérias Gram-positivas e negativas apresentam diferentes sistemas de sinalização célula-célula que são agrupados em quatro categorias principais. As bactérias Gram-negativas utilizam dois sistemas, o autoindutor-1 (AI-1) (SCHAEFER et al., 1996) e autoindutor-3 (AI-3) (SPERANDIO et al., 2003), e as Gram-positivas apresentam o sistema polipeptídeo autoindutor (AIP) (LYON et al., 2000). E o sistema autoindutor-2 (AI-2) é encontrado em bactérias Gram-negativas e positivas (SCHAUDER et al., 2001).

O sistema AI-1, é baseado na ação de *LuxI-LuxR*, onde *LuxI* consiste em um fator de transcrição responsável pela síntese de N-AHL (N-acil-homoserina lactonas) precursor de AI-1, que difunde-se através da membrana celular sendo liberado para o ambiente. Com o acréscimo da população as concentrações de AI-1 no ambiente aumenta, e por sua vez a concentração local de AI-1 é alta o suficiente para difundir de volta para a célula, onde liga-se ao *LuxR*. Com isso, *LuxR* é responsável pelo controle da expressão gênica na presença do AI, resultando na inativação da produção de AI-1 e consequentemente reativação do sistema (SCHAEFER et al., 1996; BAI e RAI, 2011).

Contudo, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* codificam um receptor de sinal regulatório do *LuxR*, denominado *sidA*, por não produzem *LuxI* e seus homólogos. O gene *sidA* em *Salmonella enterica* regula fatores acessórios que podem contribuir para a sobrevivência ou colonização intestinal, bem como tolerância a condições de

estresse (AHMER, 2004; HALATSI et al., 2006; BORGES et al., 2018). O gene *sidA* apresenta função em biofilmes, com níveis de expressões variáveis de acordo o tempo de desenvolvimento em decorrência do número da população bacteriana, pois contribui para a agregação celular inicial (WANG et al., 2016). Assim, constituintes sintéticos e naturais vem sendo estudados para interferir nos mecanismos de regulação gênica relacionados a formação de biofilmes por *Salmonella* sp., principalmente em genes responsáveis pelo QS, afetando a adesão, formação de biofilme e resistência a antimicrobianos (LI et al., 2014; YANG et al., 2019; SIVASANKAR et al., 2020).

O sistema AI-2 determina o QS de bactérias Gram-negativas e positivas, sintetizado a partir do subproduto do metabolismo de S- adenosilmetionina (SAM), descrito primeiramente em *Vibrio harveyi*, logo em *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. O gene *LuxS* sintetiza AI-2 a partir de SAM em três etapas enzimáticas. O uso de SAM produz um intermediário tóxico S-adenosil-homocisteína (SAH), que é hidrolisado em S-ribosil-homocisteína (SRH) e adenina pela enzima nucleasse *pfs*. Desse modo, *luxS* catalisa a SRH em 4,5-di-hidroxi-2,3-pentanodiona (DPD) e homocisteína. O DPD é clivado para formar pro-AI-2 e subsequentemente quando adicionado de boro forma o AI-2 (SCHAUDER et al., 2001; XAVIER e BASSLER, 2003; EERSMAECKER et al., 2005; SELA et al., 2006). O sistema AI-2 por ser sintetizado por bactérias Gram-negativas e positivas sugere um sistema de comunicação entre diferentes espécies de microrganismos que vivem em populações mistas, como os biofilmes (XAVIER e BASSLER, 2003). Assim, a formação de biofilmes mistos de *S. aureus* e *S. Enteritidis* foi inibida com a presença de aditivos alimentares, por redução na adesão ao aço inoxidável e síntese de AI-2, o que também contribuiu para o aumento da sensibilidade a sanitizantes, afirmando que AI-2 é um dos precursores para formação de biofilmes nestas espécies bacterianas (ZHANG et al., 2014).

O sistema AI-3 foi descrito primeiramente em *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) cuja síntese dependia de *luxS* associado a ativação da expressão de genes relacionadas a ligação celular (SPERANDIO et al., 2003). Posteriormente, foi descoberto que outras *E. coli* não patogênicas, além de *Enterobacter cloacae*, *Shigella*, *Salmonella* e *Klebsiella*, também produzem AI-3 (WALTERS et al, 2006). E assim, o sinal de AI-3 é realizado pelo sensor quinase (QseC) e pelo regulador de

resposta (*QseB*), regulando a biossíntese de flagelos e motilidade celular, agregação e comunicação celular (CLARKE et al., 2006; WALTERS et al, 2006).

No entanto, deleções gênicas do *luxS* em *L. monocytogenes* não interferiram na adesão e formação do biofilme, sendo que a formação de biofilme pode estar regulada através de outros genes (BELVAL et al. 2006; SELA et al, 2006; BONSAGLIA et al, 2014; GRANDI et al., 2018). Diante disso, o *locus agr*, responsável por codificar quatro proteínas através da transcrição do operon *agrBDCA*, é considerado um sistema regulador acessório para *L. monocytogenes* (RIEU et al., 2007; RIEDEL et al., 2009; CHANG et al, 2012). Descrito primeiramente em *S. aureus*, o sistema *agr* apresenta mecanismos que regulam a expressão de genes relacionados a virulência e mecanismos de QS das bactérias Gram-positivas (LYON et al., 2000). A presença de *agrA* está relacionado a invasão e adesão celular e autoindução do sistema de QS, bem como afeta as etapas iniciais da formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* (RIEU et al., 2007; RIEDEL et al., 2009), e na regulação de outros genes de virulência, transporte de oxigênio e aminoácidos, biossíntese de purina e pirimidinas juntamente com *agrC* (GARMYN et al., 2012).

O gene *agrB* participa da síntese de proteínas de membrana importantes para expressão do *agrD* (GARMYN et al., 2012; ZETZMANN et al., 2016). A formação de biofilme foi reduzida com privação de nutrientes e alta osmolaridade, contudo observou-se níveis de expressões de *agrD*, sugere que *agrD* está envolvido na formação de biofilme em condições semelhante as encontradas na indústria de alimentos (ZETZMANN et al, 2019). Assim, o sistema *agr* é necessário para a regulação adequada da biossíntese, estrutura e função do envelope celular, adesão a diferentes superfícies, e interação de bactérias dentro do biofilme (ZETZMANN et al, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a avaliação fenotípica e genotípica da dinâmica de formação de biofilmes puros e mistos de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium em superfície de polipropileno a 12 °C e 37 °C.

3.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a presença de genes relacionados a formação de biofilmes em isolados de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*, bem como de genes envolvidos na resistência a biocidas.

- Avaliar a viabilidade de biofilmes puros e mistos maduros mantidos por 3000 h a 10 °C.

- Avaliar a expressão dos genes *prfA*, *flaA*, *luxS* e *agrABCD* em biofilmes maduros de *L. monocytogenes*.

- Avaliar a arquitetura da dinâmica de formação de biofilmes puros e mistos de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*.

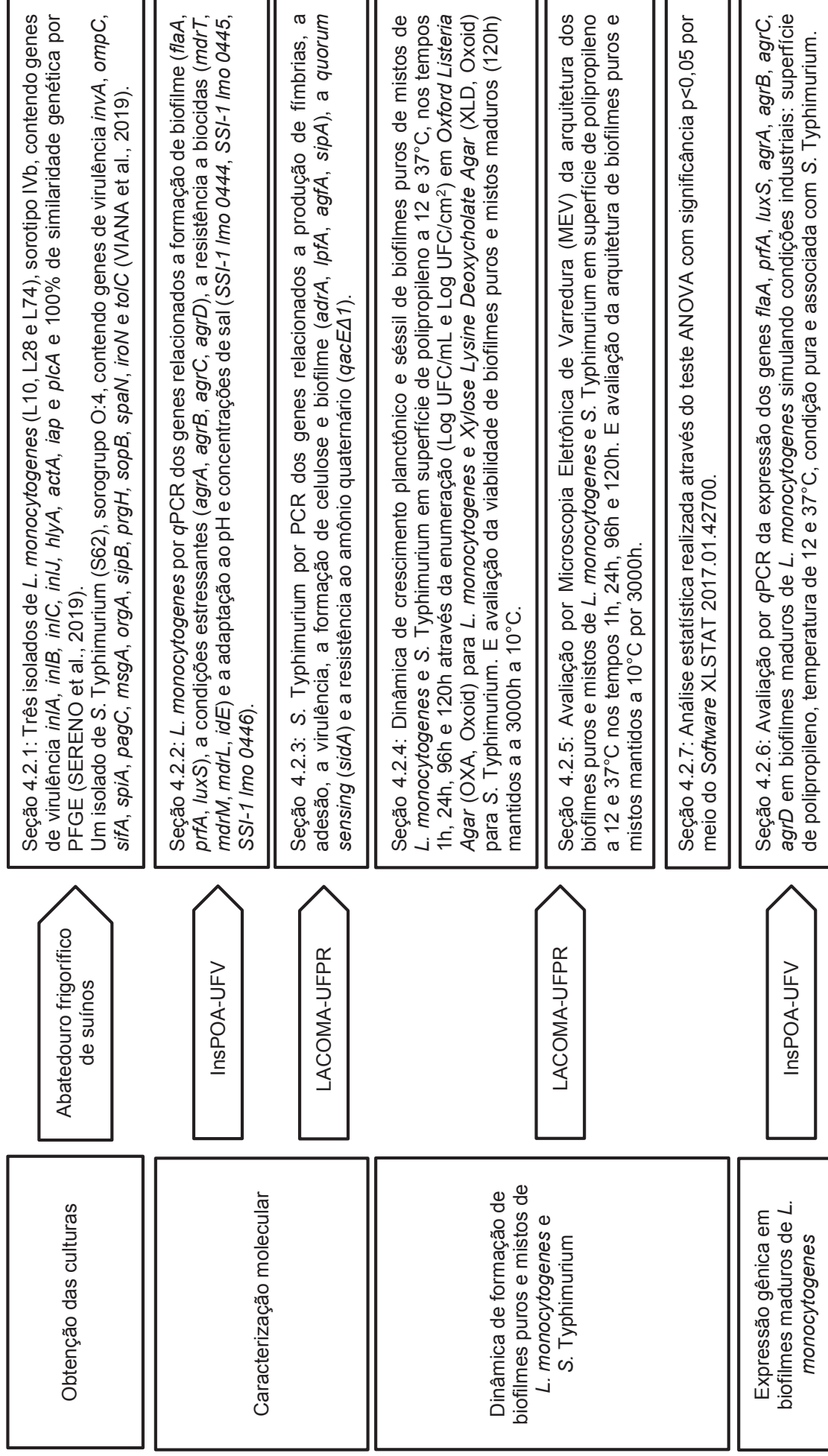


FIGURA 2: DIAGRAMA CONCEITUAL DA SEÇÃO DE MATERIAL E MÉTODOS DA DISSERTAÇÃO.

4 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES PUROS E MISTOS DE *Listeria monocytogenes* E *Salmonella* TYPHIMURIUM EM SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO

Biofilmes multiespécies são ecossistemas microbianos complexos que podem ser fonte de contaminação entre ambientes industriais e alimentos. O estudo, teve como objetivos realizar a caracterização molecular e avaliar expressão de genes relacionados à formação de biofilme, bem como, a dinâmica de formação e arquitetura de biofilmes puros e mistos de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium. Os três isolados de *L. monocytogenes* foram submetidos a caracterização de genes relacionados a formação de biofilme (*flaA*, *prfA*, *luxS*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*), a resistência a biocidas (*mdrT*, *mdrM*, *mdrL*, *idE*), a adaptação ao pH e a concentrações de sal (SSI-1 Imo 0444, SSI-1 Imo 0445, SSI-1 Imo 0446). Um isolado de *S. Typhimurium* foi submetido a avaliação de genes envolvidos na produção de fímbrias, adesão, virulência, formação de celulose e biofilme (*adrA*, *lpfA*, *agfA*, *sipA*), a *quorum sensing* (*sidA*) e a resistência ao amônio quaternário (*qacEΔ1*). A dinâmica de formação de biofilmes puros e mistos foi avaliada nos tempos de 1 h, 24 h, 96 h e 120 h em superfície de polipropileno a 12 °C e 37 °C. Os biofilmes maduros de *L. monocytogenes* na condição pura e associada com *S. Typhimurium* em superfície de polipropileno a 12 °C e 37 °C foram submetidos a expressão dos genes *flaA*, *prfA*, *luxS* e *agrABCD*. Os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram os genes *flaA*, *prfA*, *luxS*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*, *mdrT*, *mdrM*, *mdrL* e *idE*, e *S. Typhimurium* carrega os genes *adrA*, *lpfA*, *agfA*, *sipA*, *sidA*. O crescimento planctônico e sésil de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* foi relacionado a temperatura de incubação, obtendo-se contagens mais elevadas em 24 h a 37 °C, e em 96 h e 120 h a 12 °C. A adesão inicial de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* foi afetada negativamente pela condição mista ($p < 0,001$). Biofilmes puros de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* apresentaram contagens mais elevadas em 96 h e 120 h quando comparados as populações individuais em biofilmes mistos. Contudo, não foi observado diferença estatística na contagem entre biofilmes puros de *L. monocytogenes*, puros de *Salmonella* e a população total em biofilmes mistos (*Listeria+Salmonella*) a 12 °C. Em MEV, pode-se observar estrutura de aspecto viscoso promovendo a adesão (1 h) bacteriana em biofilmes mistos, e a partir de 24 h a presença de matriz exopolissacarídeos (EPS). Biofilmes puros e mistos foram capazes de manter células viáveis por 3000 h a 10 °C com contagens superiores a 120 h ($p < 0,05$). Biofilmes maduros de *L. monocytogenes* não sofreram interferência da temperatura, superfície e condição mista com *S. Typhimurium* sobre a expressão dos genes *prfA*, *luxS* e *agrBCD*, contudo houve interferência na expressão de *flaA* e *agrA*. Desse modo, a caracterização da dinâmica de formação de biofilmes mistos, juntamente com presença e expressão de genes relacionados a formação de biofilme, demonstrou a associação desses patógenos para a formação e manutenção de biofilmes mistos, e além disso, torna-se resultados importantes para a indústrias de alimentos e saúde pública.

Palavras-chaves: expressão gênica; indústria de alimentos, microscopia eletrônica de varredura (MEV), persistência

4.1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes e *Salmonella* sp. são microrganismos que podem ser veiculados por alimentos e causar doenças ao consumidor sendo *Salmonella* sp. um dos principais patógenos responsáveis pela ocorrência de surtos e *L. monocytogenes* relacionada a alta mortalidade (BRASIL, 2018; CDC, 2019; ESFA, 2019). Estes microrganismos apresentam diversos mecanismos de tolerância à condições adversas, como privação de nutrientes, baixas temperaturas, oscilações de pH, elevadas concentrações de sal, com resistência a antimicrobianos e sanitizantes e capacidade em formar biofilmes (KADAM et al., 2013; LEE et al., 2017; LAMAS et al., 2018; BORGES et al., 2018; VIANA et al., 2019, MORAIS et al., 2019).

Muitos estudos relatam a ocorrência e persistência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. em ambientes e instalações de processamento de alimentos (FERRONATTO et al., 2012; NOWAK et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; CARVALHO et al., 2019; VOSS-RECH et al., 2019; SERENO et al., 2019; VIANA et al., 2019), e a presença destes microrganismos pode estar relacionada a capacidade de aderir, colonizar e formar biofilmes. Os biofilmes são ecossistemas microbianos complexos formados normalmente por mais de uma espécie microbiana imersas em uma matriz de polímeros extracelulares, composta principalmente por proteínas, polissacarídeos e DNA, sendo que o processo de formação depende de uma interação entre as células microbianas, a superfície de fixação e as condições ambientais (COSTERTON et al., 1999; FERREIRA et al., 2014). Tais estruturas conferem proteção, adaptabilidade e resistência dos microrganismos envolvidos nesta matriz, tornando-se fontes de contaminação entre ambientes e produtos (OLIVEIRA et al., 2010; KADAM et al., 2013; LEE et al., 2017).

No entanto, a maioria dos estudos *in vitro* relata a formação de biofilmes monoespécies, que não mimetizam as condições naturais (KADAM et al., 2013; BONSOGLIA et al., 2014; PANDE et al., 2016; WANG et al., 2016; LEE et al., 2017), uma vez que estudos multiespécies conseguem avaliar a presença de mecanismos de sinergismo, competição, antagonismo no desenvolvimento de uma espécie em função de outra (RIEU et al., 2008; KOSTAKI et al., 2012; FERNANDES et al., 2015;

HEIR et al., 2018; GRANDI et al., 2018). Por estes estudos recentes sabe-se, por exemplo, que em biofilmes mistos há o favorecimento da adesão dos microrganismos à matriz e manutenção do biofilme, bem como o aumento da resistência a ação de biocidas comparado com biofilmes monoespécie (RØDER et al., 2015; FERNANDES et al., 2015; FAGERLUND et al., 2017).

Além disso, mecanismos genéticos que regulam fatores de virulência, formação de biofilmes e tolerância a condições de estresse podem estar ligados com a sobrevivência desses microrganismos nos ambientes industriais. Estudos mostram que níveis de expressão de genes regulatórios estão relacionados com a capacidade de adesão dos isolados, às temperaturas de incubação, aos tipos de superfícies e a presença de outros microrganismos compondo os biofilmes, além disso, genes de detecção de *quorum sensing* modulam a comunicação celular, formação e manutenção de biofilmes, levando a melhor ajuste nas características de estresse durante o crescimento bacteriano (BAI e RAI, 2011; IBUSQUIZA et al., 2015; PIERCEY et al., 2016; JU et al., 2018; LAMAS et al., 2018; GANDRA et al., 2019). Com isso, a resistência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. a sanitizantes de uso industrial pode estar associada a presença de genes que conferem essa proteção, bem como a resistência cruzada a antibióticos (MØRETRØ et al., 2017; HAUBERT et al., 2019).

Não há relatos sobre a interação de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* na dinâmica de formação de biofilmes mistos *in vitro* simulando condições das indústrias. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar os isolados de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* quanto a presença de genes relacionados a formação de biofilmes e realizar a avaliação fenotípica e genotípica da dinâmica de formação de biofilmes puros e mistos desses microrganismos em superfície de polipropileno a 12 e 37°C.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção dos isolados

Os isolados de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* utilizadas no estudo foram provenientes da superfície de equipamentos e utensílios utilizados na área de processamento de cortes cárneos de abatedouro frigorífico de suínos habilitado à

exportação localizado no Brasil, isoladas no período de 2016 a 2017. Foram utilizados três isolados de *L. monocytogenes* (LAC/LM/P.SUI1/10; LAC/LM/P.SUI1/28; LAC/LM/P.SUI1/74), sorotipo IVb, contendo os genes de virulência *inIA*, *inIB*, *inIC*, *inIJ*, *hlyA*, *actA*, *iap* e *plcA* e que apresentaram 100% de similaridade genética pela técnica de *Pulsed Field Gel Eletroforese* (PFGE) e um isolado de *S. Typhimurium* (LAC/SAL/P.SUI1/62), sorogrupo O:4, que apresentou os genes de virulência *invA*, *ompC*, *sifA*, *spiA*, *pagC*, *msgA*, *orgA*, *sipB*, *prgH*, *sopB*, *spaN*, *iroN* e *tolC* (SERENO et al., 2019; VIANA et al., 2019). As culturas de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* estavam armazenadas congeladas em *Tryptic Soy Broth* suplementado com 0,6% *Yeast Extract* (TSB-YE, Oxoid) e *Brain Heart Infusion Broth* (BHI, Oxoid) ambas contendo 20% (v/v) de glicerol respectivamente, e um alíquota (10µl) individualmente de cada isolado foi inoculado em três tubos contendo 5mL de TSB-YE (*L. monocytogenes*) e BHI (*S. Typhimurium*) e cultivado aerobicamente a 37°C/24h.

