

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Daniel Leirias Caurio

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ESPÉCIES DE  
*Listeria* sp. ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS**

Porto Alegre

2021



Daniel Leirias Caurio

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ESPÉCIES DE  
*Listeria* sp. ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amanda de Souza Motta

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Caurio, Daniel Leirias

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR  
ESPÉCIES DE *Listeria* sp. ISOLADAS DE AMOSTRAS DE  
ALIMENTOS / Daniel Leirias Caurio. -- 2021.

67 f.

Orientadora: Amanda de Souza Motta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Adesão. 2. *L. monocytogenes*. 3. Inox. 4.  
Polipropileno. 5. Sanitizante. I. Motta, Amanda de  
Souza, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente a Deus, pela proteção, amparo e por iluminar meu caminho nos momentos difíceis da estrada.

À minha família, pelo incentivo e apoio nessa jornada em busca do conhecimento.

À minha orientadora, Professora Amanda de Souza Motta, que me acolheu na UFRGS lá na iniciação científica. Agradeço pela sua disponibilidade em repassar o seu conhecimento, sendo sempre acessível em ajudar. Sou grato pela paciência e pelos conselhos.

Aos professores do PPGMAA, por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional.

Aos colegas do Lab. 222C, pela convivência agradável, companheirismo e pelas trocas de conhecimento, durante um período prolongado.

Ao Carlos Augusto Badillo Almeida e a Danieli Quadros da Silva por toda ajuda, força, atenção e especialmente pelo exercício de sorrir com os olhos, nas manhãs de trabalho no laboratório.

À Priscila Jankoski, por todo o apoio e ajuda nesta jornada.

Aos colegas de trabalho que me acompanharam durante este processo de formação, obrigado pela paciência e compreensão.

Aos demais colegas de aula do PPGMAA, pela troca de informações e conhecimentos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e professores, pelo ensino de qualidade e referência.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização do trabalho.

# AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ESPÉCIES DE *Listeria* sp. ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Autor: Daniel Leirias Caurio

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Amanda de Souza Motta

## RESUMO

Nas indústrias de alimentos, a formação de biofilmes resulta em graves problemas. Portanto, o estudo objetivou a identificação de em nível de espécie de 12 isolados de alimentos, fatiados e superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambreteria. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos e analisar a formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em diferentes tempos, temperatura, superfície e matriz alimentar, bem como o cultivo de mono-espécie e associado com *Pseudomonas fluorescens*, assim como avaliação da eficiência de sanitizantes na erradicação de biofilmes. A identificação foi através da técnica de MALDI-TOF/MS, a susceptibilidade a antimicrobianos foi pelo método Kirby-Bauer. A avaliação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* foi em microplaca, o modelo experimental foi baseado na formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em cupons de aço inox e polipropileno. Os cupons foram imersos e mantidos em temperaturas de 37°C nos tempos de 24,48,72 horas em Caldo triptona de soja, acrescido de 0.6 % extrato de levedura (TSBYE) e em matriz alimentar leite integral UHT nas temperaturas de 37°C, temperatura ambiente nos tempos de 24,48 e 72 horas e em refrigeração em tempos de 72,120 e 168 horas. O cultivo associado de *L. monocytogenes* com *P. fluorescens* foi em cupons de aço inox e polipropileno com leite integral UHT em temperatura ambiente e refrigeração. Foram identificadas três espécies, sendo, *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. seeligeri*. Na avaliando a susceptibilidade a antimicrobianos 66,6% foi resistência a pelo menos um dos discos testado. Na análise da formação de biofilme em microplaca verificou-se que três espécies de *L. monocytogenes*, provaram ser forte formador de biofilme. Na avaliação da formação de biofilme de *L. monocytogenes* em cupons de aço inox, a população de células sésseis variou entre 4,29 e 5,41 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e em polipropileno entre 6,21 e 7,03 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> no TSBYE. Também observados adesão celular em matriz alimentar leite integral UHT em cultivo de mono-espécie e cultivo associado de *L. monocytogenes* com *P. fluorescens*. Na análise dos sanitizantes o ácido peracético e hipoclorito de sódio demonstram eficiência na erradicação de células sésseis em cupons de aço inox. Portanto, os isolados de *Listeria* sp. mostraram-se como persistentes, formadores de biofilme e resistente a clindamicina e a sulfazotrim podendo representar risco para os consumidores.

**PALAVRAS-CHAVE:** adesão; *L. monocytogenes*; inox; polipropileno; fiambreteria

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (67 p) julho, 2021.

# EVALUATION OF BIOFILM FORMATION POTENTIAL BY SPECIES OF *Listeria* sp. ISOLATED FROM FOOD SAMPLES

Author: Daniel Leirias Caurio

Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amanda de Souza Motta

## ABSTRACT

In the food industries, the formation of biofilms results in serious problems. Therefore, the study aimed to identify the species-level identification of 12 food isolates, sliced and food handling surfaces in ham labs. Evaluation of antimicrobial susceptibility and analysis of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* at different times, temperature, surface and food matrix, as well as mono-species cultivation and associated with *Pseudomonas fluorescens*, as well as evaluation of the efficiency of sanitizers in eradicating biofilms. The identification was through the MALDI-TOF/MS technique, the susceptibility to antimicrobials was through the Kirby-Bauer method. The in vitro biofilm formation capacity was evaluated on a microplate; the experimental model was based on the formation of *L. monocytogenes* biofilms on stainless steel and polypropylene coupons. The coupons were immersed and kept at temperatures of 37° C for 24, 48, 72 hours in tryptone soy broth, plus 0.6% yeast extract (TSBYE) and in UHT whole milk food matrix at temperatures of 37° C, room temperature in times of 24,48 and 72 hours and in refrigeration times of 72,120 and 168 hours. The associated cultivation of *L. monocytogenes* with *P. fluorescens* was in stainless steel and polypropylene coupons with UHT whole milk at room temperature and refrigeration. Three species were identified, namely, *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. seeligeri*. In evaluating the antimicrobial susceptibility, 66.6% was resistance to at least one of the discs tested. In the analysis of biofilm formation on microplate it was found that three species of *L. monocytogenes* proved to be strong biofilm former. In evaluating the biofilm formation of *L. monocytogenes* in stainless steel coupons, the sessile cell population ranged between 4.29 and 5.41 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> and in polypropylene between 6.21 and 7.03 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> in the TSBYE. Cell adhesion in UHT whole milk food matrix was also observed in mono-species cultivation and associated cultivation of *L. monocytogenes* with *P. fluorescens*. In the analysis of sanitizers, peracetic acid and sodium hypochlorite demonstrate efficiency in the eradication of sessile cells in stainless steel coupons. Therefore, *Listeria* sp. they were shown to be persistent, biofilm formers and resistant to clindamycin and sulfazotrim, which may represent a risk to consumers.