4.2.2 Caracterização molecular dos isolados de *L. monocytogenes*

Os isolados de *L. monocytogenes* foram cultivados em caldo *Tryptic Soy Broth* suplementado com 0,6% *Yeast Extract* (TSB-YE) a 37 °C por 24 h, e uma alíquota de 1.000 µl foi submetida à extração de DNA total utilizando lisozima (10 mg/mL, Sigma) e *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega®). O DNA obtido foi submetido à *real-time* PCR para avaliação da presença de genes relacionados a formação de biofilme (*flaA*, *prfA*, *luxS*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*), resistência a biocidas (*mdrT*, *mdrM*, *mdrL*, *idE*) e adaptação ao pH e concentrações de sal (*SSI-1 Imo 0444*, *SSI-1 Imo 0445*, *SSI-1 Imo 0446*). As reações compreenderam um volume final de 20 µl envolvendo 10 µl de *GoTaq® 2X qPCR Master Mix* (Promega®), 2,0 µl do DNA extraído, 0,4 µl dos primers *forward* e *reverse* (1 pmol) e 7,2 µl de *Nuclease-Free Water* (Promega®) (TABELA 1). A reação foi realizada em equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen®) sob condições de 95°C/2min; 40 ciclos de 95°C/15s, 60°C/60s. Como controle positivo foi utilizada uma cultura de *L. monocytogenes* ATCC 7644, e *Nuclease-Free Water* (Promega®) como controle negativo. Os resultados foram analisados em *Rotor-Gene Q Series Software* (Qiagen®).

4.2.3 Caracterização molecular de *S. Typhimurium*

O isolado de *S. Typhimurium* foi cultivado em *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) a 37 °C por 24 h e uma alíquota de 500µl foi submetida a extração do DNA como descrito por Dias et al. (2016). O DNA obtido foi submetido à PCR convencional para avaliação de genes relacionados a produção de fímbrias, adesão, virulência, formação de celulose e biofilme (*adrA*, *lpfA*, *agfA*, *sipA*), *quorum sensing* (*sidA*) e resistência ao amônio quaternário (*qacEΔ1*). As reações compreenderam um volume final de 25µl envolvendo 12,5 µl de *GoTaq Green Master Mix 2X* (Promega®) (400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl₂, pH 8,5), 4,0 µl do DNA extraído, 2 µl dos dos primers *forward* e *reverse* (1 pmol) e 4,5 µl de *Nuclease-Free Water* (Promega®) (TABELA 1). Para controle positivo, foi utilizada uma cultura de *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *Nuclease-Free Water* (Promega®) como controle negativo. Para *adrA* foi utilizado um ciclo inicial de 94°C/5min, amplificação de 35 ciclos de 94°C/30s, 60°C/30s 72°C/30s e extensão final de 72°C/4min; *lpfA*, 94°C/5min; 35 ciclos de 94°C/1s, 55°C/1s, 74°C/21s; 72°C/7min; *agfA*, 94°C/5min; 35 ciclos de 94°C/1s, 58°C/1s, 74°C/21s; 72°C/5min; *sidA*, 94°C/5min; 30 ciclos de 94°C/30s, 52°C/40s, 72°C/30s; 72°C/7min; *sipA*, 95°C/5min; 25 ciclos de 94°C/30s, 66,5°C/30s e 72°C/2min; 72°C/10min; *qacEΔ1*, 94°C/5min, 30 ciclos de 94°C/30s, 60°C/30s e 72°C/60s; 72°C/5min. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), corados com *GelRed* (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e visualizados em transiluminador UV.

TABELA 1: GENES ALVO, SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E POSITIVIDADE DOS ISOLADOS DE *L. monocytogenes* e *S. TYPHIMURIUM*.

Isolados	Gene	Sequência (5'→3')	Tamanho do produto (bp)	Função	Referência	Resultado
	<i>ripD1</i>	F: GTCCCTTGACGTAGGGATGC R: GGAACAACCGCTGGCGAAAT	113	Endógeno <i>Listeria</i> sp.	Miranda et al., 2018	+
	<i>prfA</i>	F: GGAAGCTTGGCTCTATTTGC R: ACAGCTGAGCTATGTGCGAT	145	Influência na formação de biofilme	Pieta et al., 2014	+
	<i>flaA</i>	F: GTAAGCATCCAAGCGTCTGA R: AAGAATCAGCATCAGCAACG	148	Produção de fímbrias e formação de biofilme	Pieta et al., 2014	+
	<i>luxS</i>	F: CATTGTGATGGCAGAACTTGC R: TGATTCGAGTGCATCATCA	127	<i>Quorum sensing</i> e formação de biofilme	Pieta et al., 2014	+
	<i>agrA</i>	F: CGGGTACTTGCCTGTATGAA R: TGAATAGTTGGCGGTGCTC	149	<i>Quorum sensing</i> e formação de biofilme	Pieta et al., 2014	+
<i>L. monocytogenes</i> :	<i>agrB</i>	F: AGGTACATTTGGATTTATACTGCTCAAC R: TCTTCACCGATTAAAGGCAAACT-3	81	<i>Quorum sensing</i> e formação de biofilme	Autret et al., 2003	+
- LAC/LM/P.SUI1/10	<i>agrC</i>	F: ATTGACAAGATTTTCGATGGATAGTATAGATT R: CACAAGTTAACGCCGCTTCA	88	<i>Quorum sensing</i> e formação de biofilme	Autret et al., 2003	+
- LAC/LM/P.SUI1/74	<i>agrD</i>	F: AAATCAGTTGGTAAATTCCTTTCTA R: AATGGACTTTTGGTTCGTATACA	113	<i>Quorum sensing</i> e formação de biofilme	Rieu et al., 2007	+
	<i>mdrT</i>	F: CCGTCCGGTTCCTCCGGTAT R: TTTACTGCCGAACCCGTGGTT	100	Multi droga resistente	Kaplanzevi et al., 2013	+
	<i>mdrL</i>	F: CCTCGGTACACTGCAACTCGGC R: CCGCCATCGCACCCACCAATCA	71	Multi droga resistente	Tamburro et al., 2015	+
	<i>ldE</i>	F: GGCACATCAACGGCAGCGGT R: TGTGTCCGACAAACGCTCCACC	70	Multi droga resistente	Tamburro et al., 2015	+
	<i>SSI-1 Imo 0444</i>	F: CATCTGCTCTTGTCCGGTTCA R: CCGACACCATTTCTCAAGGTT	85	Adaptação ao pH e concentrações de sal	Ryan et al., 2010	-
	<i>SSI-1 Imo 0445</i>	F: TAGACGAGCTTTGGAACCTC R: GGTATCGGGGCCATTTCTTC	99	Adaptação ao pH e concentrações de sal	Ryan et al., 2010	-

SSI-1 Imo 0446	F: TTGCGCAACGATTAAGATG	131	Adaptação ao pH e concentrações de sal	Ryan et al., 2010	-
	R: TCACTACACAACGCCCACTC				
<i>mdrM</i>	F: CAGCAAGTACATCAGTGAAGCGTAA	100	Resistência ao amônio quaternário	Kaplanzevi et al., 2013	+
	R: GGTAGCGCGACATTCATCAA				
<i>invA</i>	F: CGGGCTTGATGAGCTTTACC	521	Endógeno <i>Salmonella</i> sp.	Swamy et al. (1996)	+
	R: CTCGTAATTCGCCGCCATTG				
<i>adrA</i>	F: GGGCGGCGAAAGCCCTTGAT	92	Produção de celulose	Oliveira et al. 2014	+
	R: GCCCATCAGCGCGATCCACA				
<i>lpfA</i>	F: CTTTCGCTGCTGAATCTGGT	250	Produção de fimbrias, adesão e formação de biofilme	Bäumler et al., 1995	+
	R: CAGTGTTAACAGAAAACCAGT				
<i>agfA</i>	F: TCCACAATGGGCGGGCGGGCG	350	Produção de fimbrias, adesão e formação de biofilme	Collinson et al., 1992	+
	R: CCTGACGCACCATTTACGCTG				
<i>sdiA</i>	F: AATATCGCTTCGTACCAC	274	<i>Quorum sensing</i>	Halatsi et al., 2006	+
	R: GTAGGTAAACGAGGAGCA G				
<i>sipA</i>	F: CAGGGTCTGTAGTGTATTGCCGTGAGATG	550	Virulência e formação biofilme	Skyberg et al., 2006	+
	R: CGCGTAACAAAAGAACCCGTAGTGATGGATT				
<i>qacEΔ1</i>	F: ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	225	Resistência ao amônio quaternário	Paulsen et al. (1993)	-
	R: CAAGCTTTTGCCCATGAAGC				

(+) presença; (-) ausência

S. Typhimurium:
- LAC/SAL/P.SUI1/62

4.2.4 Dinâmica de formação de biofilmes puros e mistos de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em cupons de polipropileno

Os isolados de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* foram avaliados para a dinâmica de formação de biofilmes puros e mistos em cupons de polipropileno, o mesmo material das superfícies onde os isolados foram coletados, incubados a 12 °C e 37 °C. Antes dos ensaios de adesão bacteriana os cupons (1 cm x 1 cm x 0,1 cm) foram lavados com álcool 70% p/p (70 °INPM) enxaguados três vezes em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15min em frascos contendo 100mL de caldo TSB-YE.

Um volume de 10 µl dos isolados armazenados a -18 °C em TSB-YE contendo 20% (v/v) de glicerol foram semeados individualmente em três tubos com 5 mL de TSB-YE e incubados a 37 °C por 24 h. A partir deste subcultivo obtido, realizou-se a inoculação nos frascos de 100ml com TSB-YE contendo os cupons esterilizados (n=15) ajustando-se a 0,5 na escala de *McFarland* das culturas para o estudo dos biofilmes puros. Para o estudo dos biofilmes mistos, 50 mL de TSB-YE foram ajustados para *L. monocytogenes* e outros 50 mL para a cultura de *S. Typhimurium*, e os conteúdos foram misturados compondo o volume final de 100 mL. Antes da incubação uma alíquota de 1000 µL dos caldos ajustados de cada frasco foram utilizadas para a confirmação do inóculo inicial.

Os frascos foram incubados a 12 °C e 37 °C por até 120 h sob agitação orbital a 100 rpm. As avaliações do crescimento planctônico e sésil foram realizadas após 1 h, 24 h, 96 h e 120 h de incubação. Para isso foram retiradas em duplicata alíquotas de 100 µl do caldo TSB-YE nos diferentes tempos de incubação para a contagem dos microrganismos planctônicos e dois cupons para a contagem dos microrganismos aderidos. A remoção das células viáveis dos cupons foi baseada na metodologia de Poimenidou et al. (2016) com adaptações. Os cupons foram retirados da solução, lavados com 10 mL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) para remoção de células planctônicas. As células sésseis foram destacadas pela fricção de *swabs* estéreis 100 vezes sobre a área dos cupons, os *swabs* foram imersos em tubos contendo solução salina e homogeneizados em *vortex* durante 60 s.

Após diluições decimais apropriadas, tanto para quantificação das células sésseis quanto planctônicas, alíquotas de 1 mL foram semeadas em profundidade em *Oxford Listeria Agar* (OXA, Oxoid) para *L. monocytogenes* e de *Xylose Lysine*

Deoxycholate Agar (XLD, Oxoid) para *S. Typhimurium*, e incubadas a 37 °C por 48 h e 24 h, respectivamente. Como controle de esterilidade do processo, um frasco não inoculado contendo os cupons estéreis foi incubado e analisado nas mesmas condições. O estudo foi realizado em duplicata e em três repetições, e os resultados expressos em Log UFC/mL e Log UFC/cm² para células planctônicas e sésseis, respectivamente.

Biofilmes puros e mistos de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* com 120 h de formação independentemente da temperatura de incubação, foram transferidos individualmente em triplicata para frascos contendo 10 mL de TSB-YE e estocados a 10 °C por 3000 h. Nestas mesmas condições foi mantido um frasco contendo 10 mL de TSB-YE sem a presença dos biofilmes, para avaliação da esterilidade do processo. Após esse período, seguiu-se o protocolo de lavagem, remoção do biofilme, contagem e expressão dos resultados como descrito anteriormente.

4.2.5 Avaliação da expressão de genes relacionados a formação de biofilme em biofilme maduros de *L. monocytogenes*

Os isolados de *L. monocytogenes* foram submetidos à avaliação da expressão de genes envolvidos na formação de biofilmes (*flaA*, *prfA*, *luxS*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*) em diferentes tratamentos: biofilmes maduros puros e mistos (*L. monocytogenes* e *L. monocytogenes* associado a *S. Typhimurium*), tipo de superfície (polipropileno) e temperatura (12 °C e 37 °C). Desse modo, os isolados foram ajustados na escala 0,5 de McFarland, e submetidos a formação de biofilmes em cupons de polipropileno de 7x2cm em duplicata, totalizando 56 cm² por 120 h a 12 °C e 37 °C. O processo de lavagem, remoção, contagem das células sésseis e expressão dos resultados foram realizados como descrito no item anterior.

Para extração do RNA, utilizou-se protocolo de extração de RNA com TRIzol® com adaptações (VILLA-RODRÍGUEZ et al., 2018). Uma alíquota de 1 mL foi centrifugada a 5000g/10min e ressuspensa com 50 µl de Proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen) mantido a 37 °C/30min. Em seguida, foram adicionados 100 µl de Lisozima (10 mg/mL, Sigma) com homogeneização em vortex por 5min. A solução foi centrifugada a 5000g/10min e o *pellet* ressuspensa em 300 µl de TRIzol® e 60 µl de clorofórmio, com homogeneização e centrifugação de 13000g/15min. Após, adicionou-se uma alíquota de 200 µl de isopropanol, com centrifugação de

13000g/10min. O *pellet* foi ressuspensado com 700 µl de etanol absoluto por duas vezes. O *pellet* foi mantido em temperatura ambiente por 10 min seguido de ressuspensão em 30 µl de Nuclease-Free Water. O RNA extraído foi tratado com *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega®) e utilizou-se *GoScript™ Reverse Transcriptase* (Promega®) para síntese do cDNA como descrito pelo fabricante.

As reações compreenderam um volume final de 20 µl, envolvendo 10 µl de *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega®), 4,0 µl do cDNA, 0,4µl dos primers *forward* e *reverse* (1 pmol) e 5,2 µl de *Nuclease-Free Water* (Promega®) (TABELA 1). A reação foi realizada em equipamento *Rotor-Gene Q* (Qiagen®) sob condições de: 95°C/2min; 50 ciclos de 95°C/15s, 60°C/60s. Como controle positivo, utilizou-se uma cultura de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *Nuclease-Free Water*, como negativo. Para controle da extração, tratamento do RNA e síntese do cDNA utilizou-se os genes endógenos *rlpd1* (*L. monocytogenes*) e *invA* (*S. Typhimurium*). Os resultados foram analisados em *Rotor-Gene Q Series Software* (Qiagen®) quanto a presença ou ausência de expressão gênica nas condições testadas.

4.2.6 Avaliação da arquitetura dos biofilmes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A caracterização topográfica das superfícies contendo os biofilmes foram observadas em microscópio eletrônico de varredura modelo VEGA 3 (TESCAN®) da UFPR, Setor Palotina, obtendo-se imagens com 5, 10 e 15 Kx. As imagens foram geradas sobre cupons de polipropileno (0,5 cm x 0,5 cm) de isolados de *L. monocytogenes* (LAC/LM/P.SUI1/28) e *S. Typhimurium* (LAC/SAL/P.SUI1/62) em biofilmes puros e mistos nos tempos 1 h, 24 h, 96 h e 120 h a 12 °C e 37°C, e dos biofilmes de 3000 h a 10 °C. Os biofilmes formados sobre os cupons foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em Tampão Fosfato 0,2 M (pH 7,2) a 4 °C por 48 h. Após o período de fixação, foram lavados três vezes com Tampão Fosfato 0,1 M, seguido da série de desidratação em diferentes concentrações de álcool (10, 30, 50, 70, 80, 90 e 100%) a 25 °C por 20 min cada. A seguir, realizou-se o ponto crítico (12 ciclos de troca de CO₂ por 3 min), montagem dos *stumbs* e metalização com ouro (180 s).

4.2.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em duplicata em três repetições e os resultados expressos em média com desvio padrão. Para avaliar se houve diferença nas contagens entre os três isolados de *L. monocytogenes* (LAC/LM/P.SUI1/10; LAC/LM/P.SUI1/28; LAC/LM/P.SUI1/74) durante a formação de biofilmes puros e mistos, foi realizado teste ANOVA com significância $p < 0,05$ através do software XLSTAT 2017.01.42700. Não havendo diferença entre os isolados de *L. monocytogenes* optou-se por expressar os resultados da média dos três isolados de *L. monocytogenes*, e novas comparações foram realizadas para a avaliação da dinâmica de formação de biofilmes puros e mistos de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização molecular dos isolados de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*

Todos os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram genes relacionados a formação de biofilme (*prfA*, *flaA* e *luxS*), a adaptações às condições estressantes (*agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*), a resistência a multidrogas (*mdrT*, *mdrL* e *idE*) e ao amônio quaternário (*mdrM*), no entanto, não apresentaram genes relacionados à resposta a oscilações de pH e presença de sal (*SSI-1 Imo 0444*, *SSI-1 Imo 0445*, *SSI-1 Imo 0446*) (TABELA 1). Já o isolado de *S. Typhimurium*, apresentou os genes relacionados a formação de biofilme (*adrA*, *lpfA*, *agfA*), mecanismo de *quorum sensing* (*sidA*) e virulência (*sipA*), no entanto, não carregava o gene envolvido na resistência ao amônio quaternário (*qacED1*) (TABELA 1).

4.3.2 Efeito da condição de crescimento (cultivo puro ou misto) na dinâmica de formação de biofilmes de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em superfície de polipropileno

Na Tabela 2 estão dispostos os dados da dinâmica de formação de biofilmes de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em culturas puras e mistas nos tempos 1 h, 24 h, 96 h e 120 h a 12 °C e 37 °C em superfície de polipropileno, tendo ocorrido

diferença significativa ($p < 0,001$) nas diferentes combinações estudadas. A formação de biofilme de *L. monocytogenes* foi diretamente relacionada a temperatura de incubação, tendo sido mais elevada em 24 h a 37 °C e em 96 h a 12 °C.

TABELA 2: DINÂMICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES PUROS E MISTOS DE *L. monocytogenes* E *S. TYPHIMURIUM* SOBRE A POPULAÇÃO INDIVIDUAL DE CADA MICRORGANISMO EM SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO A 12 E 37°C EM DIFERENTES TEMPOS DE CONTATO.

Ensaio	Temperatura	Tempo de contato			
		1 h	24 h	96 h	120 h
<i>Listeria monocytogenes</i> (Log UFC/cm ²)					
<i>Listeria</i>	12 °C	3,67 ^e	3,87 ^{de}	4,96 ^a	4,64 ^b
<i>Listeria</i> associado <i>Salmonella</i>	12 °C	3,36 ^{fg}	3,85 ^{de}	4,24 ^c	3,87 ^{de}
<i>Listeria</i>	37 °C	3,67 ^e	4,85 ^{ab}	4,15 ^{cd}	4,09 ^{cd}
<i>Listeria</i> associado <i>Salmonella</i>	37 °C	3,28 ^g	4,58 ^b	3,61 ^{ef}	3,14 ^g
<i>Salmonella</i> Typhimurium (Log UFC/cm ²)					
<i>Salmonella</i>	12 °C	3,81 ^{fg}	3,95 ^f	5,01 ^{bcd}	4,88 ^d
<i>Salmonella</i> associado <i>Listeria</i>	12 °C	3,35 ^g	3,83 ^{fg}	4,93 ^{cd}	4,59 ^{de}
<i>Salmonella</i>	37 °C	4,84 ^d	5,79 ^a	5,50 ^{ab}	4,74 ^d
<i>Salmonella</i> associado <i>Listeria</i>	37 °C	4,08 ^{ef}	5,40 ^{abc}	4,67 ^d	4,02 ^f

Letras subscritas diferentes dentro de um mesmo patógeno demonstram diferença estatística ($p < 0,001$).

A adesão inicial de *L. monocytogenes* (1 h) foi menor na condição mista quando comparada à pura em ambas as temperaturas, no entanto em 24 h essa diferença não foi observada (TABELA 2). Pelas imagens da MEV também ficou evidente que a matriz não diferiu em 24 h, tanto no biofilme puro de *L. monocytogenes* quanto misto (FIGURA 1B, 1F, 1R e 1V). Nos biofilmes maduros de 96 h e 120 h à 12 °C e 37 °C, a condição pura de *L. monocytogenes* apresentou maiores contagens quando comparados a *L. monocytogenes* associada a *S. Typhimurium* (TABELA 2). A disponibilidade de células planctônicas de *L. monocytogenes* afetou diretamente a formação de biofilme, onde em 1 h, 24 h e 96 h o crescimento planctônico e sésil foram paralelos, com redução no número de células nos biofilmes de 120 h, porém sem afetar as populações de células planctônicas entre 96 h e 120 h, que permaneceram constantes (FIGURA 2A, 2B, 2C, 2D).

Em MEV, foi observada deposição de matriz de exopolissacarídeos (EPS) nos biofilmes a partir 24 h de incubação em ambas as temperaturas (FIGURA 1B, 1F). E com o passar do tempo de avaliação (96 h e 120 h), foi notado maior dispersão de

células bacterianas e EPS nas superfícies dos cupons de polipropileno avaliados, possivelmente relacionado ao desprendimento de biofilmes e colonização de novas áreas (FIGURA 1C, 1D, 1G e 1H). No entanto, a 12 °C por mais que não tenha havido diferença nas contagens dos biofilmes de 1 h e 24 h em biofilmes puros, pode-se observar maior deposição de EPS nos biofilme de 24 h de incubação (FIGURA 1B), e essa arquitetura manteve-se nas avaliações de 96 h e 120 h (FIGURA 1C, 1D).

Em relação à *S. Typhimurium*, a adesão inicial (1 h) foi afetada pela temperatura de incubação e pela presença de *L. monocytogenes* (TABELA 2), onde *S. Typhimurium* pura a 37 °C apresentou a melhor condição para adesão inicial e a 12 °C, a pior, especialmente quando em associação com *L. monocytogenes*, sendo possível essa observação por meio das imagens geradas pela MEV (FIGURA 1I, 1M). Em 24 h *S. Typhimurium* pura e *S. Typhimurium* associada a *L. monocytogenes* apresentaram maiores contagens a 37 °C e a presença de *L. monocytogenes* interferiu na redução das contagens dos biofilmes maduros de 96 h e 120 h (TABELA 2). Na avaliação de células planctônicas a 37 °C as contagens de *S. Typhimurium* pura sofreram redução após 96 h (TABELA 3), esse comportamento não foi identificado quando associada à *L. monocytogenes* (FIGURA 2H). A 12 °C não houve influência sobre a populações de *S. Typhimurium* pura ou em associação, quando avaliado o mesmo tempo de incubação, obtendo-se as maiores contagens em 96 h sendo que estas mantiveram-se constantes em 120 h, fato também observado para as células planctônicas (TABELA 2 e 3).

Em MEV, foram observadas estruturas robustas com deposição de EPS a partir de 24 h de incubação em ambas as temperaturas (FIGURA 1J, 1N), contudo nos biofilmes de 24 h e 96 h à 37 °C, visualizaram-se estruturas recobrando a superfície de polipropileno, com grande número de células bacterianas e EPS (FIGURA 1N, 1O), o que também foi observado nos biofilmes de 96 h e 120 h à 12 °C (FIGURA 1K e 1L).

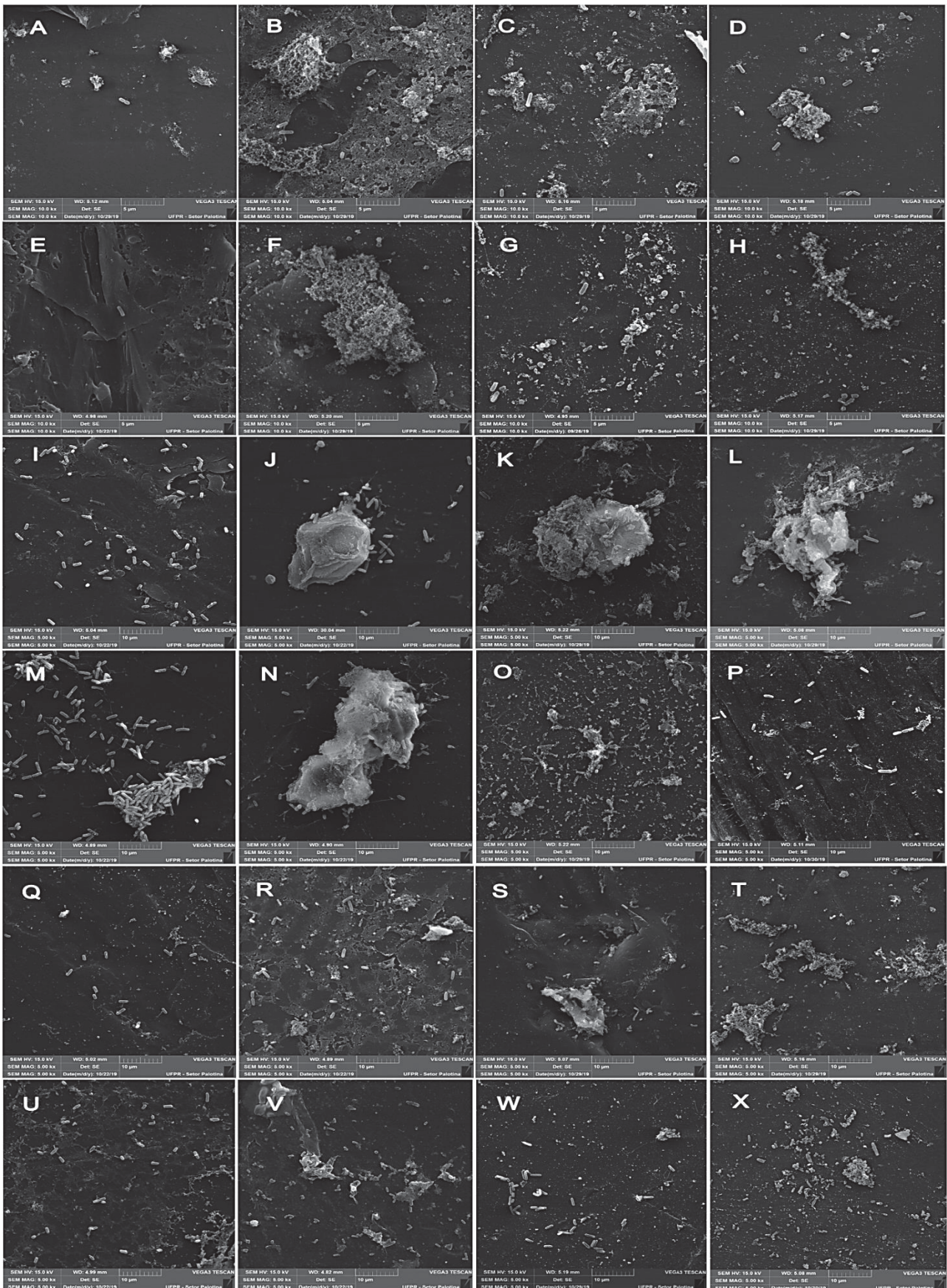


FIGURA 1: BIOFILMES DE *L. monocytogenes* EM SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO EM 1h/12°C (A), 24h/12°C (B), 96h/12°C (C) E 120h/12°C (D); E EM 1h/37°C (E), 24h/37°C (F), 96h/37°C (G) E 120h/37°C (H); BIOFILMES DE *S. TYPHIMURIUM* EM 1h/12°C (I), 24h/12°C (J), 96h/12°C (K) E 120h/12°C (L); E EM 1h/37°C (M), 24h/37°C (N), 96h/37°C (O) E 120h/37°C (P).BIOFILMES DE *L. monocytogenes* + *S. TYPHIMURIUM* EM 1h/12°C (Q), 24h/12°C (R), 96h/12°C (S) E 120h/12°C (T); E EM 1h/37°C (U), 24h/37°C (V), 96h/37°C (W) E 120h/37°C (X).

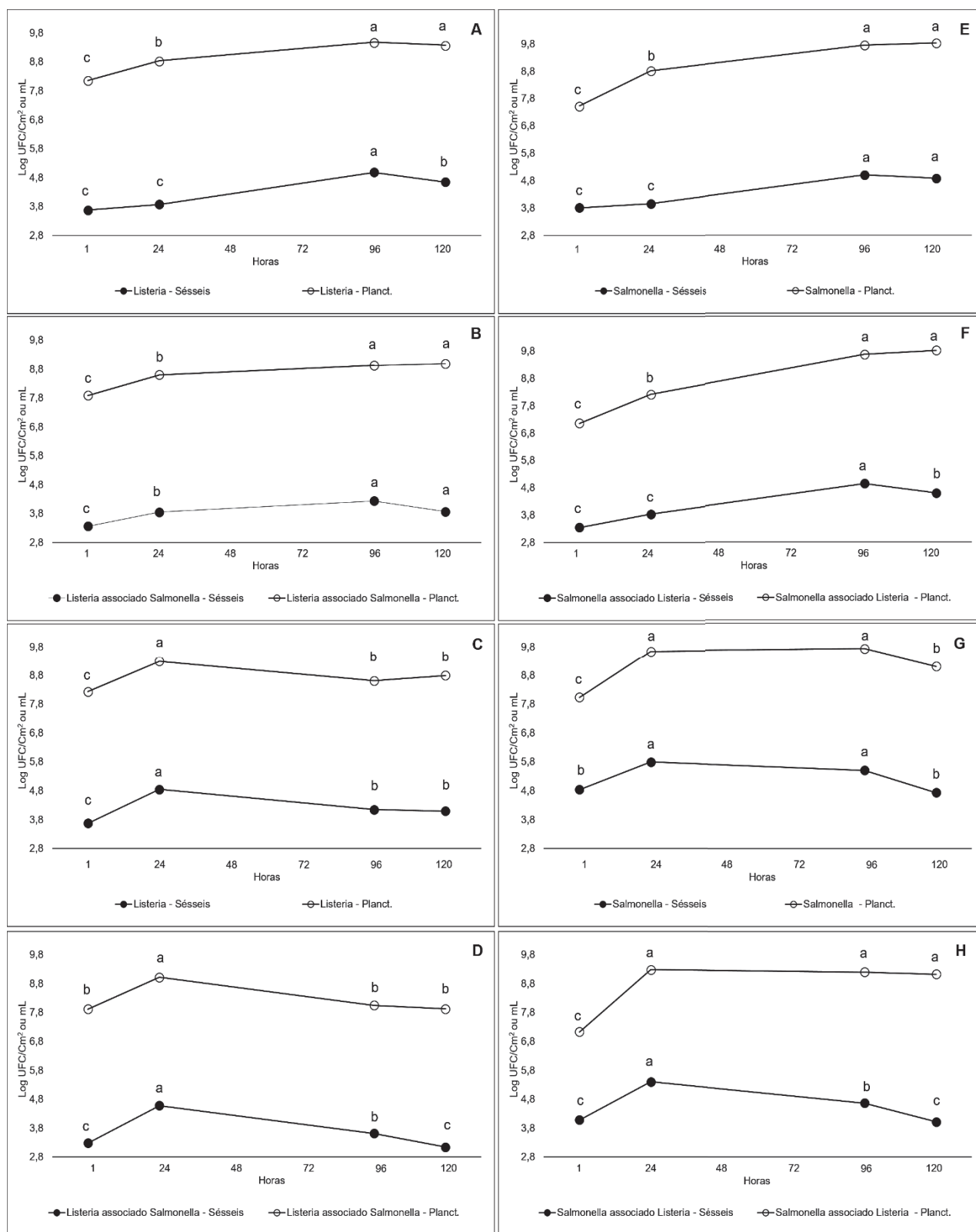


FIGURA 2: DINÂMICA DE CRESCIMENTO PLANCTÔNICO (Log UFC/mL) E SÉSSIL (Log UFC/cm²) DE *L. monocytogenes* pura a 12 °C (A); *L. monocytogenes* associada *S. TYPHIMURIUM* a 12 °C (B); *L. monocytogenes* pura a 37 °C (C); *L. monocytogenes* associada *S. TYPHIMURIUM* a 37 °C (D); *S. TYPHIMURIUM* PURA a 12 °C (E); *S. TYPHIMURIUM* associada a *L. monocytogenes* 12 °C (F); *S. TYPHIMURIUM* PURA a 37 °C (G); *S. TYPHIMURIUM* associada a *L. monocytogenes* 37 °C (H); Letras diferentes numa mesma linha diferem estatística (p < 0,05).

TABELA 3: DINÂMICA DE CRESCIMENTO PLANCTÔNICO (Log UFC/mL) DE *L. monocytogenes* E *S. TYPHIMURIUM* EM CONDIÇÃO PURA E ASSOCIADA A 12 °C E 37 °C EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO.

Ensaio	Temperatura	Tempo de contato			
		1 h	24 h	96 h	120 h
<i>Listeria monocytogenes</i>					
<i>Listeria</i>	12 °C	8,16 ^{ef}	8,83 ^{cd}	9,48 ^a	9,37 ^a
<i>Listeria</i> associado <i>Salmonella</i>	12 °C	7,88 ^f	8,59 ^d	8,92 ^c	8,98 ^{bc}
<i>Listeria</i>	37 °C	8,23 ^e	9,28 ^{ab}	8,60 ^d	8,79 ^{cd}
<i>Listeria</i> associado <i>Salmonella</i>	37 °C	7,91 ^{ef}	9,02 ^{bc}	8,05 ^{ef}	7,93 ^{ef}
<i>Salmonella Typhimurium</i>					
<i>Salmonella</i>	12 °C	7,53 ^{hi}	8,82 ^f	9,75 ^{ab}	9,83 ^a
<i>Salmonella</i> associado <i>Listeria</i>	12 °C	7,16 ⁱ	8,21 ^g	9,66 ^{abcd}	9,80 ^{ab}
<i>Salmonella</i>	37 °C	8,03 ^{gh}	9,64 ^{abcde}	9,71 ^{abc}	9,11 ^{ef}
<i>Salmonella</i> associado <i>Listeria</i>	37 °C	7,13 ⁱ	9,28 ^{bcdef}	9,20 ^{cdef}	9,13 ^{def}

Letras subscritas diferentes dentro de um mesmo patógeno demonstram diferença estatística ($p < 0,001$).

4.3.4 Dinâmica de formação de biofilmes de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* compondo a população total

Na Figura 3 estão computados os dados da comparação entre as populações dos biofilmes puros de *L. monocytogenes*, puros de *S. Typhimurium* com as contagens totais de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em biofilmes mistos (*Listeria*+*Salmonella*). Pode-se observar que houve diferença estatística na adesão inicial (1 h) entre as condições testadas, onde as contagens de *S. Typhimurium* pura à 37 °C foram mais elevadas ($p < 0,001$), superando as demais populações em ambas temperaturas, inclusive nas contagens totais dos biofilmes mistos (*Listeria*+*Salmonella*). Este comportamento também pode ser observado pela imagem gerada na MEV (FIGURA 2M).

Em 24 h de avaliação houve maior formação de biofilme de *S. Typhimurium* pura e *Listeria*+*Salmonella* seguida por *L. monocytogenes* pura a 37 °C (FIGURA 3). Em 96 h as contagens foram mais elevadas para *S. Typhimurium* pura, seguida de *Listeria*+*Salmonella* e *L. monocytogenes* pura, entretanto em 120 h houve redução nas contagens de *S. Typhimurium* pura e *Listeria*+*Salmonella*. Na temperatura de 12 °C as contagens de células sésseis não apresentaram diferença estatística quando

submetido a uma comparação no mesmo tempo de incubação, sendo as contagens mais elevadas em 96 h para *L. monocytogenes* pura e *Listeria+Salmonella* e, 96 h e 120 h para *S. Typhimurium* pura (FIGURA 3).

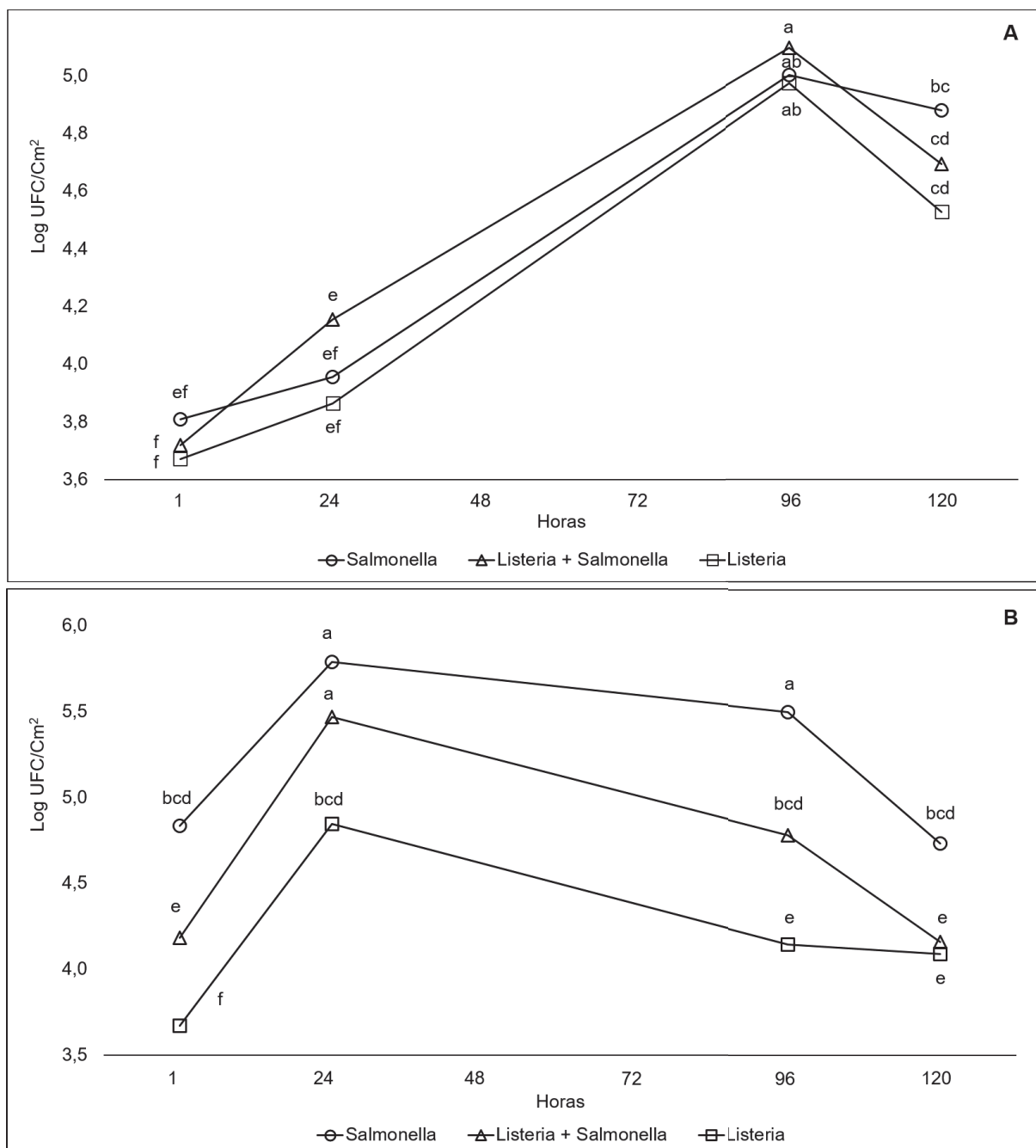


FIGURA 3: DINÂMICA DE CRESCIMENTO SÉSSIL DE BIOFILMES PUROS DE *L. monocytogenes*, PUROS DE *S. TYPHIMURIUM* COM AS CONTAGENS TOTAIS DE *L. monocytogenes* E *S. TYPHIMURIUM* EM BIOFILMES MISTOS (*Listeria+Salmonella*) A 12 °C (A) E 37 °C (B). Letras subscritas diferentes entre os tempos de incubação (1 h, 24 h, 96 h e 120 h) e as condição do patógeno (puro e misto) diferença estatística ($p < 0,001$).