KEYWORDS: adherence; *L. monocytogenes*; stainless; polypropylene; cold cuts

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (67 p) July, 2021.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
3.1 Listeriose.....	4
3.2 Gênero <i>Listeria</i> sp.....	6
3.2.1 Espécie <i>Listeria monocytogenes</i> .....	7
3.3 Fatores de virulência da <i>Listeria monocytogenes</i> .....	9
3.4 Impacto de <i>Listeria</i> sp. na indústria de alimentos.....	10
3.5 Controle de <i>Listeria</i> sp. na Indústria de leite e derivados.....	11
3.6 Biofilmes microbianos e a <i>Listeria</i> sp.....	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1 Linhagens de <i>Listeria</i> sp. e condições de cultivo.....	16
4.2 Identificação das bactérias por MALDI-TOF/MS.....	16
4.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	16
4.4 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes pelo método da microplaca.....	17
4.5 Preparo dos cupons de aço inox e polipropileno para avaliação de biofilme.....	18
4.6 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em meio de cultura TSBYE.....	18
4.7 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em substrato leite UHT integral.....	19
4.8 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em substrato Leite Integral UHT com duas espécies bacterianas.....	19
4.9 Avaliação do sanitizante na erradicação do biofilme em aço inox.....	20
4.10 Análises estatísticas.....	21
<b>5. RESULTADOS</b> .....	22
5.1 Identificação das espécies de <i>Listeria</i> sp.....	22
5.2 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	23
5.3 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes pelo método da microplaca.....	24
5.4 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em TSBYE.....	24



5.5	Avaliação da capacidade de formação de biofilmes por <i>Listeria monocytogenes</i> QF Oxford em aço inox e polipropileno em substrato leite UHT a 37 ° C, ambiente e refrigeração.....	29
5.6	Avaliação da capacidade de formação de biofilmes por <i>L. monocytogenes</i> QF Oxford associada a <i>P. fluorescens</i> PL7.1 em aço inox e polipropileno em substrato leite Integral UHT em diferentes temperaturas.....	35
5.7	Avaliação do sanitizante na erradicação do biofilme em aço inox.....	39
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>68</b>
	Artigo.....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Listeria</i> sp. identificadas em MALDI-TOF/MS com seu código e origens com as respectivas classificações quanto ao potencial de formação de biofilme em microplaca.....	23
Tabela 2 - Resultados da avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos em <i>Listeria</i> sp.....	24

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estágios da formação e desenvolvimento do biofilme bacteriano. Estágio 1: adesão bacteriana reversível, estágio 2: adesão irreversível, estágio 3: início da maturação, estágio 4: maturação completa, estágio 5: deslocamento do biofilme maduro para novas colonizações bacterianas.....14
- Figura 2 - Avaliação de capacidade de formação de biofilme das bactérias *L. monocytogenes* 4B, *L. monocytogenes* ATCC35152 e *L. monocytogenes* QF Oxford, em aço inox (A) e polipropileno (B), com meio de cultura TSBYE à temperatura de 37°C por 24, 48 e 72 horas.....27
- Figura 3 - Avaliação de capacidade de formação de biofilme das bactérias *L. monocytogenes* 4B, *L. monocytogenes* ATCC 35152 e *L. monocytogenes* QF Oxford, em aço inox (A) e polipropileno (B), com meio de cultura TSBYE à temperatura de 37 °C, por 24, 48 e 72 horas.....28
- Figura 4 - Avaliação de capacidade de formação de biofilme do isolado *L. monocytogenes* QF Oxford, em aço inox em meio de cultura TSBYE (A), polipropileno em meio de cultura TSBYE (B), aço inox em leite UHT (C), polipropileno em leite UHT(D) à temperatura de 37 ° C por 24, 48 e 72 horas.....30
- Figura 5 - Avaliação de capacidade de formação de biofilme do isolado *L. monocytogenes* QF Oxford, em aço inox (A, C, E) e Polipropileno (B, D, F) em substrato em leite UHT em temperatura de 37 °C (A, B), temperatura ambiente (C, D) por 24, 48 e 72 horas e temperatura de refrigeração (E, F) por 72,120,168 horas.....33
- Figura 6 - Avaliação de capacidade de formação de biofilme do isolado *L. monocytogenes* QF Oxford, em aço inox (A) e Polipropileno (B) em substrato em leite UHT em temperatura de 37 °C, temperatura ambiente e temperatura de refrigeração por 72 horas.....34
- Figura 7 - Avaliação de capacidade de formação de biofilme com associação de *L. monocytogenes* QF Oxford, e *P. fluorescens* PL7.1 em aço inox (A) e Polipropileno (B)