Na avaliação dos biofilmes mistos pelas imagens geradas pela MEV (FIGURA 2Q a X) foi observado que, em 1 h a 37 °C as células aderidas do biofilme em

formação apresentaram maior recobrimento da superfície avaliada quando comparado a 12 °C, com presença de estrutura de aspecto viscoso o que promove (ou facilita) a adesão bacteriana, característica que também pode ser observada a 12 °C em 24 h. Há deposição de EPS nos biofilmes mistos a partir de 24 h de avaliação em ambas temperaturas, mantendo as mesmas características até 120 h, porém com menor número de células bacterianas.

4.3.5 Viabilidade de biofilmes persistentes por 3000 h a 10 °C

Biofilmes maduros de 120 h (TABELA 4) quando desafiados a temperatura de 10 °C por 3000 h apresentaram contagens médias superiores às obtidas a 120 h ($p < 0,05$), sendo de 6,21 Log UFC/cm² para *Listeria*+*Salmonella*, 5,84 Log/UFC/cm² para *S. Typhimurium* pura e 5,47 Log/UFC/cm² para *L. monocytogenes* pura. Os biofilmes mistos de 3000 h demonstraram maior incremento populacional (1,78 Log UFC/cm²), quando comparado aos biofilmes puros ($p < 0,05$). Além do aumento das contagens de células viáveis, os biofilmes com 3000 h apresentam maior deposição de matriz de EPS com aspecto denso recobrindo as células bacterianas quando comparados com 120 h em MEV (FIGURA 4).

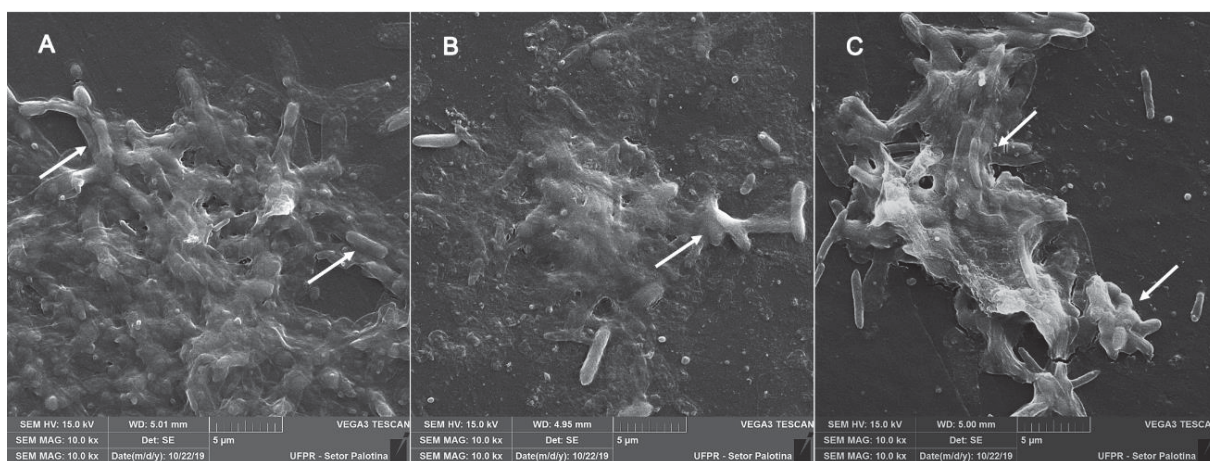


FIGURA 4: BIOFILMES DE *L. monocytogenes* (A), *S. TYPHIMURIUM* (B) E *L. monocytogenes* + *S. TYPHIMURIUM* (C) EM SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO MANTIDOS A 10 °C POR 3000 h.

4.3.5 Presença e ausência da expressão de genes de formação de biofilme de *L. monocytogenes* em biofilmes maduros de 120 h puros e em associação com *Salmonella*, a 12 °C e 37 °C em superfície de polipropileno

Os biofilmes maduros de 120 h de *L. monocytogenes* apresentaram expressão dos genes *luxS* e *prfA* em todas as condições impostas, contudo não houve expressão do gene *flaA*. Em relação ao loco *agr* foram expressos os genes *agrB*, *agrC* e *AgrD*, sem expressão do *agrA* nos biofilmes maduros nas diferentes condições estudadas.

4.4 DISCUSSÃO

Os ambientes industriais de processamento de alimentos apresentam uma variedade de microrganismos que são capazes de aderir, sobreviver e formar biofilmes multiespécies em diversas superfícies, dificultando sua eliminação pelos programas rotineiros de higienização (JAHIE e HA, 2014; GIAOURIS et al., 2015; FARGERLUND et al., 2017; RODRIGUEZ-LOPEZ et al., 2019). Inúmeros trabalhos vem demonstrando a capacidade de formação de biofilme monoespécies de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. que varia de acordo com a superfície de fixação, disponibilidade de nutrientes, tempos e temperaturas de incubação e condições ambientais impostas sendo escassos os estudos que demonstrem o comportamento na dinâmica de formação por esses dois patógenos associados em biofilmes mistos *in vitro* (KADAM et al., 2013; BOLOCAN et al, 2016; ABEYSUNDARA et al., 2017; LIU et al., 2018; MELCON et al., 2018; KIM et al., 2018; IÑIGUEZ-MORENO et al., 2019; DJEBBI-SIMMONS et al., 2019).

No presente estudo, foi avaliada a capacidade de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em formar biofilmes puros e mistos em condições ambientais comumente encontradas nas indústrias de alimentos como: superfície (polipropileno) e temperatura (12 °C). A escolha por esses dois microrganismos emana da importância de ambos para às cadeias de produção de produtos de origem animal e pelo fato de que os isolados foram obtidos em superfícies de equipamentos e utensílios após higienização pré-operacional na mesma indústria de abate e processamento de suínos, permitindo sugerir a interação entre essas bactérias em biofilmes mistos (SERENO et al, 2019; VIANA et al., 2019).

Listeria monocytogenes e *S. Typhimurium* em condições mistas para a formação de biofilme apresentaram redução na adesão inicial (1 h), e sofreram influência direta da temperatura de incubação, sendo que a 12 °C, houve influência negativa nas contagens até 24 h de avaliação. São inúmeros os mecanismos que podem estar associados a estes resultados encontrados sendo, um deles, a disponibilidade do inóculo que pode ser um fator de concorrência entre os microrganismos participantes da matriz, o que também foi observado por Grandi et al. (2018), em biofilmes mistos de *L. monocytogenes* e *E. coli* onde as contagens de ambas foram variáveis de acordo a disponibilidade de células planctônicas, levando a saturação da superfície estudada pelas células aderidas.

A presença de flagelos também é um outro fator que mostra ter influência na maior adesão inicial, o que foi observado no presente estudo nos biofilmes puros de *S. Typhimurium* a 37 °C (FIGURA 1M) e não observado com *L. monocytogenes* já que não é capaz de produzir flagelos nesta faixa de temperatura e, por isso, demonstrou menor capacidade de adesão nestas condições corroborando o estudo de Iniguez-Moreno et al. (2018). Além disso, na temperatura de incubação de 12 °C houve redução nas contagens iniciais de células sésseis de *S. Typhimurium* e não houve interferência sobre *L. monocytogenes* (TABELA 2), evidenciando a capacidade psicrotrófica de *L. monocytogenes*, o que pode favorecer o crescimento nesta temperatura (FERREIRA et al., 2014; LEE et al., 2017).

Na avaliação à 96 h e 120 h, os biofilmes puros mostraram contagens mais elevadas quando comparados aos biofilmes mistos (TABELA 2). Esses resultados também foram observados em biofilmes mistos de *Salmonella* spp. + *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes* + *E. coli* (GKANA et al., 2017; MORENO et al. 2018; GRANDI et al., 2018). Contudo, no presente estudo, não houve diferença entre a população total dos biofilmes mistos e as contagens dos biofilmes puros, principalmente em 120 h (FIGURA 3), demonstrando que não houve interferência das estirpes estudadas na alteração da estrutura populacional dos biofilmes mistos. Esses resultados são relevantes, tendo em vista que os biofilmes multiespécies são encontrados no ambiente natural das indústrias de alimentos, contribuindo para a presença e persistência em ambientes industriais (FARGERLUND et al., 2017; RODRIGUEZ-LOPEZ et al., 2019).

Com relação a comparação entre as células planctônicas e sésseis (FIGURA 2) foi observado uma tendência de crescimento paralelo entre elas até 96 h. Contudo,

em 120 h houve redução das células sésseis sem alteração na contagem de células planctônicas. Isso demonstra o potencial de biotransferência de distintos estágios de formação dos biofilmes ao longo do tempo para o ambiente, principalmente em biofilmes maduros demonstrando um potencial para o aumento do risco para a indústria de alimentos devido a contaminação cruzada entre superfícies e produtos de forma contínua (MACEDO e ABRAHAM, 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

Tratando-se da arquitetura do biofilme já foram demonstradas estruturas com aspecto de favo de mel ou formas ovais em estudos com *L. monocytogenes*, observando-se poros, indicando a formação de canais, que atribui-se a função de auxiliar na distribuição de nutrientes e oxigênio (RIEU et al. 2008; REIS-TEIXEIRA et al., 2017), estruturas estas que foram observadas neste estudo (FIGURA 1B, 1C e 1F). Adicionalmente, a deposição de estrutura de aspecto viscoso com presença de células lado a lado é uma característica da adesão bacteriana inicial e consolidação do biofilme (PILCHAVÁ et al., 2014), o que também foi observado em biofilmes mistos em 1h/37°C e 24h/12°C (FIGURA 1U e 1R). Com o passar do tempo de formação do biofilme é observada a deposição de matriz de EPS sobre as células bacterianas formando estruturas com aspecto tridimensional com orientação em formas de galhos, promovendo a ramificação dos biofilmes sobre as superfícies, configurando biofilmes maduros (PILCHAVÁ et al., 2014), o que foi observado com melhor nitidez nas avaliações dos biofilmes de 3000h (FIGURA 4A, 4B e 4C).

A capacidade de resistência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. a condições estressantes, como dessecações tem sido estudada (GRUZDEV et al., 2012; PIERCEY et al., 2017; DJEBBI-SIMMONS et al., 2019; KRAGH et al., 2020), dessa forma avaliamos a viabilidade destas células bacterianas em biofilmes mantidos a 10 °C por 3000 h. Por esta avaliação sugere a capacidade da persistência destes isolados em condições semelhantes ao ambiente de processamento de alimentos, sendo necessários novos estudos para a compreensão da composição da matriz de EPS e expressão de genes regulatórios relacionados as condições adversas, uma vez que as células encontravam-se viáveis quando mantidas nesta condição (FIGURA 5A, 5B e 5C).

Inúmeros mecanismos genéticos, como fatores relacionados à virulência, tolerância às condições de estresse, podem estar relacionados à formação de biofilme. Em relação à *L. monocytogenes*, os mecanismos podem variar de acordo com o tipo de superfície, a temperatura e tempo de incubação e a presença de outros

microrganismos. *L. monocytogenes* é capaz de tolerar uma ampla variedade de condições estressantes, como desequilíbrio ácido e osmótico e baixas temperaturas, sendo estas características reguladas pelo gene *prfA*, que foi detectado nas culturas de *L. monocytogenes* avaliadas no presente estudo. O gene *prfA* é um ativador transcricional responsável pela expressão de genes de virulência, induzindo a formação de biofilmes e sobrevivência em ambientes industriais (BRUNO JR. et al 2010; LEMON et al, 2010; HERAS et al, 2011; RIBEIRO et al., 2014, GRANDI et al., 2018; GANDRA et al, 2019).

Outro fator importante na adesão inicial de *L. monocytogenes* é o gene *flaA*, responsável por codificar proteínas para biossíntese de flagelos sendo sua produção dependente da temperatura de incubação, o qual é reprimido a 37 °C (LIU et al, 2002; SCHIRM et al., 2004; MATTILLA et al., 2011). Dessa forma, o gene *flaA* desempenha papel fundamental na formação inicial de biofilmes através da motilidade, pois os flagelos auxiliam na busca por superfície para adesão bacteriana (LEMON et al. 2007; PIERCEY et al., 2016; ZHANG et al, 2018). Por mais que os isolados de *L. monocytogenes* utilizadas no presente estudo apresentassem esse gene no seu genoma (TABELA 1), sua expressão não foi observada, possivelmente pelo fato de que tenha sido avaliada somente em biofilmes maduros de 120 h.

A formação de biofilmes de *L. monocytogenes* também pode estar associada ao sistema de *quorum sensing*, desenvolvido através da expressão do gene *luxS* induzindo a síntese de moléculas autoindutoras (JU et al. 2018) e sua expressão foi detectada nas diferentes situações estudadas. No entanto, estudos demonstraram que deleções gênicas de *luxS* não interferiram na adesão e formação do biofilme de *L. monocytogenes*, uma vez que a formação de biofilme pode estar regulada através de outros genes, como o *locus agr* (BELVAL et al. 2006; SELA et al, 2006; BONSAGLIA et al, 2014; GRANDI et al., 2018).

Com relação ao *locus agr*, este é considerado um sistema regulador acessório para *L. monocytogenes* responsável por codificar quatro proteínas através da transcrição do operon *agrBDCA* (RIEU et al., 2007; RIEDEL et al., 2009; CHANG et al, 2012). A presença do gene *agrA* está relacionado adesão inicial e autoindução do sistema de *quorum sensing*, e a regulação de outros genes de virulência, juntamente com *agrC* (GARMYN et al, 2012; ZETZMANN et al, 2016). O gene *agrB* participa da síntese de proteínas de membrana importantes para expressão do *agrD*. Desse modo, estudos demonstraram que deleções em *agrD* provocaram deficiência na invasão

celular e formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* (RIEU et al., 2007; RIEDEL et al., 2009). Além disso, como já observado por outros autores, a presença dos genes *agrBDCA* nos isolados de *L. monocytogenes*, pode colaborar para a adesão e formação de biofilme em condições estressantes como baixas temperaturas e diferentes superfícies, bem como para a interação das células bacterianas na matriz do biofilme (VIVANT et al, 2014; GANDRA et al, 2019; ZETZMANN et al, 2019). No presente estudo houve a expressão de constituintes do *locus agr* (*agrBDC*) nas condições testadas, exceto para o gene *agrA* cuja regulação pode estar associada as primeiras horas de formação do biofilme o que acarretou em ausência de expressão uma vez que esta avaliação foi realizada em biofilmes maduros (120 h), mesmo que o gene tenha sido encontrado no genoma bacteriano dos isolados (TABELA 1).

S. Typhimurium é capaz de formar biofilmes em várias superfícies, contribuindo para sobrevivência em ambientes hostis ao microrganismo, o que pode ser mediada pela expressão de alguns genes regulatórios. A presença dos genes *agfA*, *lpfA* e *adrA* que foram objeto de estudo, mostra a capacidade de *S. Typhimurium* em produzir fímbrias finas e celulose, sendo estes, mecanismos auxiliares para adesão, agregação, formação e manutenção de biofilmes em superfícies de uso industrial, conforme observado na Figura 1I e 1M (YOO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; HU et al., 2020). A expressão desses genes é regulada de acordo com a superfície, temperatura e presença de constituintes orgânicos (WANG et al., 2016; BORGES et al., 2018).

Além disso, a detecção de genes de virulência, *invA* e *sipA*, obtidos no isolado de *S. Typhimurium* do presente estudo contribuem para o adesão e consolidação bacteriana, através do recrutamento de células não ligadas, aumentando a população dos biofilmes (JENNINGS et al., 2012). Outro mecanismo importante para a comunicação celular é o sistema *quorum sensing*, regulados pelos genes *sidA* e *luxS*, (CHOI et al., 2007; WANG et al., 2016) sendo também detectados no presente estudo (TABELA 1). Estes genes são alvos como medidas de controle para *Salmonella* sp. em estudos de dinâmica de formação de biofilmes (SIVASANKAR et al., 2020)

Assim, a caracterização da dinâmica de formação de biofilmes mistos, juntamente com presença e expressão de genes relacionados a formação de biofilme e condições adversas para *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*, são fatores que comprovam a associação desses patógenos para a formação, manutenção e

persistência de biofilmes mistos tornam-se resultados importantes para a indústrias de alimentos e saúde pública.

4.5 CONCLUSÃO

A caracterização genotípica dos isolados de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* demonstrou genes relacionados a formação de biofilme e adaptação a condições de estresse, que podem participar na sobrevivência e persistência desses microrganismos em ambientes industriais. Também apresentaram capacidade de formação de biofilmes mistos a 12 °C e 37 °C e potencial de biotransferência em biofilmes maduros, além da manutenção de células viáveis por 3000 h a 10 °C, que permite sugerir a possibilidade de persistência de nichos ecológicos nos ambientes industriais. Por fim, biofilmes maduros de *L. monocytogenes* não sofreram influência da temperatura, superfície e condição mista sobre a expressão de genes relacionados a formação de biofilme (*prfA*, *luxS*) e condições adversas (*agrBCD*).

4.6 REFERÊNCIAS

- ABEYSUNDARA, P.A.; DHOWLAGHAR, N.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, M.W.; CHANG, S.; MAHMOUD, B.; SHARMA, C.S.; MA, D. Growth and biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in cantaloupe flesh and peel extracts on four food-contact surfaces at 22°C and 10°C. **Food Control**, v. 80, p. 131-142, 2017.
- AUTRET, N.; RAYNAUD, C.; DUBAIL, I.; BERCHE, P.; CHARBIT, A. Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. **Infection and immunity**, v. 71, n. 8, p. 4463-4471, 2003.
- BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 184-194, 2011.
- BAUMLER, A.J.; HEFFRON, F. Identification and Sequence Analysis of *lpfABCDE*, a Putative Fimbrial Operon of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 8, p. 2087–2097, 1995.
- BELVAL, S.C.; GAL, L.; MARGIEWES, S.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Assessment of the Roles of *LuxS*, S-Ribosyl Homocysteine, and Autoinducer 2 in Cell Attachment during Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2644–2650, 2006.
- BOLOCAN, A.S.; NICOLAU, A.L.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; BORDA, D.; ONICIUC, E.A.; STESSL, B.; GURGU, L.; WAGNER, M.; JORDAN, K. Dynamics of *Listeria monocytogenes* colonisation in a newly-opened meat processing facility. **Meat Science**, v. 113, p. 26–34, 2016.
- BONSAGLIA, E.C.R.; SILVA, N.C.C.; FERNADES JÚNIOR, A.; ARAÚJO JÚNIOR J.P., TSUNEMI M.H., RALL, V.L.M. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, p. 386-391, 2014.
- BORGES, K.A.; FURIN, T.Q.; SOUZA, S.N.; MENEZES, R.; LIMA, D.A.; FORTES, F.B.B.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from avian sources is partially related with their in vivo pathogenicity. **Microbial Pathogenesis**, v.118, p. 238–241, 2018.

- BRUNO JR., J.C.; FREITAG, N.E. Constitutive Activation of *PrfA* Tilts the Balance of *Listeria monocytogenes* Fitness Towards Life within the Host versus Environmental Survival. **PLoS ONE**, v.5, n.12, p. 1-12, 2010.
- CARVALHO, T. F.; VIEIRA, B. S.; VALLIM, D. C.; CARVALHO, L. A.; CARVALHO, T. C. T.; PEREIRA, R. C. L.; FIGUEIREDO, E. E. S. Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 109, p. 77–82, 2019.
- CHANG, Y.; GU, W.; FISCHER, N.; MCLANDSBOROUGH, L. Identification of genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation by mariner-based transposon mutagenesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 2051–2062, 2012.
- CHOI, J.; SHIN, D.; RYU, S. Implication of Quorum Sensing in *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Virulence: the *luxS* Gene Is Necessary for Expression of Genes in Pathogenicity Island 1. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4885–4890, 2007.
- COLLINSON, S.K.; EMODY, L.; TRUST, T.J.; KAY, W.W. Thin Aggregative Fimbriae from Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 13, p. 4490-4495, 1992.
- DEL CERRO, A.; SOTO, S.M., MENDOZA, M.C. Virulence and antimicrobial-resistance gene profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. **Food Microbiology**, v. 20, p. 431–438, 2003.
- DHINGANI, R. M.; JOSHI, B. H.; PRASAD, R.V. Prevalence and Study of Antibiotic Resistant Pattern of *Salmonella* in Raw Milk. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 1732-1737, 2018.
- DIAS, R.C., DOS SANTOS, B.C.; DOS SANTOS, L.F.; VIEIRA, M.A.; YAMATOJI, R.S.; MONDELLI, A.L.; SADATSUNE, T.; SFORCIN, J.M.; GOMES, T.A.; HERNANDES, R.T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v.124, p. 299-308, 2016.
- DJEBBI-SIMMONS, D.; XU, W.; JANES, M.; KING, J. Survival and inactivation of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium on food contact surfaces during log, stationary and long-term stationary phases. **Food Microbiology**, v. 84, n. 103272, 2019.
- FAGERLUND, A.; MØRETRØ, T.; HEIR, E.; BRIANDET, R.; LANGSRUD, S. Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 17, p. 1-21, 2017.
- FERNANDES, M. S.; YORIKI KABUKI, D. Y.; ARNALDO YOSHITERU KUAYE, A. Y. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 5–12, 2015.
- FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ, M. J. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 1, p. 150-170, 2014.
- FERRONATTO, A. I.; PELLEGRINI, D. C. P.; GUERRA, P.; CARDOSO, M. R. I. Distribuição de grupos clonais de *Listeria monocytogenes* em carcaças e no ambiente de matadouros frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.3, p. 42-49, 2012.
- GANDRA, T. K. V.; VOLCANA, D.; KRONINGA, I. S.; MARINIB, N.; OLIVEIRAC, A. C.; BASTOSD, C. P.; SILVA, W. P. Expression levels of the *agr* locus and *prfA* gene during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel and polystyrene during 8 to 48 h of incubation 10 to 37 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 300, p. 1–7, 2019.
- GARMYN, D.; AUGAGNEUR, Y.; GAL, L.; VIVANT, A.; PIVETEAU, P. *Listeria monocytogenes* Differential Transcriptome Analysis Reveals Temperature-Dependent *Agr* Regulation and Suggests Overlaps with Other Regulons. **PLOS ONE**, v. 7, n.9, p. 1-13, 2012.
- GIAOURIS, E.; HEIR, E.; DESVAUX, M.; HÉBRAUD, M.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; DOULGERAKI, A.; NYCHAS, G.J.; CÁNIOVÁ, M.K.; CZACZYK, K.; OLMEZ, H.; SIMÕES, M. Intra- and inter-species interactions within biofilms of importante foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n. 841, p. 1-26, 2015.

- GKANA, E.N.; GIAOURIS, E.D.; DOULGERAKI, A.L.; KATHARIOU, S.; NYCHAS, G.J.E. Biofilm formation by *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* on stainless steel under either mono- or dual-species multi-strain conditions and resistance of sessile communities to sub-lethal chemical disinfection. **Food Control**, v.73, p. 838-846, 2017.
- GONÇALVES-TENÓRIO, A.; SILVA, B. N.; RODRIGUES, V.; CADAVEZ, V.; GONZALES-BARRON, U. Prevalence of Pathogens in Poultry Meat: A Meta-Analysis of European Published Surveys. **Foods**, v. 7n. 5, p 61-69, 2018.
- GRANDI, A.Z.; PINTO, Y.M.; DESTRO, M.T. Dual-species biofilm of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* on stainless steel surface. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 61, p. 1-9, 2018.
- GRUZDEV, N.; PINTO, R.; SELA, S. Persistence of *Salmonella* enterica during dehydration and subsequent coldstorage. **Food Microbiology**, v. 32, p. 415-422, 2012.
- HADJILOUKA, A.; KOUBOU, V.; PARAMITHIOTIS, S.; MATARAGAS, M.; DROSINOS, E.H. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in strawberries in Greece and performance evaluation of the culture media. **Clinical Research and Trials**, 4(1):1-3, 2018.
- HALATSI, K.; OIKONOMOU, L.; LAMBIRI, M.; MANDILARA, G.; VATOPOULOS, A.; KYRIACOU, A. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdhA*. **FEMS Microbiology Lett**, v. 259, p. 201–207, 2006.
- HAUBERT, L.; ZEHETMEYR, M.L.; PEREIRA, Y.M.N.; KRONING, I.S.; MAIA, D.S.V.; SEHN, C.P.; LOPES, G. V.; LIMA, A.S.; SILVA, W. P. Tolerance to benzalkonium chloride and antimicrobial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extract in *Salmonella* spp. isolates from food and food environments. **Food Research International**, v. 116, p. 652–659, 2019.
- HERAS, A.; CAIN, R.J.; BIELECKA, M.K.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. Regulation of *Listeria* virulence: *PrfA* master and commander. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 118-127, 2011.
- HU, H.; JIA, K.; WANG, H.; XU, X.; ZHOU, G.; HE, S. Novel sRNA and regulatory genes repressing the adhesion of *Salmonella* enteritidis exposed to meat-related environment. **Food Control**, v. 110, n. 107030, p. 1-9, 2020.
- IBUSQUIZA, P. S.; GROOT, M. N.; DEBÁN-VALLES, A.; ABEE, T.; DEN BESTEN, H. M. W. Impact of growth conditions and role of *sigB* on *Listeria monocytogenes* fitness in single and mixed biofilms cultured with *Lactobacillus plantarum*. **Food Research International**, v. 71, p. 140–145, 2015.
- INIGUEZ-MORENO, M.; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M.; GUERRERO-MEDINA, P.J.; AVILA-NOVOA, M.G. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 310–319, 2018.
- IÑIGUEZ-MORENO, M.; GUTIÉRREZ-LOMELÍA, 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, p. 32–41, 2019.
- JAHID, I.K.; HÁ, S. The Paradox of Mixed-Species Biofilms in the Context of Food Safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 990-1100, 2014.
- JENNINGS, M.E.; QUICK, L.N.; UBOL, N.; SHROM, S.; DOLLAHON, N.; WILSON, J.W. Characterization of *Salmonella* Type III Secretion Hyper-Activity Which Results in Biofilm-Like Cell Aggregation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p.1-11, 2012.
- JU, X.; JUNJIE LI, J.; MENGJIAO ZHU, M.; LU, Z.; LV, F.; ZHU, X.; BIE, X. Effect of the *luxS* gene on biofilm formation and antibiotic resistance by *Salmonella* serovar Dublin. **Food Research International**, v. 107, p. 385–393, 2018.
- KADAM, S. R.; BESTEN, H. M.W.; VEEN, S. V. D.; ZWIETERING, M. H.; MOEZELAAR, R. T.; ABEE, T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.165, p. 259–264, 2013.
- KIM, Y.; KIM, H.; BEUCHAT, L.R.; RYU, J.H. Development of non-pathogenic bacterial biofilms on the surface of stainless steel which are inhibitory to *Salmonella* enterica. **Food Microbiology**, v. 69, p. 136-142, 2018.

- KOSTAKI, M.; CHORIANOPOULOS, N.; BRAXOU, E.; JOHN NYCHAS, G.J. GIAOURIS, E. Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of Sessile Cells of *Listeria monocytogenes* Strains under Monospecies and Dual-Species (with *Salmonella enterica*) Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8 p. 2586–2595, 2012.
- KRAGH, M.L.; THYKIER, M.; HANSEN, L.T. A long-amplicon quantitative PCR assay with propidium monoazide to enumerate viable *Listeria monocytogenes* after heat and desiccation treatments. **Food Microbiology**, v. 86, n. 103310, p. 1-10, 2020.
- LAMAS, A.; REGAL, P.; VAZQUEZ, B.; MIRANDA, J. M.; CEPEDA, A.; FRANCO, C. M. Influence of milk, chicken residues and oxygen levels on biofilm formation on stainless steel, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. **Food Control**, v. 90, p. 1-9, 2018.
- LEE, B. H.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. Increased adhesion of *Listeria monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2221, 2017.
- LEMON, K.P.; FREITAG, N. E.; KOLTER, R. The Virulence Regulator *PrfA* Promotes Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 15, p. 3969–3976 2010.
- LIU, A.; SHI, C. Pork juice promotes biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 12439, p.1-8, 2018.
- LIU, S.; GRAHAM, J. E.; BIGELOW, L.; MORSE, P. D.; WILKINSON, B.J. Identification of *Listeria monocytogenes* Genes Expressed in Response to Growth at Low Temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p. 1697–1705, 2002.
- MATTILA, M.; LINDSTRÖM, M.; SOMERVUO, P.; MARKKULA, A.; KORKEALA, H. Role of *flhA* and *motA* in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 177–183, 2011.
- MIRANDA, R.O.; CAMPOS-GALVÃO, M.E.M.; NERO, L.A. Expression of genes associated with stress conditions by *Listeria monocytogenes* in interaction with nisin producer *Lactococcus lactis*. **Food Research International**, v. 105, p. 897-904, 2018.
- MOHAMED, R.I.; ABDELMONEM, M. A.; AMIN, H. M. Virulence and antimicrobial susceptibility profile of *Listeria monocytogenes* isolated from frozen vegetables available in the Egyptian market. **African Journal of Microbiology Research**, v. 12, n. 9, p.218-224, 2018.
- MORAIS, J.O.; CRUZ, E.A.; PINHEIRO, I.; OLIVEIRA, T.C.M.; ALVARENGA, V.; SANT'ANA, A.; MAGNANI, M. An ordinal logistic regression approach to predict the variability on biofilm formation stages by five *Salmonella enterica* strains on polypropylene and glass surfaces as affected by pH, temperature and NaCl. **Food Microbiology**, v. 83, p. 95-103, 2019.
- MØRETRØ, T.; SCHIRMER, B. C. T.; EVEN HEIR, E.; FAGERLUND, A.; HJEMLI, P.; LANGSRUD, S. Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 215–224, 2017.
- NOWAK, J.; CRUZ, C. D.; TEMPELAARS, M. ABEE, T.; VLIT, A. H. M. V.; FLETCHER, G. C.; HEDDERLEY, D.; PALMER, J.; FLINT, S. Persistent *Listeria monocytogenes* strains isolated from mussel production facilities form more biofilm but are not linked to specific genetic markers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 256, p. 45–53, 2017
- OLIVEIRA, D. C.V.; JUNIOR, A.F.; KANENO, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; SILVA, N.C.C.; RALL, V.L.M. Ability of *Salmonella* spp. to Produce Biofilm Is Dependent on Temperature and Surface Material. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 11, n. 6, p. 478-483, 2014.
- OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA; D.F.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 41, p. 97-106, 2010.
- OLIVEIRA, T. S.; VARJÃO, L. M.; SILVA, L. N. N.; PEREIRA, R. C. L.; HOFER, E.; VALLIM, D. ALMEIDA, R. C. C. *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. **Food Control**, v. 88, p. 131-138, 2018.

- PIERCEY, M. J.; HINGSTON, P. A.; HANSEN, L. T. Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 223, p. 63–74, 2016.
- PIERCEY, M.J.; ELLS, T.C.; MACINTOSH A. J.; HANSEN, L.T. Variations in biofilm formation, desiccation resistance and Benzalkoniumchloride susceptibility among *Listeria monocytogenes* strains isolated in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 254-261, 2017.
- PIETA, L.; GARCIA, F. B.; RIBOLDI, G.P.; OLIVEIRA, L.A.; FRAZZON, A.P.G.; FRAZZON, J. Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation, stress-response, and virulence in *Listeria monocytogenes* strains grown at different temperatures. **Annals of Microbiology**, v. 64, n.4. p. 1707-1014, 2014.
- PILCHOVÁ, T.; HERNOULD, M.; PRÉVOST, H.; DEMNEROVÁ, K.; PAZLAROVÁ, J.; TRESSE, O. Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 35, p. 366-372, 2014.
- POIMENIDOU, S. V.; CHRYSADAKOU, M.; TZAKONIATI, A.; BIKOULI, V. C.; NYCHAS, G. J.; SKANDAMIS, P. N. Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 164-171, 2016.
- REIS-TEIXEIRA, F.B.; ALVES, V.F.; DE MARTINIS, E.C.P. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 48, p. 587-591, 2017.
- RIBEIRO, V.B.; MUJAHIDB, S.; ORSI, R.H.; BERGHOLZ, T.M.; WIEDMANNB, M.; BOOR, K.J.; DESTRO, M.T. Contributions of σB and *PrfA* to *Listeria monocytogenes* salt stress under food relevant conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.177, p. 98–108, 2014.
- RIEDEL, C.U.; MONK, I.R.; CASEY, P.G.; WAIDMANN, M.S.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. *AgrD*-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v.71, n.5, p. 1177–1189, 2009.
- RIEU, A.; JEAN-PAUL LEMAÎTRE, J.P.; JEAN GUZZO, J.; PASCAL PIVETEAU, P. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 76–82, 2008.
- RIEU, A.; WEIDMANN, S.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. *Agr* system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6125-6133, 2007.
- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P.; BERNÁRDEZA, M.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J.J.; COMESAÑAB, A.S.; CABO, M. L. Identification and metagenetic characterisation of *Listeria monocytogenes* harbouring communities present in food-related industrial environments. **Food Control**, v. 95, p. 6–17, 2019.
- RODRÍGUEZ-MELCÓN, C.; RIESCO-PELÁEZ, F.; CARBALLOD, J.; GARCÍA-FERNÁNDEZA, C.; CAPITAA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Structure and viability of 24-and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. **Food Microbiology**, v. 76, p. 513–517, 2018.
- RYAN, S.; BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. A five-gene stress survival islet (SSI-1) that contributes to the growth of *Listeria monocytogenes* in suboptimal conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 984-995, 2010.
- SCHIRM, M.; KALMOKOFF, M.; AUBRY, A.; THIBAUT, P.; SANDOZ, M.; LOGAN, S. M. Flagellin from *Listeria monocytogenes* Is Glycosylated with β -O-Linked N-Acetylglucosamine. **Journal of Bacteriology**, v.186, n. 20, p. 6721–6727, 2004.
- SELA, S.; FRANK, S.; BELAUSOV, E.; PINTO, R. A Mutation in the *luxS* Gene Influences *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5653–5658, 2006.
- SERENO, M.J.; VIANA, C.; PEGORARO, K.; DA SILVA, D. A. L.; YAMATOGLI, R. S.; NERO, L. A.; BERSOT, L. S. Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistente *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil. **Food Microbiology**, v. 84, n. 103234, 2019.

- SILVA, S.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R.; AZEVEDO, J. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 7, p. 1379-1385, 2008.
- SIVASANKAR, C.; JHA, N.K.; GHOSH, R.; SHETTY, P.H. Anti quorum sensing and anti virulence activity of tannic acid and it's potential to breach resistance in *Salmonella* enterica Typhi / Paratyphi A clinical isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, n. 103813, p. 1-12, 2020
- SKYBERG, J.A.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Virulence Genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. **Avian Diseases**, v. 50, p. 77–81, 2006.
- SWAMY, S.C.; BARNHART, H.M.; LEE, M.D.; DREESEN, D.W. Virulence determinants *invA* and *spvC* in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.10, p. 3768–3771, 1996.
- TAMBER, S. Population-wide survey of *Salmonella* enterica response to high-pressure processing reveals a diversity of responses and tolerance mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 1-12, 2018.
- TAMBURRO, M.; RIPABELLI, G.; VITULLO, M.; DALLMAN, T.J.; PONTELLO, M.; AMAR, C.F.L.; SAMMARCO, M.L. Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 40, p. 31–39, 2015.
- VERMA, P.; SAHARAN, V. V.; NIMESH, S.; SINGH, A. P. Phenotypic and virulence traits of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated from vegetables and fruits from India. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 270-281, 2018.
- VIANA, C.; SERENO, M.J.; PEGORARO, K.; YAMATOOGI, R. S.; CALL, D.R.; BERSOT, L. S.; NERO, L. A.; Distribution, diversity, virulence genotypes and antibiotic resistance for *Salmonella* isolated from a Brazilian pork production chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 310, n. 108310, 2019.
- VILLA-RODRÍGUEZ, E.; IBARRA-GÁMEZ, C.; DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S. Extraction of high-quality RNA from *Bacillus subtilis* with a lysozyme pretreatment followed by the Trizol method. **Journal of Microbiological Methods**, n. 147, p. 14–16, 2018.
- VIVANT, A.; GARMYN, D.; GAL, L.; PIVETEAU, P. The *Agr* communication system provides a benefit to the populations of *Listeria monocytogenes* in soil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.4, n.160, p.1-7, 2014.
- VOSS-RECH, D.; KRAMER, B.; SILVA, V. S.; REBELATTO, R.; ABREU, P. G.; COLDEBELLA, A.; VAZ, C. S. L. Longitudinal study reveals persistent environmental *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. **Veterinary Microbiology**, v. 233, 118–123, 2019.
- WANG, H.; DONG, Y.; WANG, G.; XU, X.; ZHOU, G. Effect of growth media on gene expression levels in *Salmonella* Typhimurium biofilm formed on stainless steel surface. **Food Control**, v. 59, p. 546-552, 2016
- YOO, A.Y.; YU, J. E.; YOO, H.; LEE, T.H.; LEE, W.H.; OH, J.; KANG, H.Y. Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella Agf* expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, p. 131–136, 2013.
- ZETZMANN, M.; SÁNCHEZ-KOPPER, A.; WAIDMANN, M. S.; BLOMBACH, B.; RIEDEL, C. U. Identification of the *agr* Peptide of *Listeria monocytogenes*. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n. 989, p 1-11, 2016.
- ZHANG, H.; HUB, Y.; ZHOUC, C.; YANGC, Z.; WUA, L.; ZHUA, M. BAO, H.; ZHOU, Y.; PANGA, M.; WANGA, R.; ZHOU, X. Stress resistance, motility and biofilm formation mediated by a 25kb plasmid pLMSZ08 in *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 94, p. 345–352, 2018.
- ZWE, Y. H.; TANG, V. C. Y.; AUNG, K. T.; GUTIÉRREZ, R. A.; NG, L. C.; YUK, H-G. Prevalence, sequence types, antibiotic resistance and, *gyrA* mutations of *Salmonella* isolated from retail fresh chicken meat in Singapore. **Food Control**, v. 90, p. 233-240, 2018.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacidade de formação de biofilme mistos de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* descrita nesse estudo, possibilita sugerir que esses dois microrganismos podem viver em sinergismo nos ambientes das indústrias de alimentos. Ambos os isolados apresentam genes relacionados ao desenvolvimento de biofilmes e tolerância a condições de estresse. *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* foram capazes de manter células viáveis em biofilme de 3000 h a 10 °C, fato que pode sugerir a capacidade de sobreviver por longos períodos nas indústrias de alimentos. Em MEV, os biofilmes multiespécies apresentaram estrutura complexa e robusta, o que pode dificultar a eliminação por programas de higienização, e promover a proteção de uma espécie bacteriana em função de outra.