em substrato em leite UHT em temperatura ambiente (A, B) em 24,48,72 horas e temperatura de refrigeração 72,120,168 horas (C, D) .....	37
Figura 8 - Avaliação de capacidade de formação de biofilme com associação de <i>L. monocytogenes</i> QF Oxford, e <i>P. fluorescens</i> PL7.1 em aço inox (A) e Polipropileno (B) em substrato em leite UHT em temperatura ambiente e refrigeração 72 em horas.....	39
Figura 9 - Figura 9. Avaliação da ação dos sanitizante (C) ácido peracético (0,2%) e hipoclorito de sódio (% 2,0 – 2,5 p/p) por 10 minutos sobre as células aderida e biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> QF Oxford (A), e <i>P. fluorescens</i> PL7.1 (B) em aço inox em 72horas a temperatura ambiente com substrato leite integral UHT.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
BHI	Infusão Cérebro Coração
D.O	Densidade Óptica
dH <sub>2</sub> O	Água destilada
EPS	Exopolissacarídeo
FF	Fortes formadores de biofilme
FRA	Fracos formadores de biofilme
g	Gramas
GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MF	Moderados formadores de biofilmes
mg	Miligrama
MH	Mueller Hinton
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de Sódio
NF	Não formadores de biofilme
nm	Nanômetros
°C	Grau Centígrado
PC	Ponto de corte
T0	Tempo zero
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo Triptona de Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UHT	Temperatura Ultra Alta
UI	Unidade Internacional
µg	Micrograma
<	Menor
>	Maior

## 1. INTRODUÇÃO

A *Listeria* sp. é uma bactéria amplamente encontrada no ambiente, e importante no aspecto sanitário, devido à patogenicidade da espécie *L. monocytogenes*. A ocorrência é geralmente em alimentos de origem animal, especialmente em carnes, leite e derivados. O consumo de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* pode causar a infecção chamada Listeriose. Esta doença é relatada em casos de forma isolada ou em surtos, sendo que as infecções em animais são predominantemente de natureza subclínica. No entanto, em humanos as formas graves são descritas especialmente em populações consideradas grupos de risco.

As superfícies dos equipamentos usados para manipulação, armazenamento ou processamento de alimentos são conhecidas como uma importante fonte de contaminação microbiana. Estudos anteriores sugeriram que as bactérias têm a capacidade de aderir às superfícies comumente encontradas no ambiente de processamento de alimentos, como polipropileno e aço inox.

Outro problema que vem sendo abordado é a capacidade de algumas espécies de *Listeria* sp. em formar biofilmes. A formação de biofilmes acaba por dificultar a higienização de superfícies, onde nem sempre os desinfetantes conseguem eliminar completamente essas estruturas, o que poderia acarretar na persistência destas bactérias no local.

A adesão desses micro-organismos e subsequente formação de biofilmes em superfícies como aço inox e polipropileno é descrita para diversos gêneros bacterianos, e influenciada pelos fatores ambientais, como a composição do substrato, temperatura e pela presença de uma ou mais espécies bacterianas. Além disso, os micro-organismos que colonizam as superfícies como parte de um biofilme, são mais resistentes a desafios ambientais implicando em maior persistência.

A presença de bactérias psicotróficas, como a *Listeria* sp. em áreas de processamento de alimentos está associada a perdas econômicas. Quando estes micro-organismos produzem biofilmes, impossibilitam a ação completa dos produtos de sanitização, o que acaba por favorecer a recontaminação, que é responsável por reduzir a vida útil dos produtos e colocar em risco a saúde do consumidor.

Diante disto, a partir de linhagens de *Listeria* sp. isoladas de ambiente de processamento de alimentos, buscou-se avaliar a capacidade de adesão destas

bactérias considerando a origem destes isolados. Entender o comportamento dos microorganismos diante de condições normais de processamento poderá alertar para a adoção de medidas mais rigorosas de higienização, considerando que biofilmes microbianos podem ser considerados estruturas de difícil remoção, promovendo a recontaminação de produtos e processos em Laboratórios de Fiambreria, por exemplo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de formação de biofilmes por *Listeria* sp. isoladas de produtos de origem animal e superfícies.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Identificar os micro-organismos em nível de espécies e avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos;

2.2.2 Avaliar capacidade de formação de biofilme pelos isolados de *Listeria* sp. em diferentes superfícies;

2.2.3 Observar a capacidade de formação de biofilme com diferentes substratos e em associação com outro micro-organismo;

2.2.4 Determinar a erradicação do biofilme com substâncias sanitizantes.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Listeriose

A doença produzida por *L. monocytogenes* é a listeriose, que é causada principalmente pela ingestão de alimentos contaminados (Camargo et al., 2017). *Listeria monocytogenes* pode ser subclassificada em 13 sorotipos de acordo com a combinação de antígenos O e H, sendo 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, e 7, os quais, podem causar listeriose (Shamloo et al., 2019). Contudo, os sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b são mais prevalentes, estando intimamente relacionado a surtos de listeriose (Palma et al., 2016; Abdollahzadeh et al., 2016; Bergholz et al., 2018).

Os reservatórios da bactéria é o solo e o trato intestinal de animais assintomáticos, como mamíferos, peixes e crustáceos. Animais infectados podem eliminar *L. monocytogenes* em suas fezes, leite e secreções uterinas. A contaminação do solo resulta na presença desta espécie em plantas e silagem resultando na maioria das recontaminações por ingestão (Kaptchouang et al., 2020).

Surtos de listeriose de origem alimentar relatados, incluíram aqueles induzidos pelo consumo de alimentos, como saladas, produtos à base de carne, presunto cozido, produtos lácteos, como leite, especialmente os produtos fatiados (Andrade et al., 2019; Reis et al., 2020; Szymczak et al., 2020).

Especialmente, a recontaminação de produtos cárneos ocorre durante o fatiamento e embalagem (Pessoa et al., 2020). Um dos maiores surtos de listeriose em todo o mundo foi descrito na África do Sul durante 2017-2018 com 1.060 casos de listeriose, resultando em 216 mortes, envolvendo a carne processada pronta para consumo como fonte principal da infecção (Allam et al., 2018; Kaptchouang et al., 2020). Os produtos lácteos também são fonte importante de listeriose humana, evidenciando a necessidade de medidas específicas de controle deste alimento (Filipello et al., 2020).