Nossos resultados demonstram que deve haver uma preocupação por parte das indústrias de alimentos com relação a dinâmica de formação de biofilmes e sobrevivência de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* nos ambientes de manipulação de alimentos, e indica a necessidade do constante monitoramento das superfícies industriais, com possível diagnóstico para a avaliação de biofilmes minimizando a contaminação dos alimentos com patógenos de importância para a saúde pública. Assim, novos estudos devem ser realizados com biofilmes mistos de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* e outros patógenos, buscando estratégias para a prevenção da adesão e formação de biofilmes, bem como sua eliminação.

REFERÊNCIAS

- AHMER, B.M.M. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, v. 52, n.4, p.933-945, 2004.
- ALMEIDA, R. M.; BARBOSA, A. V.; LISBOA, R. C.; SANTOS, A. F M.; HOFERA, E.; VALLIMA, D. C.; HOFERB, C. B. Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 282-289, 2017.
- ANDRADE, R.B.; GEMELLI, T.; DALL ONDER, L.P.; CRISTINA, K.; BRITO, T.; BARBOZA, A. A. L.; BRITO B. G. Métodos Diagnósticos para os Patógenos Alimentares: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.741-750, 2010.
- ARTEAGA, V.; LAMAS, A.; REGAL, P.; VÁZQUEZ, B.; MIRANDA, J.M.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.M. Antimicrobial activity of apitoxin from *Apis mellifera* in *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and its effects on motility, biofilm formation and gene expression. **Microbial Pathogenesis**, v.137, n. 103771, p. 1-6, 2019.
- AUSTIN, J.W.; SANDERS, G.; KAY, W.W., COLLINSON, S.K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v.162, p.295-301, 1998.
- BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 184-194, 2011.
- BARNHART, M.M.; CHAPMAM, M.R. Curli biogenesis and function. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p.131–147, 2006.
- BELVAL, S.C.; GAL, L.; MARGIEWES, S.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Assessment of the roles of *LuxS*, S-Ribosyl Homocysteine, and Autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.4, p. 2644–2650, 2006.
- BERSOT, L. S.; CAVICCHIOLI, V.Q. ; VIANA, C. ; BURIN, R.C.K. ; CAMARGO, A. C. ; PINTO, J. P. A. N. ; NERO, L.A. ; DESTRO, M.T. Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Diversity of *Salmonella* along the Pig Production Chain in Southern Brazil. **Pathogens**, v. 8, n. 204, p. 1-10, 2019.
- BERTSCH, D.; RAU, J.; EUGSTER, M. R.; HAUG, M. C.; LAWSON, P. A.; LACROIX, C.; MEILE, L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 526-532, 2013.
- BIER, D., KICH, J. D., DUARTE, S. C., SILVA, M. R., VALSONI, L. M., RAMOS, C. A., ARAÚJO, F. R. Survey of *Salmonella* spp. in beef meat for export at slaughterhouses in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 11, p. 2037-2043, 2018.

BONSAGLIA, E.C.R.; SILVA, N.C.C.; FERNADES JÚNIOR, A.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; TSUNEMI, M.H.; RALL, V.L.M. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, p. 386-391, 2014.

BORGES, K.A.; FURIN, T.Q.; SOUZA, S.N.; MENEZES, R.; LIMA, D.A.; FORTES, F.B.B.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from avian sources is partially related with their in vivo pathogenicity. **Microbial Pathogenesis**, v.118, p. 238–241, 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde, Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. 2018b. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf> (acesso em 27/12/2019).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 20, de 21 de outubro de 2016. Estabelece o Controle e o Monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 205, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Coordenação Geral de Programas Especiais. Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA, Brasília, DF, v. 4, 2018b.

BRITO, D. A. P.; SOUSA, G. L. A.; SOUZA, Y. L.; REIS, V.; SILVA, J. R. S.; REIS, A. OBA, A. Sources of paratyphoid *Salmonella* in the production chain of broilers in the Northern mesoregion of Maranhão State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6, p. 3021-3034, 2019.

BRUNO JR., J.C.; FREITAG, N.E. Constitutive Activation of *PrfA* Tilts the Balance of *Listeria monocytogenes* Fitness Towards Life within the Host versus Environmental Survival. **PLoS ONE**, v.5, n.12, p. 1-12, 2010.

BUCHANAN, R.L.; GORRIS, L.G.M.; HAYMAN, M.M.; JACKSON, T.C.; WHITING, R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v.75, p.1-13, 2017.

BURMØLLE, M.; REN, D.; BJARNSHOLT, T.; SØRENSEN, S.J. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 1-8, 2014.

BURRAL, L.S.; GRIM, C.J.; MAMMEL, M.K.; DATTA, A.R. A Comprehensive Evaluation of the Genetic Relatedness of *Listeria monocytogenes*. **Frontiers in Public Health**, v.5, n. 241, p.1-10, 2017.

CARVALHO, T. F.; VIEIRA, B. S.; VALLIM, D. C.; CARVALHO, L. A.; CARVALHO, T. C. T.; PEREIRA, R. C. L.; FIGUEIREDO, E. E. S. Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 109, p. 77–82, 2019.

CAVALIN, P.B.B.; SARMIENTO, J.J.P.; KOBAYASHI, R.K.T.; NAKAZATO, G.; OCAÑA, A.N.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Pesquisa de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreogênica em linguças suínas frescas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 4, p. 1533-1546, 2018.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2019. Foodborne Outbreak Tracking and Reporting (FOOD Tool). <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>. (Acesso em 26/12/2019).

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2019. Foodborne Outbreak Tracking and Reporting (FOOD Tool). <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/> (Acesso em 27/12/2019).

CHANG, Y.; GU, W.; FISCHER, N.; MCLANDSBOROUGH, L. Identification of genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation by mariner-based transposon mutagenesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 2051–2062, 2012.

CHATURONGKASUMRIT, Y.; TAKAHASHI, H.; KEERATIPIBUL, S.; KUDA, T.; KIMURA, B. The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. **Food Control**, v. 22, p.1893-1899, 2011.

CLARKE, M.B.; HUGHES, D.T.; ZHU, C.; BOEDEKER, E.C.; SPERANDIO, V. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.27, p. 10420-10425, 2006.

COLLINSON, S.K.; CLOUTHIER, S.C.; DORAN, J.L.; BANSER, P.A.; KAY, W.W. *Salmonella enteritidis* *agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n.3, p. 662-667, 1996.

COSTERTON, J.W. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, p. 217–221, 1999.

CRUCELLO, A.; FURTADO, M.M.; CHAVES, M.D.R.; SANT'ANA, A.S. Transcriptome sequencing reveals genes and adaptation pathways in *Salmonella* Typhimurium inoculated in four low water activity foods. **Food Microbiology**, v.82, p.426-435, 2019.

CUNHA-NETO, A.; PANZENHAGEN, P.; CARVALHO, L.; RODRIGUES, D.; CONTE-JÚNIOR, C.; FIGUEIREDO, E. Occurrence and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolated from native fish slaughtered and commercialised in Brazil. **Journal of Food Safety and Food Quality**, v. 70, n.4, p. 91–124, 2019.

CZAJKOWSKI, R.; JAFRA, S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. **Acta Biochimica Polonica**, v.56, n. 1, p. 1-16, 2009.

D'AMICO, D.J.; DONNELLY, C.W. Detection, isolation and incidence of *Listeria* spp. in small-scale artisan cheese processing facilities: a methods comparison. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 12, p. 2499-2507, 2009.

DANTAS, S. T., CAMARGO, C. H., TIBA-CASAS, M. R., VIVIAN, R. C., PINTO, J. P., PANTOJA, J. C., RALL, V. L. Environmental persistence and virulence of *Salmonella* spp. Isolated from a poultry slaughterhouse. **Food Research International**, v. 129, v. 108835, p.1-8, 2020.

DEN BAKKER, H. C.; WARCHOCKI, S.; WRIGHT, E. M.; ALLRED, A. F.; AHLSTROM, C.; MANUEL, C. S.; STASIEWICZ, M. J.; BURRELL, A.; ROOF, S.; STRAWN, L.K.; FORTES, E.; NIGHTINGALE, K.K.; KEPHART, D.; WIEDMANN, M. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1882-1889, 2014.

DHINGANI, R. M.; JOSHI, B. H.; PRASAD, R.V. Prevalence and Study of Antibiotic Resistant Pattern of *Salmonella* in Raw Milk. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 1732-1737, 2018.

DJEBBI-SIMMONS, D.; XU, W.; JANES, M.; KING, J. Survival and inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on food contact surfaces during log, stationary and long-term stationary phases. **Food Microbiology**, v.84, p.1-6, 2019.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, 2002.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3819-3822, 2004.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997.

EFSA - European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017, **EFSA Journal**, v.16, n.12, p.1-262, 2018.

ENG, S.K.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, N.S.A; SER, H.L.; CHAN, K.G.; LEE, L.H. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n.3, p.284–293, 2015.

FAGERLUND, A.; MØRETRØ, T.; HEIR, E.; BRIANDET, R.; LANGSRUD, S. Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 17, p. 1-21, 2017.

FERNANDES, M. S.; YORIKI KABUKI, D. Y.; ARNALDO YOSHITERU KUAYE, A. Y. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 5–12, 2015.

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

GANDRA, T. K. V.; VOLCANA, D.; KRONINGA, I. S.; MARINIB, N.; OLIVEIRAC, A. C.; BASTOSD, C. P.; SILVA, W. P. Expression levels of the agr locus and prfA gene during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel and polystyrene during 8 to 48 h of incubation 10 to 37 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 300, p. 1–7, 2019.

GANDRA, T. K. V.; VOLCANA, D.; KRONINGA, I. S.; MARINIB, N.; OLIVEIRAC, A. C.; BASTOSD, C. P.; SILVA, W. P. Expression levels of the agr locus and prfA gene during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel and polystyrene during 8 to 48 h of incubation 10 to 37 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 300, p. 1–7, 2019.

GARMYN, D.; AUGAGNEUR, Y.; GAL, L.; VIVANT, A.; PIVETEAU, P. *Listeria monocytogenes* Differential Transcriptome Analysis Reveals Temperature-Dependent Agr Regulation and Suggests Overlaps with Other Regulons. **PLOS ONE**, v. 7, n.9, p. 1-13, 2012.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; DESVAUX, M.; HÉBRAUD, M.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; DOULGERAKI, A.; NYCHAS, G.J.; CÁNIOVÁ, M.K.; CZACZYK, K.; OLMEZ, H.; SIMÕES, M. Intra- and inter-species interactions within biofilms of importante foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n. 841, p. 1-26, 2015.

GKANA, E.N.; GIAOURIS, E.D.; DOULGERAKI, A.L.; KATHARIOU, S.; NYCHAS, G.J.E. Biofilm formation by *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* on stainless steel under either mono- or dual-species multi-strain conditions and resistance of sessile communities to sub-lethal chemical disinfection. **Food Control**, v.73, p. 838-846, 2017.

GONÇALVES-TENÓRIO, A.; SILVA, B. N.; RODRIGUES, V.; CADAVEZ, V.; GONZALES-BARRON, U. Prevalence of Pathogens in Poultry Meat: A Meta-Analysis of European Published Surveys. **Foods**, v. 7n. 5, p 61-69, 2018.

GRANDI, A.Z.; PINTO, Y.M.; DESTRO, M.T. Dual-species biofilm of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* on stainless steel surface. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 61, p. 1-9, 2018.

GRAVES, L.M.; HELSEL, L.O.; STEIGERWALT, A.G.; MOREY, R.E.; DANESHVAR, M.I.; ROOF, S.E.; ORSI, R.H.; FORTES, E.D.; MILILLO, S.R.; DEN BAKKER, H.C.; WIEDMANN, M.; SWAMINATHAN, B.; SAUDERS, B.D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1280-1288, 2010.

- GU, G.; OTTESENC, A.; BOLTENA, S.; WANGD, L.; LUOA, Y.; RIDEOUTB, S.; LYUD, S.; NOUA, X. Impact of routine sanitation on the microbiomes in a fresh produce processing facility. **International Journal of Food Microbiology**, v. 294, p. 31–41, 2019.
- GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Supplement 2003e2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.161 p. 26-29, 2010.
- GUTT, B.; REN, Q.; Hauser-Gerspach, I.; Kardas, P.; Stübinger, S.; Astasov-Frauenhoffer, M.; Waltimo, T. Beneficial oral biofilms as smart bioactive interfaces. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n.107, 2018.
- HADJILOUKA, A.; KOUBOU, V.; PARAMITHIOTIS, S.; MATARAGAS, M.; DROSINOS, E.H. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in strawberries in Greece and performance evaluation of the culture media. **Clinical Research and Trials**, 4(1):1-3, 2018.
- HALATSI, K.; OIKONOMOU, L.; LAMBIRI, M.; MANDILARA, G.; VATOPOULOS, A.; KYRIACOU, A. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdhA*. **FEMS Microbiology Lett**, v. 259, p. 201–207, 2006.
- HALTER, E.L.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 641-647, 2013.
- HAMMAR, M.; ARNQVIST, A.; BIAN, Z.; OLSÉN, A.; NORMARK, S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin-and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, v. 18, n.4, p.661-670, 1995.
- HANCOCK, V.; WITSO, I.L.; KLEMM, P. Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 570-576, 2011.
- HEIR, E.; MØRETRØ, T.; SIMENSEN, A.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 275, p. 46–55, 2018.
- HENRIQUES, A.R.; FRAQUEZA, M.J. Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the ready-to-eat meat-based food products food chain. **Food Science and Technology**, v. 81, p. 180-187, 2017.
- HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D. Species and Serovars of the Genus *Listeria* Isolated from Different Sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 615-620, 2000.

HOSSAIN, M.I.; MIZAN, M.F.R.; ASHRAFUDOULLA, M.; NAHAR, S.; JOO, H.J.; JAHID, I.K.; PARK, S.H.; KIM, K.S.; HÁ, S.D. Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Listeria monocytogenes* biofilm on lettuce, stainless-steel surfaces, and MBEC™ biofilm device. **LWT - Food Science and Technology**, v. 118, n. 108864, p.1-9, 2020.

IBUSQUIZA, P.S.; HERRERA, J.J.R.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M.L. Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. **Food Control**, v. 25, p. 202-210, 2012.

IGLESIAS, M.A.; KRONING, I.S.; DECOL, L.T.; DE MELO FRANCO, B.D.G., SILVA, W.P.D. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Research International**, v. 100, p.96-101, 2017.

INIGUEZ-MORENO, M.; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M.; GUERRERO-MEDINA, P.J.; AVILA-NOVOA, M.G. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 310–319, 2018.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P.; WEILL, F.X. Supplement 2008e2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.165, p. 526-530, 2014.

JAMALI, H. RADMEHR, B. THONG, K. L. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. **Food Control**, v. 34, p. 121-125, 2013.

JARVIS, N.A.; O'BRYAN, C.A.; DAWOUD, T.M.; PARK, S.H.; KWON, Y.M.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. An overview of *Salmonella* thermal destruction during food processing and preparation. **Food Control**, v. 68, p. 280-290, 2016.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOHNSON, J.; JINNEMAN, K.; STELMA, G.; SMITH, G.; LYE, D.; MESSER, J.; ULASZEK, J.; EVSEN, L.; GENDEL, S.; BENNETT, W.; SWAMINATHAN, B.; PRUCKLER, J.; STEIGERWALT, A.; KATHARIOU, S.; YILDORIM, S.; VOLOKHOV, D.; RASOOLY, A.; CHIZHIKOV, V.; WIEDMANN, M.; FORTES, E.; DUVALL, R.E.; HITCHINS, A.D. Natural Atypical *Listeria innocua* Strains with *Listeria monocytogenes* Pathogenicity Island 1 Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p. 4256-4266, 2004.

JONAS, K.; TOMENIUS, H.; KADER, A.; NORMARK, S.; RÖMLING, U.; BELOVA, L.M.; MELEFORS, O. Roles of curli, cellulose and *BapA* in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 70, p. 1-9, 2007.

JONES, S.E.; VERSALOVIC, J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 35, p. 1-9, 2009.

JU, X.; JUNJIE LI, J.; MENGJIAO ZHU, M.; LU, Z.; LV, F.; ZHU, X.; BIE, X. Effect of the *luxS* gene on biofilm formation and antibiotic resistance by *Salmonella* serovar Dublin. **Food Research International**, v. 107, p. 385–393, 2018.

KADAM, S. R.; BESTEN, H. M.W.; VEEN, S. V. D.; ZWIETERING, M. H.; MOEZELAAR, R. T.; ABEE, T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.165, p. 259–264, 2013.

KANKI, M.; NARUSE, H.; KAWATSU, K. Comparison of listeriolysin O and phospholipases *PlcA* and *PlcB* activities, and initial intracellular growth capability among food clinical strains of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 899-909, 2018.

KARAVOLOS, M.H.; BULMER, D.M.; WINZER, K.; WILSON, M.; MASTROENI, P.; WILLIAMS, P.; KHAN, M.A. *LuxS* affects flagellar phase variation independently of quorum sensing in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, v.190, n.2, p. 769-771, 2008.

KEERSMAECKER, S.C.J.; VARSZEGI, C.; BOXEL, N.V.; HABEL, L.W.; METZGER, K.; DANIELS, R.; MARCHAL, K.; VOS, D.; VANDERLEYDEN, J. Chemical Synthesis of (S)-4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione, a bacterial signal molecule precursor, and validation of its activity in *Salmonella* Typhimurium. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n.20, p. 19563-19568, 2005.

KICH, J.D.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N.; NOGUEIRA, M.G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P.M.; CALL, J.E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J.B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n.3, p.307-313, 2011.

KOSTAKI, M.; CHORIANOPOULOS, N.; BRAXOU, E.; JOHN NYCHAS, G.J. GIAOURIS, E. Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of Sessile Cells of *Listeria monocytogenes* Strains under Monospecies and Dual-Species (with *Salmonella enterica*) Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8 p. 2586–2595, 2012.

KUMAR, L.M.; SAAD, W.Z.; MOHAMAD, R.; RAHIM, R.A. Influence of biofilm-forming lactic acid bacteria against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA S547). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 12, p. 1107–1115, 2017.

LAMAS, A.; REGAL, P.; VAZQUEZ, B.; MIRANDA, J. M.; CEPEDA, A.; FRANCO, C. M. Influence of milk, chicken residues and oxygen levels on biofilm formation on stainless steel, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. **Food Control**, v. 90, p. 1-9, 2018.

- LARSEN, H. E.; SEELIGER, H. P. R. (1966). A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n. In: Proceedings of the Third International Symposium on Listeriosis, p. 35-39, 1994.
- LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P.A.D.; FLECHE-MATÉOS, A.; ROCHE, S.M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2210-2214, 2010.
- LEE, B. H.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. Increased adhesion of *Listeria monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2221, 2017.
- LEMON, K.P.; FREITAG, N. E.; KOLTER, R. The Virulence Regulator *PrfA* Promotes Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 15, p. 3969–3976 2010.
- LEMON, K.P.; HIGGINS, D.E.; KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n.12, p.4418-4424, 2007.
- LI, G.; YAN, C.; XU, Y.; FENG, Y.; WU, Q.; LV, X.; YANG, B.; WANG, X.; XIA, X. Punicalagin inhibits *Salmonella* virulence factors and has anti-quorum-sensing potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.19, p. 6204–6211, 2014.
- LI, R.; DU, W.; YANG, J.; LIU, Z.; YOUSEF, A.E. Control of *Listeria monocytogenes* biofilm by paenibacterin, a natural antimicrobial lipopeptide. **Food Control**, v.84, p. 529-535, 2018.
- LIU, D. Y.; LAWRENCE, M. L.; AUSTIN, F. W.; AINSWORTH, A. J. A multiplex PCR for species - and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 133-140, 2007.
- LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; AINSWORTH, A.J.; AUSTIN, F.W. Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.243, p.373–378, 2005.
- LOTFOLLAHI, L.; CHAHARBALESH, A.; REZAEI, M. A.; HASANI, A. Prevalence, antimicrobial susceptibility and multiplex PCR-serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from humans, foods and livestock in Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 425-429, 2017.
- LUO, Q.; SHANG, J.; FENG, X.; GUO, X.; ZHANG, L.; ZHOU, Q. *PrfA* led to reduced biofilm formation and contributed to altered gene expression patterns in biofilm-forming *Listeria monocytogenes*. **Current Microbiology**, v.67, p. 372-378, 2013.
- LYON, G.J.; MAYVILLE, P.; MUIR, T.W.; NOVICK, R.P. Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, *AgrC*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, n.24, p. 13330-13335, 2000.

MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 517-528, 2009.

MACHADO, S. C. A., PEREIRA, V. L. A., AQUINO, M. H. C., SANTOS, A. F. M., RODRIGUES, D. P., GIOMBELLI, A., NASCIMENTO, E. R. Serotyping and genotyping of *Salmonella* strains isolated from broilers, chicken carcasses before and after chilling, and frozen chicken breasts produced in the states of Mato Grosso do Sul and Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 19, n. 1, p. 135-142, 2017.

MAGALHÃES, R.; FERREIRA, V.; BRANDÃO, T.R.S.; PALENCIA, R. C.; ALMEIDA, G.; TEIXEIRA, P. Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: A focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. **Food Microbiology**, v. 57, p. 103-108, 2016.

MCLANDSBOROUGH, L.; RODRIGUEZ, A.; PÉREZ-CONESA, D.; WEISS, J. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. **Food Biophysics**, v.1, n.2, p. 94-114, 2006.

MERINO, L.; PROCURA, F.; TREJO, F.M.; BUENO, D.J.; GOLOWCZYC, M.A. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, v.119, p. 530-540, 2019a.

MERINO, L.; TREJO, F.M.; DE ANTONI, G.; GOLOWCZYC, M.A. *Lactobacillus* strains inhibit biofilm formation of *Salmonella* sp. isolates from poultry. **Food Research International**, v.123, p. 258-265, 2019b.

MIRANDA, A. L., CORDEIRO, S. M., REIS, J. N., CARDOSO, L. G., & GUIMARAES, A. G. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* spp. isolated from foods and clinical samples in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n.2, p. 1143-1153, 2017.

MOHAMED, R.I.; ABDELMONEM, M. A.; AMIN, H. M. Virulence and antimicrobial susceptibility profile of *Listeria monocytogenes* isolated from frozen vegetables available in the Egyptian market. **African Journal of Microbiology Research**, v. 12, n. 9, p.218-224, 2018.

MORAIS, J.O.; CRUZ, E.A.; PINHEIRO, I.; OLIVEIRA, T.C.M.; ALVARENGA, V.; SANT'ANA, A.; MAGNANI, M. An ordinal logistic regression approach to predict the variability on biofilm formation stages by five *Salmonella* enterica strains on polypropylene and glass surfaces as affected by pH, temperature and NaCl. **Food Microbiology**, v. 83, p. 95-103, 2019.

MORENO, L. Z.; PAIXÃO, R.; GOBBI, D. D. S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. **BioMed Research International**, v.1, n.1, p. 1-12, 2014.

MORIMOTO, Y.V.; MINAMINO, T. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. **Biomolecules**, v.4, p.217-234, 2014.

NOORDHOUT, C.M.; DEVLEESSCHAUWER, B.; ÂNGULO, F.J.; VERBEKE, G.; HAAGSMA, J.; KIRK, M.; HAVELAAR, A. The global burden of listeriosis: A systematic review and meta-analysis. **The lancet Infectious Diseases**, v.14, n.11, p.1073-1082, 2014.

O'NEIL, H.S.; MARQUIS, H. *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. **Infection and Immunity**, v.74, n.12, p. 6675–6681, 2006.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 41, p. 97-106, 2010.

PANDE, V.V.; MCWHORTER, A.R.; CHOUSALKAR, K.K. *Salmonella enterica* isolates from layer farm environments are able to form biofilm on eggshell surfaces. **Biofouling**, v. 32, n.7, p.699-710, 2016.

PANG, X.; YUK, H.G. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the sanitizer sensitivity of *Salmonella* Enteritidis biofilm cells in chicken juice. **Food Control**, v. 86, p. 59-65, 2018.

PANG, X.; YUK, H.G. Effects of the colonization sequence of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on survival of biofilm cells under food-related stresses and transfer to salmon. **Food Microbiology**, v. 82, p. 142-150, 2019.

PANZENHAGEN, P. H. N.; AGUIAR, W. S.; FRASÃO, B.S.; PEREIRA, V.L.A.; ABREU, D.L.C.; RODRIGUES, D.P.R.; NASCIMENTO, E.R.; AQUINO, M.H.C. Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Control**, v. 61, p. 243-247, 2016.

PAPAIOANNOU, E.; GIAOURIS, E.D.; BERILLIS, P.; BOZIARIS, I.S. Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. **International Journal of Food Microbiology**, v. 267, p. 9-19, 2018.

PEREIRA, A.A.M.; PRESTES, F.S.; SILVA, A.C.M.; NASCIMENTO, M.S. Evaluation of the thermal resistance of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 after long-term blanched peanut kernel storage. **LWT - Food Science and Technology**, v.117, n.108701, p.1-5, 2020.

PERIN, A.P.; MARTINS, B.T.F.; BARREIROS, M.A.B.; YAMATOOGI, R.S.; NERO, L.A.; BERSOT, L.S. Occurrence, quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* sp. isolated from chicken meat in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.4, p.1-11, 2019.

PIERCEY, M. J.; HINGSTON, P. A.; HANSEN, L. T. Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 223, p. 63–74, 2016.

PIETA, L.; GARCIA, F. B.; RIBOLDI, G.P.; OLIVEIRA, L.A.; FRAZZON, A.P.G.; FRAZZON, J. Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation, stress-response, and virulence in *Listeria monocytogenes* strains grown at different temperatures. **Annals of Microbiology**, v. 64, n.4. p. 1707-1014, 2014.

PILCHOVÁ, T.; HERNOULD, M.; PRÉVOST, H.; DEMNEROVÁ, K.; PAZLAROVÁ, J.; TRESSE, O. Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 35, p. 366-372, 2014.

PIRIE, J. H. The Genus *Listerella* Pirie. **Science**, v. 91, p. 383, 1940.

POIMENIDOU, S.V.; DALMASSO, M.; PAPADIMITRIOU, K.; SKANDAMIS, P.N.; JORDAN, K. Virulence Gene Sequencing Highlights Similarities and Differences in Sequences in *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains of Clinical and Food Origin From 3 Different Geographic Locations. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n.1103, p.1-15, 2018.

REIS-TEIXEIRA, F.B.; ALVES, V.F.; DE MARTINIS, E.C.P. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 48, p. 587-591, 2017.

RIEDEL, C.U.; MONK, I.R.; CASEY, P.G.; WAIDMANN, M.S.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. *AgrD*-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v.71, n.5, p. 1177–1189, 2009.

RIEU, A.; WEIDMANN, S.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. *Agr* system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6125-6133, 2007.

RISTORI, C. A.; ROWLANDS, R. E. G.; MARTINS, C. G.; BARBOSA, M. L.; DOS SANTOS, L. F.; JAKABI, M.; DE MELO FRANCO, B. D. G. Assessment of consumer exposure to *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in meat products at retail in the city of São Paulo, Brazil. **Foodborne pathogens and disease**, v.14, n. 8, p. 447-453, 2017.

ROCHA, C.E.; MOL, J.P.S.; GARCIA, L.N.N.; COSTA, L.F.; SANTOS, R.L.; PAIXÃO, T.A. Comparative experimental infection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in bovine trophoblasts. **Plos One**, v.12, n.5, p. 1-13, 2017.

ROCOURT, J.; GRIMONT, P. A. D. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, p. 866-869, 1983.

RØDER, H.L.; RAGHUPATHI, P.K.; HERSCHEND, J.; BREJNROD, A.; KNØCHEL, S.; SØRENSEN, S.J.; BURMØLLE, M. Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. **Food Microbiology**, v. 51, p. 18-24, 2015.

- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P.; CABO, M.L. Tolerance development in *Listeria monocytogenes*-*Escherichia coli* dual-species biofilms after sublethal exposures to pronase-benzalkonium chloride combined treatments. **Food Microbiology**, v. 67, p. 58-66, 2017.
- ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; ZHRINGER, U.; MACK, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, p. 103-111, 2010.
- ROMLING, U.; ROHDE, M. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella* Typhimurium on the community level. **FEMS Microbiology Letters**, v.180, p.91-102, 1999.
- RUBINI, S.; GALLETI, G.; D'INCAU, M.; GOVONI, G.; BOSCHETTI, L.; BERARDELLI, C.; BARBIERI, S.; MERIALDI, G.; FORMAGLIO, A.; GUIDI, E.; BERGAMINI, M.; PIVA, S.; SERRAINO, A.; GIACOMETTI, F. Occurrence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in bivalve molluscs and associations with *Escherichia coli* in molluscs and faecal coliforms in seawater. **Food Control**, v. 84 p. 429-435, 2018.
- SANTOS, R.R.; XAVIER, R.G.C.; OLIVEIRA, T.F.; LEITE, R.C.; FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Occurrence, genetic diversity, and control of *Salmonella enterica* in native Brazilian farmed fish. **Aquaculture**, v.501, p.304–312, 2019.
- SCHAEFER, A.L.; VALT, D.L.; HANZELKA, B.L.; CRONAN, J.E.; GREENBERG, P. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: Acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p.9505-9509, 1996.
- SCHAUDER, S.; SHOKAT, K.; SURETTE, M.G.; BASSLER, B.L. The *LuxS* family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. **Molecular Microbiology**, v.41, n.2, p.463-476, 2001.
- SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.2, 2003.
- SEELIGER, H. P. R. Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977). **Zentralbl Bakteriol Hyg** v. 249, p. 487-493, 1981.
- SEELIGER, H. P. R.; ROCOURT, J.; SCHRETTENBRUNNER, A.; GRIMONT, P. A. D.; JONES, D. *Listeria ivanovii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 34, p. 336-337, 1984.
- SELA, S.; FRANK, S.; BELAUSOV, E.; PINTO, R. A mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.8, p. 5653-5658, 2006.
- SENEVIRATNE, G.; JAYASEKARA, A.P.D.A.; DE SILVA, M.S.D.L.; ABEYSEKERA, U.P. Developed microbial biofilms can restore deteriorated conventional agricultural soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p.1059-1062, 2011.

SERENO, M.J.; VIANA, C.; PEGORARO, K.; DA SILVA, D. A. L.; YAMATOGLI, R. S.; NERO, L. A.; BERSOT, L. S. Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistente *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil. **Food Microbiology**, v. 84, n. 103234, 2019.

SHEEHAN, B.; KLARSFELD, A.; MSADEK, T.; COSSART, P. Differential activation of virulence gene expression by *PrfA*, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.2, p. 6469-6476, 1995.

SILVA, S.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R.; AZEVEDO, J. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 7, p. 1379-1385, 2008.

SIVASANKAR, C.; JHA, N.K.; GHOSH, R.; SHETTY, P.H. Anti quorum sensing and anti virulence activity of tannic acid and it's potential to breach resistance in *Salmonella enterica* Typhi/Paratyphi A clinical isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, n. 103813, p. 1-12, 2020.

SLEATER, R.D.; GAHAN, C.G.M; HILL, C. A Postgenomic Appraisal of Osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p. 1-9, 2003.

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; JARVIS, B.; NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Bacteria-host communication: The language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.15, p.8951-8956, 2003.

TAMBER, S. Population-wide survey of *Salmonella enterica* response to high-pressure processing reveals a diversity of responses and tolerance mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 1-12, 2018.

TSAI, M.H.; LIANG, Y.H.; CHEN, C.L.; CHIU, C.H. Characterization of *Salmonella* resistance to bile during biofilm formation. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.1, n.1, p. 1-7, 2019.

VAN HOUTT, R.; MOCHIELS, C.W.; Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1117–1131, 2010.

VÁZQUEZ, E. G.; TORRES, A. H.; MARTÍNEZ, J. A. H.; GÓMEZ, J. G. Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia*. **Medicine (Spain)**, v. 11, n. 56, p. 3322–3326, 2014.

VAZQUEZ-ARMENTA, F.J.; HERNANDEZ-OÑATE, M.A.; MARTINEZ-TELLEZ, M.A.; LOPEZ-ZAVALA, A.A.; GONZALEZ-AGUILAR, G.A.; GUTIERREZ-PACHECO, M.M.; AYALA-ZAVALA, J.F. Quercetin repressed the stress response factor (*sigB*) and virulence genes (*prfA*, *actA*, *inlA*, and *inlC*), lower the adhesion, and biofilm development of *L. monocytogenes*. **Food Microbiology**, v.87, n.103377, p. 1-10, 2020.

VERMA, P.; SAHARAN, V. V.; NIMESH, S.; SINGH, A. P. Phenotypic and virulence traits of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated from vegetables and fruits from India. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 270-281, 2018.

- VIANA, C.; SERENO, M.J.; PEGORARO, K.; YAMATOI, R. S.; CALL, D.R.; BERSOT, L. S.; NERO, L. A.; Distribution, diversity, virulence genotypes and antibiotic resistance for *Salmonella* isolated from a Brazilian pork production chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 310, n. 108310, 2019.
- WALTERS, M.; SIRCILI, M.P.; SPERANDIO, V. AI-3 synthesis is not dependent on *luxS* in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.16, p.5668-5681, 2006.
- WANG, H.; DING, S.; WANG, G.; XU, X.; ZHOU, G. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 293–302, 2013a.
- WANG, H.; DONG, Y.; WANG, G.; XU, X.; ZHOU, G. Effect of growth media on gene expression levels in *Salmonella* Typhimurium biofilm formed on stainless steel surface. **Food Control**, v. 59, p. 546-552, 2016.
- WANG, R.; KALCHAYANAND, N.; SCHMIDT, J.W.; HARHAY, D.M. Mixed biofilm formation by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium enhanced bacterial resistance to sanitization due to extracellular polymeric substances. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 9, p. 1513-1522, 2013b.
- WELLER, D.; ANDRUS, A.; WIEDMANN, M.; den BAKKER, H.C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 286-292, 2015.
- WHITE, A.P.; GIBSON, D.L.; COLLINSON, S.K.; BANSER, P.A.; KAY, W.W. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.18, p. 5398-5407, 2003.
- XAVIER, K.B.; BASSLER, B.L. *LuxS* quorum sensing: more than just a numbers game. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p.191–197, 2003.
- YANG, Y.; LI, J.; YIN, Y.; GUO, D.; JIN, T.; GUAN, N.; SHI, Y.; XU, Y.; LIANG, S.; XIA, X.; SHI, C. Antibiofilm activity of coenzyme Q0 against *Salmonella* Typhimurium and its effect on adhesion–invasion and survival–replication. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, p. 8545–8557, 2019.
- ZENG, Y.B.; XIONG, L.G.; TAN, M.F.; LI, H.Q.; YAN, H.; ZHANG, L.; YIN, D.F.; KANG, Z.F.; WEI, Q.P.; LUO, L.G. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* in Pork, Chicken, and Duck from Retail Markets of China. **Foodborne Pathogens And Disease**, v.16, n.5, p.1-7, 2019
- ZETZMANN, M.; BUCUR, F.I.; CRAUWELS, P.; BORDA, D.; NICOLAU, A.I.; GRIGORE-GURGU, L.; SEIBOLD, G.M.; RIEDEL, C.U. Characterization of the biofilm phenotype of a *Listeria monocytogenes* mutant deficient in agr peptide sensing. **Microbiology Open**, v.8, n.826, p. 1-9, 2019.

ZETZMANN, M.; SÁNCHEZ-KOPPER, A.; WAIDMANN, M. S.; BLOMBACH, B.; RIEDEL, C. U. Identification of the agr Peptide of *Listeria monocytogenes*. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n. 989, p 1-11, 2016.

ZHANG, H.; HUB, Y.; ZHOU, C.; YANG, Z.; WU, L.; ZHUA, M. BAO, H.; ZHOU, Y.; PANG, M.; WANG, R.; ZHOU, X. Stress resistance, motility and biofilm formation mediated by a 25kb plasmid pLMSZ08 in *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 94, p. 345–352, 2018.

ZHANG, H.; ZHOU, W.; ZHANG, W.; YANG, A.; LIU, Y.; JIANG, Y.; HUANG, S.; SU, J. Inhibitory effects of citral, cinnamaldehyde, and tea polyphenols on mixed biofilm formation by foodborne *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Food Protection**, v.77, n.6, p.927–933, 2014.

ZHOU, Q.; FENG, F.; WANG, L.; FENG, X.; YIN, X.; LUO, Q. Virulence regulator *prfA* is essential for biofilm formation in *Listeria monocytogenes* but not in *Listeria innocua*. **Current Microbiology**, v.63, p. 186–192, 2011.

ZWE, Y. H.; TANG, V. C. Y.; AUNG, K. T.; GUTIÉRREZ, R. A.; NG, L. C.; YUK, H-G. Prevalence, sequence types, antibiotic resistance and, *gyrA* mutations of *Salmonella* isolated from retail fresh chicken meat in Singapore. **Food Control**, v. 90, p. 233-240, 2018.