Infecções oportunistas causadas por *Listeria monocytogenes* geralmente se manifestam por quadros de septicemia, meninge encefalite ou infecções intestinais. Após ingestão, a bactéria atinge o trato intestinal aderindo e invadindo a mucosa (Saraoui et al., 2016; IDF. 2019).

A dose infecciosa de *L. monocytogenes* é considerada muito baixa, as infecções em indivíduos saudáveis são raras (Buchanan et al., 2017). Contudo uma

simples contaminação ou deficiência de processos que visam à eliminação desse micro-organismo podem ocasionar surtos (Silva et al., 2016).

Com a revisão de estudos na avaliação de risco, Buchanan et al. (2017) relataram que quase todos os casos de listeriose, resultaram do consumo de alimentos com altos números ( $10^6$  UFC) de *L. monocytogenes*. Estas contagens excederam o limite sugerido de ausência em 25 g do alimento pronto para o consumo (ou seja, 0 UFC / 25 g). Contudo a ingestão de baixas doses ( $<10^2$  UFC) do patógeno não se considera infectante, por outro lado não exclui infecção em pessoas com imunidade rebaixada (Notermans et al., 1998; Buchanan et al., 2017; EFSA. 2018).

A condição patológica ocorre principalmente em grupos de risco, como em gestantes, idosos ou indivíduos imunocomprometidos (Beckerleg et al., 2017; Bergholz et al., 2018; IDF. 2019; Nüesch-Inderbinnen et al., 2021; Baba et al., 2021).

Os sintomas variam desde considerados leves, incluindo febre persistente, dores musculares, dor abdominal, náuseas, vômitos e diarreia, sendo os sintomas iniciais nas primeiras 24 horas, evoluindo para os mais graves como meningites (Halbedel et al., 2020; Lima e Araujo, 2020). Uma especial atenção deve ser dada, na listeriose em gestantes, pois se apresenta com sintomas inespecíficos, podendo ser erroneamente diagnosticada e levar a complicações graves (Luo et al., 2019; Rzepniewski et al., 2020).

Um caso de sepse neonatal com listeriose foi relatado por Luo et al. (2019), em um hospital comunitário em Sichuan, na China. Com hemocultura positiva para *Listeria monocytogenes*, foi confirmada a transmissão vertical da infecção e identificada a potencial fonte alimentar da infecção materna por *L. monocytogenes*. Outro relato de caso com infecção neonatal também revelou hemocultura com crescimento de *L. monocytogenes* (Rzepniewski et al., 2020).

A listeriose é uma doença grave, com alta mortalidade, em alguns casos pode possuir um curso diferente de infecção e dificultar o diagnóstico. Nos casos de recém-nascidos, o número de infecções perinatais pode ser maior que os relatados, devido à falta de hemoculturas em caso de abortos espontâneos e natimortos (Rzepniewski et al., 2020).

### 3.2 Gênero *Listeria* sp.

*Listeria* sp. é um bacilo Gram-positivo, não esporulado, anaeróbio facultativo, que possui ótima capacidade de crescimento em temperaturas de 2,5°C à 44°C, em pH entre 6,0 e 8,0 e tolera diferentes concentrações de sal (Skowron et al., 2019). É móvel quando cultivada entre 20 e 25° C, porém é imóvel ou apresenta fraca motilidade a 37°C (Silva et al., 2020). É amplamente distribuída em todo o mundo e são encontradas no solo, água, vegetais, alimentos contaminados e fezes de humanos e animais. O ciclo de contaminação é via fecal-oral principalmente no meio rural pelos ruminantes que desempenham um papel importante na manutenção de *Listeria* sp. no ambiente (Pasonen et al., 2019).

O gênero *Listeria* é constituído por vinte e oito espécies descritas, sendo: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. cossartiae*, *L. costaricensis*, *L. denitrificans*, *L. farberi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. goaensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. immobilis*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. newyorkensis*, *L. portnoyi*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. rustica*, *L. seeligeri*, *L. thailandensis*, *L. valentina*, *L. weihenstephanensis*, *L. welshimeri* (Parte et al., 2020). A *Listeria monocytogenes* representa uma das principais preocupações em alimentos de origem animal, isso devido à sua alta taxa de mortalidade, especialmente para indivíduos imunocomprometidos (Halbedel et al., 2020; Nüesch-Inderbinnen et al., 2021). Bactérias do gênero *Listeria* sp. foram descritas em fazendas leiteiras no Sudão, identificando sete espécies de *Listeria* sp. isoladas de leite, utensílios e outras fontes do ambiente na fazenda, sendo a identificação de *L. welshimeri* com maior frequência. O estudo descreveu ainda a presença das espécies de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi* e *L. murrayi* (El Hag et al., 2021).

Além da *L. monocytogenes*, que é patogênica para animais e humanos, outras espécies como, *L. innocua* foram identificadas em diferentes etapas no processamento de frango no estado de São Paulo - Brasil (De Souza et al., 2020).

Relatos de casos de infecção por *Listeria monocytogenes* associado ao queijo, são apontados em diferentes regiões nos Estados Unidos como descrito por Jackson et al. (2018). Espécies de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* foram relatadas em amostras de alimentos incluído carne, massas, bancadas

e prateleira de amadurecimento de queijo (Rossi et al., 2020). Ainda, espécies de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. welshimeri* já foram descritas por terem sido isoladas de amostra de queijo de hipermercados na Polônia (Skowron et al., 2019).

O estudo conduzido por Pessoa et al. (2020) identificou a presença de *Listeria* sp. em salames tipo Italiano fatiados embalados a vácuo, comercializados em supermercados no município de Recife - PE- Brasil. Os dados descritos alertam para a necessidade de reforçar as medidas de prevenção a contaminação de alimentos contra todas as espécies de *Listeria* sp. Oxaran et al. (2017) relata em seu estudo, que ambientes de laticínios e alimentos derivados de leite, como queijo, apresentaram contaminação com *L. monocytogenes*. Assim sendo a atenção em locais de processamento de alimentos a este micro-organismo deve ser especial, pois dentre algumas peculiaridades que proporcionam a sua ocorrência, destaca-se a sobrevivência e a persistência desta bactéria mesmo em condições adversas, como o mínimo de nutrientes (Pasonen et al., 2019).

### 3.2.1 Espécie *Listeria monocytogenes*

O método tradicional na conservação de alimentos é a refrigeração, porém esse processo acaba por selecionar bactérias psicrófilas. As principais bactérias psicrófilas que contaminam o leite e derivados geralmente consideradas não-patogênicas, como a *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Acinetobacter* sp. (Moretto & Solveig, 2017; Zhang et al., 2019). Entretanto espécies patogênicas como a *Listeria monocytogenes*, estão associadas a surtos após ingestão de alimentos prontos para consumo (Hanson et al., 2019; Halbedel et al., 2020). A *L. monocytogenes* merece a devida atenção devido a sua patogenicidade significativa, considerando as altas taxas de hospitalização (97%) e mortalidade (15,6%) (EFSA, 2019).

A *L. monocytogenes* é dividida em 13 sorotipos, dentre esses, quatro sorotipos 4b, 1/2a, 1/2b e 1/2c são os mais frequentes nos casos clínicos de listeriose em humanos, sendo o último com identificações esporádicas, considerando assim os mais patogênicos em relação as outras espécies do gênero (Braga et al., 2017; Paduro et al., 2020; Raschle et al., 2021). A maior frequência relatado no Brasil é o sorotipo 4b (Camargo et al., 2016; Almeida., et al 2017; Sereno et al., 2019)

Em média, isolados do sorotipos 1/2a tem maior capacidade de formar

biofilme quando comparado com sorotipos 4b. Por outro lado, as sorotipos 4b são mais resistentes aos estresse oxidativo (Huang et al., 2018; Silva et al., 2020). Dos quatro sorotipos citados, quando exposto a processo de dissecação o sorotipo 1/2b é considerado o mais resistente (Zoz et al., 2017). O sorotipo 1/2c é relatado com maior resistência à penicilina (Lotfollahi et al., 2017).

A resistência aos antimicrobianos certamente é um problema no tratamento de pacientes. No caso de *L. monocytogenes* a terapia padrão para infecções graves ainda é baseada em amoxicilina ou ampicilina, frequentemente em combinação com gentamicina. As aminopenicilinas podem ser substituídas por cotrimoxazol, fluoroquinolonas, rifampicina ou linezolida. A eritromicina pode ser usada para listeriose durante a gravidez (Baquero et al., 2020; Yan et al., 2019). A resistência aos antibióticos é causada principalmente pelos elementos genéticos móveis como, plasmídeos e transposons (Lungu et al., 2011; Abdollahzadeh et al., 2016; Maung et al., 2019).

O estudo citado por Skowron et al. (2019) descreve espécie de *L. monocytogenes* isoladas em queijo como sendo resistentes à penicilina e a eritromicina, e ainda isolados de *L. monocytogenes* que contaminaram carne de frango em supermercados na Indonésia apresentaram resistência a sulfametoxazol-trimetoprim e amoxicilinasulbactam (Aksono et al., 2020). Sereno et al. (2019) relatou que todos os isolados de áreas de processamento e abatedouro de suínos no Brasil apresentaram resistência à ampicilina, e quase todos os isolados apresentaram resistência intermediária à clindamicina. Teixeira et al. (2020) avaliou a prevalência de *L. monocytogenes* em carne bovina no Estado do Mato Grosso - Brasil e descreveu baixos níveis de resistência aos principais antibióticos.

A ocorrência de *L. monocytogenes* em ecossistemas fluviais pode contribuir para a disseminação e introdução de espécies clinicamente relevantes para a cadeia alimentar, como descrito por Raschle et al. (2021) em que detectaram a presença de *L. monocytogenes* dos sorotipos 1/2a e 4b em amostras de águas superficiais de rios na Suíça.

Dada a importância deste micro-organismo ser encontrado em uma variedade de alimentos, crus e processados, com capacidade de multiplicação durante o período da estocagem, em produtos como queijos e embutidos (Saraoui et al., 2016; De Souza et al., 2020). Garantir a ausência de bactérias deteriorantes ou

patogênicas em todos os processos de produção de alimentícios é uma tarefa difícil. Contudo, deve ser o objetivo do processo, pois a presença destes micro-organismos em alimentos, principalmente como os derivados de leite é um indicador de práticas de higiene deficientes (Sauders et al., 2016; Jackson et al., 2018). A aplicação das boas práticas de higiene e fabricação assume um papel essencial para o controle da contaminação no ambiente de processamento, em particular da contaminação cruzada entre matérias primas, superfícies de equipamentos e alimentos prontos para consumo (Alonso & Kabuki, 2019).

### 3.3 Fatores de virulência da *Listeria monocytogenes*

As cepas de *L. monocytogenes* são classificadas em linhagens diferentes, com a linhagem I os sorotipos 1/2b e 4b, sendo estes os mais frequentemente associados a casos de listeriose humana (Shamloo et al., 2019). A linhagem II incluindo os sorotipos 1/2a e 1/2c, comumente encontrados em alimentos e ambientes de processamento, e conseqüentemente o mais amplamente difundido (Silva et al., 2020; Alvarez-Molina et al., 2021).

O trabalho que estudou a prevalência de *L. monocytogenes* em alimentos obtidos em lojas de varejo e indústrias alimentícias, apontou os sorotipos 4b e 1/2b como os principais envolvidos em surtos (Braga et al., 2017; Almeida., et al 2017).