APÊNDICE

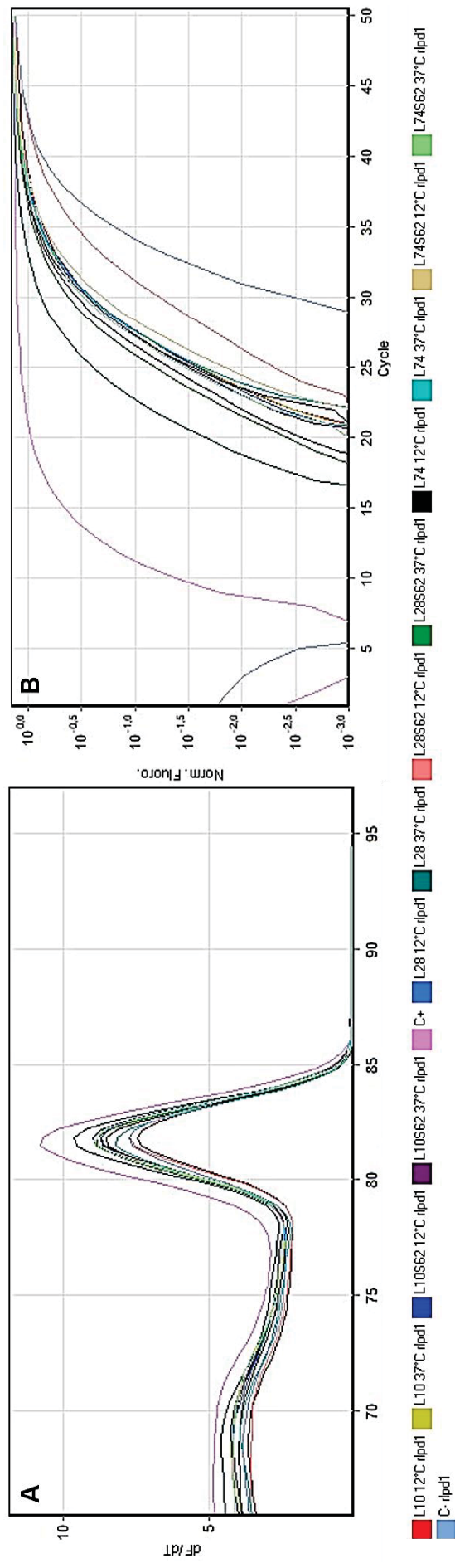
TABELA 1: DINÂMICA DE CRESCIMENTO PLANCTÔNICO (Log UFC/mL) E SÉSSIL (Log UFC/cm²) DE *L. monocytogenes* E *S. TYPHIMURIUM* EM RELAÇÃO A POPULAÇÃO TOTAL DOS BIOFILMES PUROS E MISTOS A 12 °C E 37 °C.

Ensaio	Temperatura	Tempo de contato			
		1 h	24 h	96 h	120 h
Sésseis					
<i>Listeria</i>	12 °C	3,67 ^f	3,87 ^{ef}	4,96 ^{bc}	4,53 ^d
<i>Salmonella</i>	12 °C	3,81 ^{ef}	3,96 ^{ef}	5,01 ^{bc}	4,88 ^{bcd}
<i>Listeria+ Salmonella</i>	12 °C	3,72 ^f	4,16 ^e	5,10 ^b	4,69 ^{cd}
<i>Listeria</i>	37 °C	3,67 ^f	4,85 ^{bcd}	4,15 ^e	4,09 ^e
<i>Salmonella</i>	37 °C	4,84 ^{bcd}	5,80 ^a	5,50 ^a	4,74 ^{bcd}
<i>Listeria+ Salmonella</i>	37 °C	4,18 ^e	5,47 ^a	4,79 ^{bcd}	4,16 ^e
Planctônicas					
<i>Listeria</i>	12 °C	8,16 ^{hi}	8,83 ^{fg}	9,48 ^{bcde}	9,37 ^{cde}
<i>Salmonella</i>	12 °C	7,53 ^j	8,82 ^{fg}	9,75 ^{ab}	9,83 ^{ab}
<i>Listeria+ Salmonella</i>	12 °C	7,90 ^{ij}	8,67 ^g	9,74 ^{ab}	9,91 ^a
<i>Listeria</i>	37 °C	8,23 ^h	9,28 ^{de}	8,60 ^g	8,79 ^{fg}
<i>Salmonella</i>	37 °C	8,03 ^{hij}	9,64 ^{abcd}	9,71 ^{abc}	9,11 ^{ef}
<i>Listeria+ Salmonella</i>	37 °C	7,93 ^{ij}	9,47 ^{bcde}	9,24 ^{de}	9,22 ^{de}

Letras subscritas diferentes demonstram diferença estatística ($p < 0,001$).

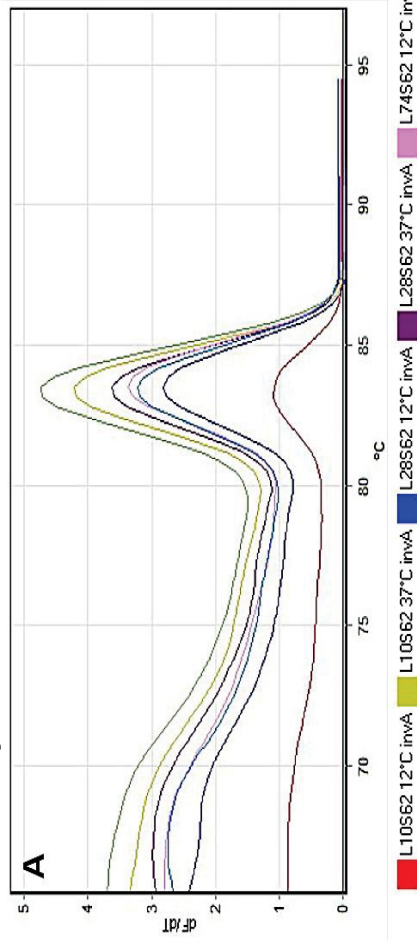
FIGURA 1: CURVAS DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE EXPRESSÕES GÊNICAS DOS GENES *rlpd1*, *invA*, *prfA*, *flaA*, *luxS*, *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD* EM BIOFILMES PUROS DE *L. monocytogenes* e MISTOS COM *S. TYPHIMURIUM* A 12 °C e 37 °C.

rlpd1 – Presença

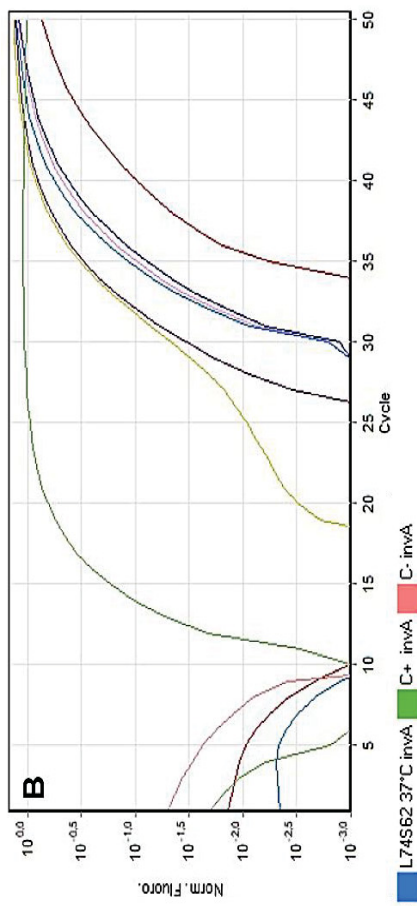


A: Temperatura de anelamento (°C); B: Números de ciclos de repetição.

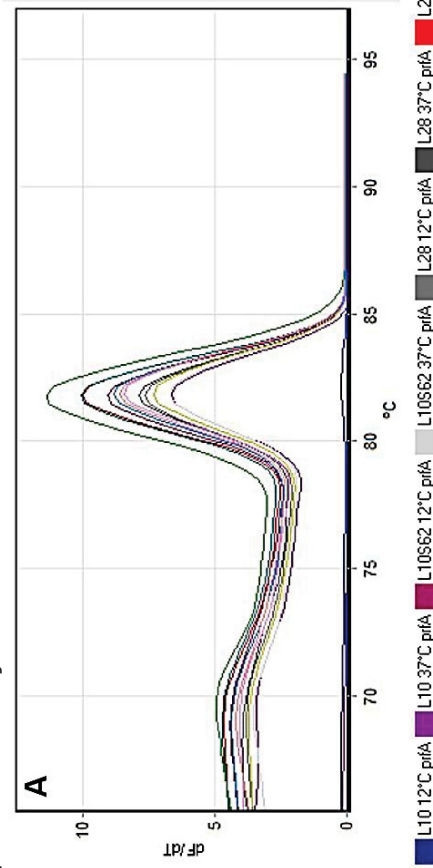
invA – Presença



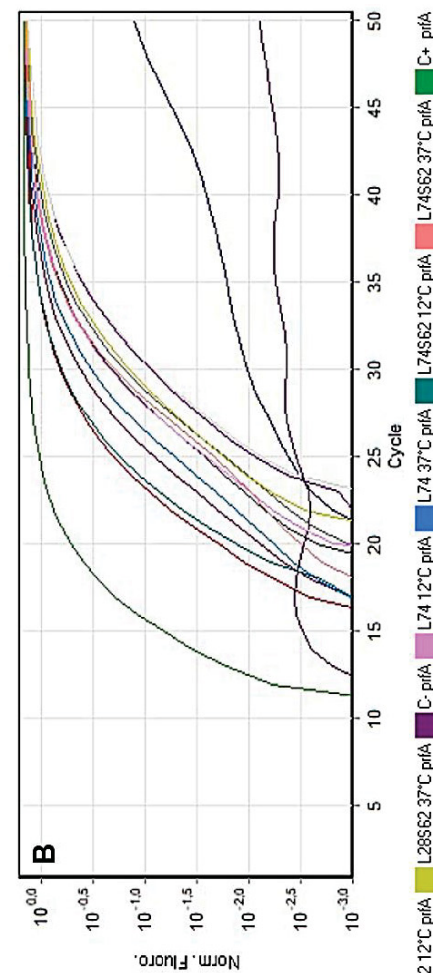
A: Temperatura de anelamento (°C); B: Números de ciclos de repetição.



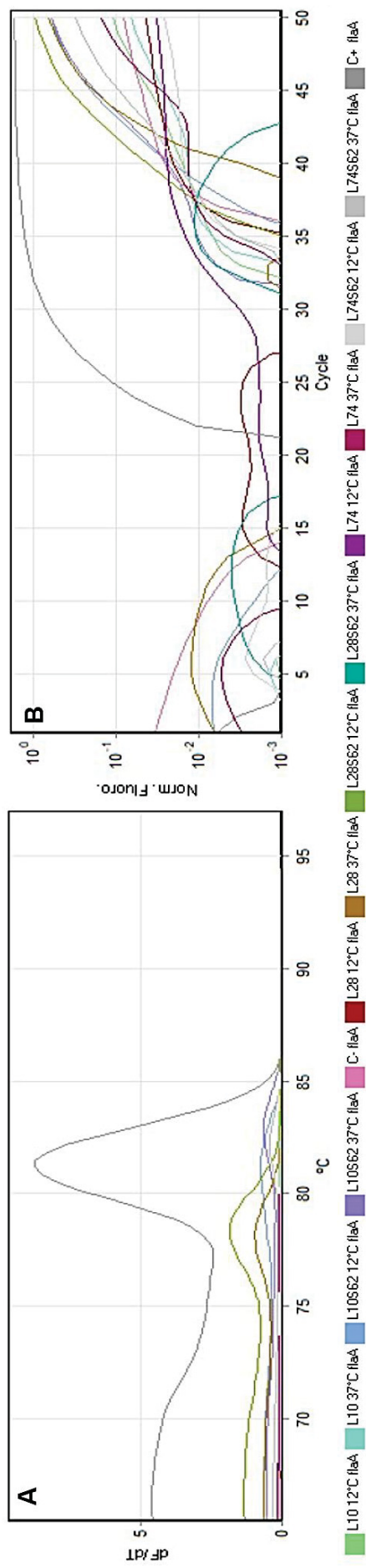
prfA – Presença



A: Temperatura de anelamento (°C); B: Números de ciclos de repetição.

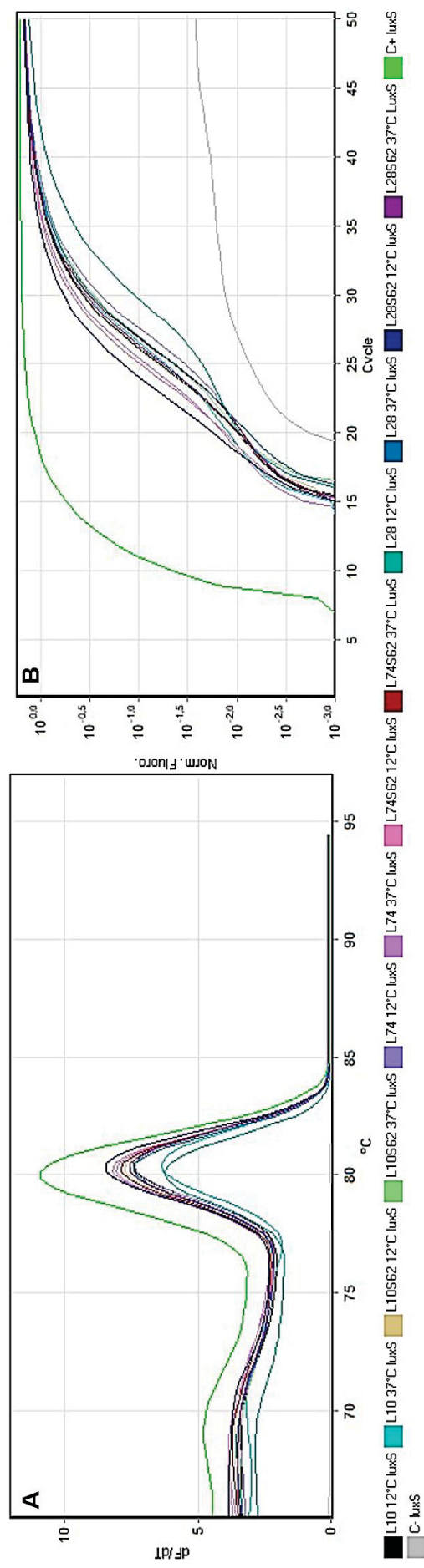


flaA – Ausência



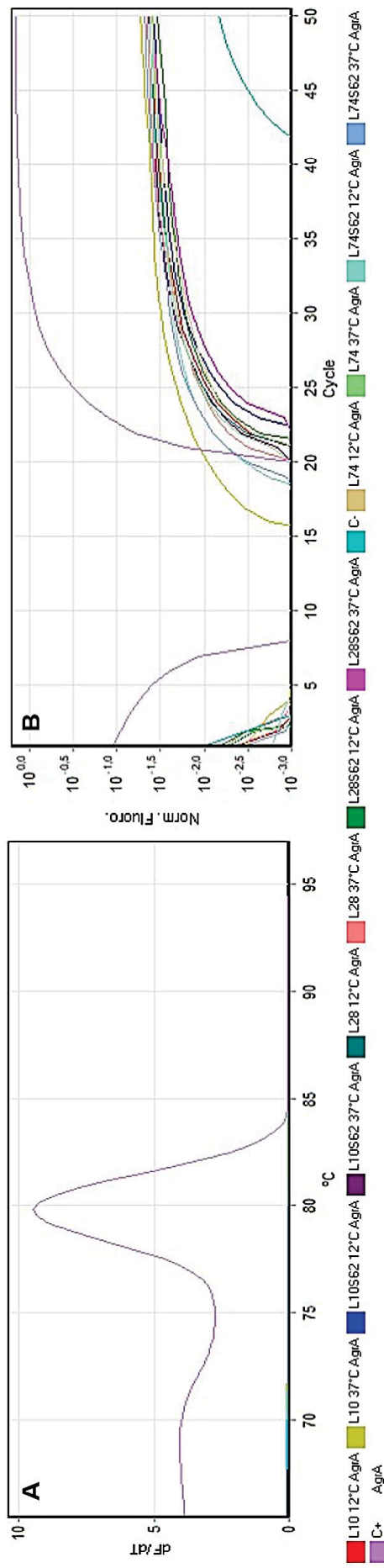
A: Temperatura de anelamento (°C); B: Números de ciclos de repetição.

luxS – Ausência



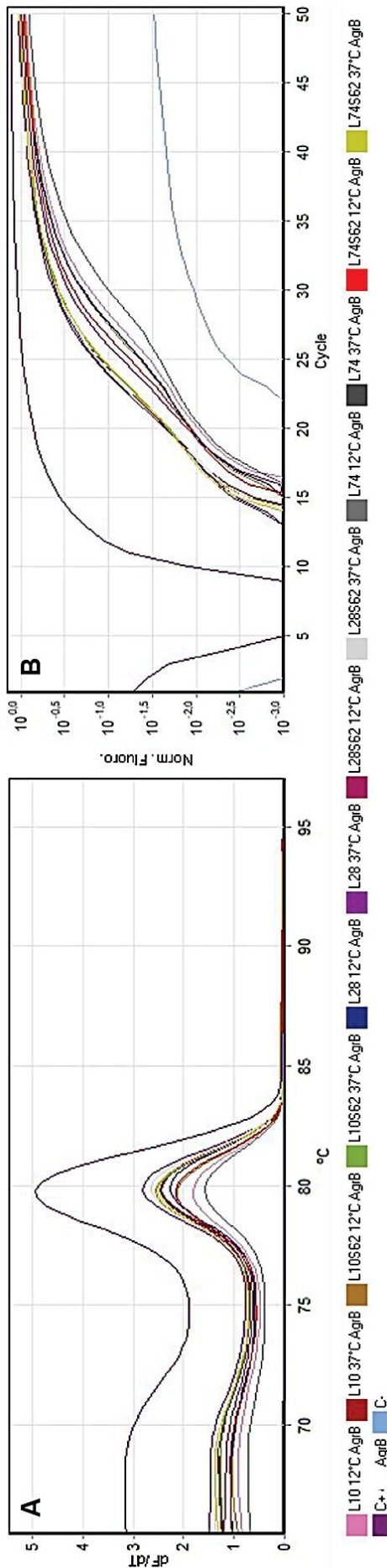
A: Temperatura de anelamento (°C); B: Números de ciclos de repetição.

agrA – Presença



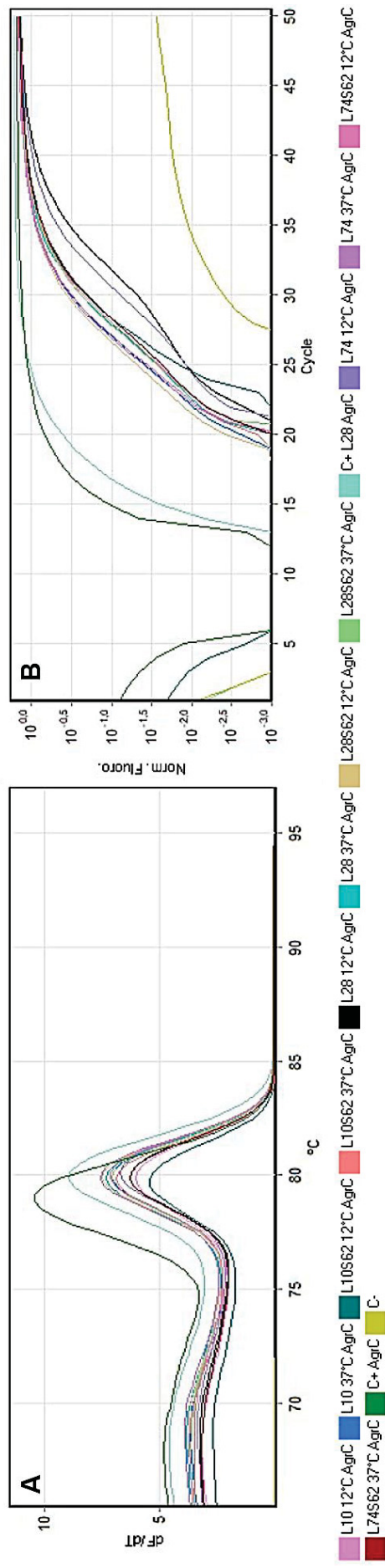
A: Temperatura de anelamento (°C); B: Números de ciclos de repetição.

agrB – Presença



A: Temperatura de anelamento (°C); B: Números de ciclos de repetição.

agrC – Presença



agrD – Presença