Contudo o termo clone “virulento” é utilizado para caracterizar uma linhagem bacteriana dentro da mesma espécie envolvida em surto, ou ainda isolados que estão intimamente relacionadas a uma origem bacteriana. Os clones de *L. monocytogenes* de intensa virulência nominados CC1, estão fortemente associados com produtos lácteos, enquanto clones, CC9 e CC121, estão associados a produtos cárneos (Maury et al., 2019; Raschle et al., 2021).

Os clones hipervirulentos colonizam melhor as regiões intestinais, refletindo sua adaptação ao ambiente do hospedeiro. Por outro lado, clones hipovirulentos são adaptados a ambientes e locais de processamento de alimentos (Maury et al., 2019). Além disso, vários fatores de tolerância foram identificados em *L. monocytogenes*, incluindo genes adicionais de tolerância ao cloreto benzalcônio (Jiang et al., 2018; Maury et al., 2019). Os genes resistência incluem os genes *bcrA*, *bcrB* e *brcC* e gene de adesão *emrE*, *mdrL*, *qacA*. Um importante determinante da resistência ao benzalcônio é

o sistema de efluxo codificado pelo gene *bcrABC*, estes podem ser transferida para outras espécies de *Listeria* sp. (Cooper et al., 2021).

As proteínas de superfície destas bactérias, também têm relevância na interação do micro-organismo com o ambiente. Este fator facilita a aderência e o crescimento bacteriano. Estas proteínas estão envolvidas em eventos de sinalização, transporte e adaptação. Portanto, são fatores que contribuem para tornar a *L. monocytogenes* maior poder de virulência (Chen et al., 2019).

Adicionalmente, a *L. monocytogenes* possui mecanismos para responder a estresses ácidos, osmóticos e térmicos. Esta resposta de tolerância ao ácido é definida como a resistência adquirida a condições ácidas letais após a exposição a condições ácidas moderadas. O mecanismo da resposta inclui a regulação positiva de várias proteínas, incluindo chaperonas,  $F_0 F_1$  -ATPase, descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (Ahmed & Freitag, 2016; Zetzmann et al., 2019). Além destas, outras proteínas também contribui para amplificar a virulência de *L. monocytogenes* (Ahmed & Freitag, 2016; Zetzmann et al., 2019).

### 3.4 Impacto de *Listeria* sp. na indústria de alimentos

O leite e os produtos derivados representam um importante setor econômico no país. Os dados da indústria de laticínios brasileiros apontam uma estimativa de produção aproximada de 3 bilhões de toneladas de queijos e 35 bilhões de litros de leite, e 1,19 milhões de toneladas de bebida láctea nos períodos de 2015 e 2016 (Silva et al., 2017; Ruviano et al., 2020).

Na indústria de alimentos, a higiene eficiente na linha de produção é uma das medidas chave para evitar o acúmulo de bactérias deteriorantes. No entanto, a persistência de bactérias psicrotróficas é um problema permanente em ambientes de processamento de alimentos (Skowron et al., 2019).

A microbiota encontrada em superfícies de equipamentos, onde se processa alimentos é comumente relatada como diversa. Inclui patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes. Os gêneros predominantes em bancadas de processamento de produtor alimentícios de origem animal incluem *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Serratia* sp. e *Listeria* sp. (Fagerlund et al., 2019).

A presença de *Listeria monocytogenes* em produtos alimentícios ocorre

devido às deficientes condições sanitárias durante o preparo, manuseio e armazenamento. Vários produtos alimentícios foram associados com a presença de *Listeria monocytogenes*, incluindo queijo, peixe, carne, frutas e vegetais (Labrador et al., 2021; Alvarez-Molina et al., 2021).

A Agência Canadense de Inspeção de Alimentos, para o período de 2000 a 2017 recolheu um total de 10.432 produtos alimentícios, destes, 2.094 eventos devido à contaminação microbiana. A *L. monocytogenes* foi responsável pelo maior número de produtos alimentícios recolhidos (Herod et al., 2019).

Os produtos lácteos merecem especial atenção, pois surtos de listeriose associados ao consumo de queijo ocorreram em vários países (Martinez & Dalgaard, 2018; Nüesch-Inderbinen et al., 2021).

Devido a ampla distribuição e sobrevivência da *L. monocytogenes* no ambiente, as medidas de controle e monitoramento dos produtos são necessárias em todas as etapas de preparo, produção, processamento e pós-processamento dos alimentos até a disponibilização para consumo (Pasonen et al., 2019; Ballom et al., 2020).

### 3.5 Controle de *Listeria* sp. na Indústria de leite e derivados

*Listeria* sp. é uma bactéria amplamente encontrada na indústria e isolada em vários estabelecimentos que processam produtos lácteos e derivados. Estudos têm demonstrado que indústrias processadoras de alimentos de origem animal são frequentemente contaminadas por bactérias psicrófilas (Lee et al., 2020; Chen et al., 2019; Skowron et al., 2019). Em indústrias de produtos lácteos, as espécies de *Listeria* sp. têm sido encontradas com maior frequência em equipamentos, fatiadores e local de manipulação (Sauders et al., 2016; Galié et al., 2018; Skowron et al., 2019).

O que contribui para a persistência nos ambientes é a capacidade da *L. monocytogenes* se multiplicar em temperatura de refrigeração e em ambientes com baixa atividade de água, medidas comumente utilizadas para o controle da multiplicação de patógenos em alimentos. Desta maneira destaca-se o perigo potencial para a saúde do consumidor, quando presente em alimentos mantidos sob refrigeração (Chen et al., 2019; Skowron et al., 2019). A presença deste micro-organismo é um importante indicador de práticas higiênicas deficientes (Fagerlund et al., 2020).



O cumprimento de boas práticas de higiene no processo de fabricação é um fator essencial para o controle de possíveis contaminações ambientais por agentes biológicos. Por isso as recomendações de boas práticas devem ser aplicadas com eficácia (MAPA, 1997). O risco contínuo em toda a cadeia industrial de alimentos, representa um desafio para o abastecimento destes alimentos (Skowron et al., 2019).

A implantação dos programas de autocontrole em indústrias de alimentos de origem animal, permite o controle higiênico-sanitário em alimentos e o controle de micro-organismos causadores de doenças. As boas práticas de fabricação, procedimento padrão de higiene operacional e análises de perigos e pontos críticos de controle são fundamentais e exigidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O controle sanitário nas empresas de produção de alimentos de origem animal, devem ser equilibrados recaindo não somente sobre os produtos a serem industrializados, mas também sobre a matérias primas, para que os mesmos, sejam confiáveis quando disponibilizados para os consumidores (MAPA, 2005).

A instrução Normativa N° 60/2019 estabelece padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. Os alimentos prontos para o consumo, destinados a lactantes ou fins especiais devem ser ausente de *Listeria monocytogenes* em 25 g ou em 25 mL do produto. Contudo, não é obrigatório a análise de alimentos que se enquadrem em, pelo menos, uma das seguintes situações: alimentos com vida útil menor que 5 dias, com pH menor ou igual a 4,4, com atividade de água menor ou igual a 0,92. Ou ainda a combinação de pH menor ou igual a 5,0 e atividade de água menor ou igual a 0,94. E alimentos que tenham recebido tratamento térmico efetivo ou processo equivalente para eliminação de *L. monocytogenes* e não exista a possibilidade de recontaminação (Brasil, 2019).

A manipulação inapropriada ou falhas no processo dos alimentos representa riscos adicionais de contaminação cruzada, pois uma peça de queijo, por exemplo, pode ser recortada várias vezes em locais diferentes antes de chegar ao consumidor (Sauders et al., 2016; Pasonen et al., 2019; Zwirzitz et al., 2021).

Patógenos podem ser inseridos na produção primária ou em qualquer etapa da cadeia de produção de produtos lácteos, podendo se multiplicar caso ações de higiene e controle de sanitização não forem realizadas de forma correta, e a *Listeria monocytogenes* é importantes causador de doença relacionado a produtos alimentícios.

(Sauders et al., 2016). O queijo intacto, pode primeiro ser processado por um grande conversor de queijo em um único estabelecimento. Partes são distribuídas desta empresa para outros níveis atacadista ou distribuidor e, em seguida, novamente no varejo ou em um restaurante. Isso aumenta exponencialmente as chances de contaminação cruzada destes produtos (Sauders et al., 2016). Os utensílios de manuseio como luvas, facas e tábuas de corte são veículos de contaminação do produto (Skowron et al., 2019).

Os sistemas de limpeza e sanitização têm dificuldade de reduzir a persistência dessas bactérias aderidas, que são mais resistentes a processos físicos e agentes químicos, do que suas respectivas formas planctônicas (Kim & Rhee, 2016).

A higienização inclui as etapas de limpeza e sanitização dos equipamentos, utensílios, manipuladores e ar de ambientes destas áreas (Bucur et al., 2018). A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos nestes locais (Sauders et al., 2016). Comumente, os agentes de limpeza em espuma ou gel alcalino são usados para a limpeza aberta de equipamentos de processamento, paredes e pisos (Fagerlund et al., 2020).

Trabalhos tem abordado maneiras que buscam otimizar a concentração e o tempo de contato das soluções de higienização e desinfecção, com intuito de obter uma maior eficiência da ação antimicrobiana (Bayoumi et al., 2012; Ga-Hee, 2016; Pasonen et al., 2019).

### 3.6 Biofilmes microbianos e a *Listeria* sp.

Biofilmes são comunidades microbianas de diversas espécies, associadas à uma superfície. A adesão de células microbianas e a subsequente formação de biofilme contribui para a persistência das bactérias psicrótróficas ao ambiente, geralmente com a adaptação de novas vias metabólicas (Skowron et al., 2019).

Os biofilmes são monocamadas ou multicamadas de micro-organismos acopladas em suas próprias substâncias poliméricas extracelulares, os exopolissacarídeo (EPS) que se associam às superfícies sólidas (Chen et al., 2019; Skowron et al., 2019; Fagerlund et al., 2020).

O EPS formado é constituído em sua maioria por polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, essa estrutura permite ao biofilme um formato tridimensional,

uma maior resistência mecânica e auxilia a célula na resistência ao estresse promovido por biocidas (Koseoglu et al., 2015; Fagerlund et al., 2020). Esta matriz formada por patógenos veiculados por alimentos, pode representar um risco higiênico-sanitário substancial para a indústria de alimentos (Colagiorgi et al., 2016).

Em instalações de processamento de alimentos, algumas superfícies, como paredes e tetos úmidos, devido à condensação, são locais favoráveis para o crescimento de bactérias em biofilmes estáticos (Chen et al., 2019).

O leite e derivados são substratos nos quais as bactérias podem se dispersar facilmente e se tornar uma fonte de contaminação em um ambiente da indústria de laticínios (Alonso & Kabuki 2019).

O biofilme pode se aderir a superfícies abióticas, e são consideradas estruturas dinâmicas que apresentam cinco etapas de formação, como observa-se na figura 1.

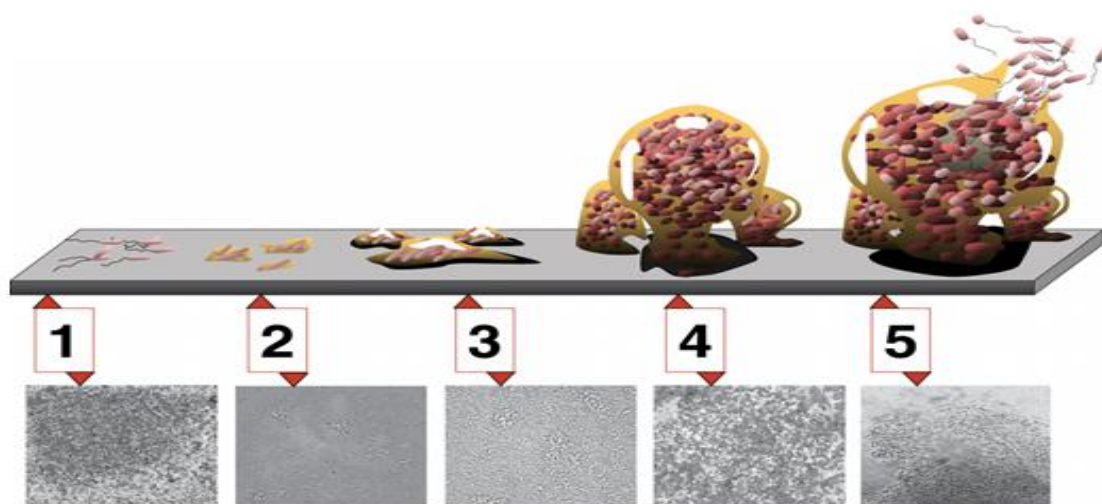


Figura 1: Estágios da formação e desenvolvimento do biofilme bacteriano. Estágio 1: adesão bacteriana reversível; Estágio 2: adesão irreversível; Estágio 3: início da maturação; Estágio 4: maturação completa; Estágio 5: deslocamento do biofilme maduro para novas colonizações bacterianas. Adaptado de: Monroe, 2007.

O primeiro passo na formação do biofilme é a adesão das bactérias planctônicas à superfície e ocorre de forma aleatória, (Estágio 1). Esta primeira adesão é reversível e é mantida por interações físico-químicas não específicas constituindo a

base para o crescimento do biofilme. A segunda fase é que consiste na transição do estágio reversível para o irreversível (Estágio 2). Nesta fase as bactérias passam a secretar substâncias que como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e a síntese de adesinas e exopolissacarídeos, que são responsáveis pela manutenção e adesão da camada que envolve o biofilme. Na fase subsequente há o início da formação de microcolônias bacterianas e o desenvolvimento da estrutura do biofilme maduro (estágios 3 e 4). Os biofilmes maduros apresentam arranjos semelhantes a cogumelos, que são envoltos por diversas substâncias, principalmente açúcares e permeados por poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos que precisam ser secretados para fora do biofilme. O quinto e último estágio da formação do biofilme ocorre quando o ambiente não é mais favorável à sua manutenção, e consiste no descolamento do biofilme maduro (estágio 5 da figura) em forma de agregados celulares ou células planctônicas. Após desprendidas, as bactérias livres podem colonizar novos ambientes, reiniciando a formação de novos biofilmes (Monroe, 2007; Lee et al., 2019).

A composição dos biofilmes pode ter variações de mono-espécie para multi-espécies, ou seja biofilmes com bactérias de gêneros diferentes (Ramirez-Mora et al., 2018).

A formação da matriz do biofilme de *Listeria monocytogenes* de espécie única exibiu matrizes mais firmes e densas quando comparado com associação mista com *Vibrio parahaemolyticus* (Chen et al., 2019). Esta diferença estrutural do biofilme de espécie mista é provavelmente pela competição bacteriana por nutrientes, o que acaba por inibir o crescimento de uma espécie coexistente, ou ainda por atividade de metabólitos inibitório de uma espécie sobre a outra (Chen et al., 2019; Liao et al., 2020).

A formação de biofilmes é importante para a sobrevivência microbiana na indústria de alimentos. As células bacterianas associadas a biofilmes tipicamente exibem maior tolerância aos agentes antimicrobianos em comparação com os seus equivalentes planctônicos. Os mecanismos que contribuem para a baixa eficácia de biocidas convencionais em biofilmes é a resistência e a aderência desta camada nas superfícies, além do crescimento bacteriano lento e desenvolvimento de subpopulações com células resistentes (Fagerlund et al., 2020; Alonso et al., 2020).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens de *Listeria* sp. e condições de cultivo

Neste trabalho foram estudadas 14 bactérias do gênero *Listeria* sp. Destas, 12 isolados bacterianos, a partir de amostras de produtos de origem animal, fatiados, superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambreteria em Porto Alegre – RS e duas são cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) *Listeria monocytogenes* 35152 e *Listeria monocytogenes* 7644. Estes isolados foram mantidos em glicerol 20% a uma temperatura de - 20 °C. Para reativação, as bactérias foram transferidas para tubos contendo 3 mL de caldo triptona de soja, acrescido de 0.6 % extrato de levedura (TSBYE) e incubados a temperatura de 37 °C por 24 horas. Após seu crescimento, as bactérias foram semeadas por esgotamento em placas de ágar triptona de soja com 0.6 % extrato de levedura (TSAYE), e incubados a temperatura de 37 °C por 24 horas (Hua et al., 2019).

### 4.2 Identificação das bactérias por MALDI-TOF/MS

A identificação dos isolados foi realizada através do método de Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser – Tempo de Vôo/Espectrômetro de Massa (MALDI-TOF/MS). Esta técnica foi realizada através do método de extração química, de acordo com o protocolo etanol/ácido fórmico (Pyz-lukasik et al., 2021). Os isolados foram cultivados em meio TSAYE a 37 ° C por 24 horas e aproximadamente 5-10 mg de material foi utilizada nesta análise. Este procedimento foi realizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde/ UFRGS pelo equipamento MALDI Biotyper 4.0 software MBT OC.

### 4.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos, as espécies bacterianas foram submetidas ao método Kirby-Bauer. As suspensões bacterianas foram padronizadas pela escala de McFarland 0.5 e semeadas em superfície de Agar Mueller-

Hinton (MH) com 5% de sangue de cavalo desfibrinado. Foram empregados os discos de antibióticos contendo penicilina (1 UI); ampicilina (2 µg); meropenem (10 µg); eritromicina (15 µg) e sulfazotrim (25 µg), conforme recomendações do Comitê de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana Europeu (EUCAST 2019). Também foram empregados os discos de ciprofloxacina (5 µg); clindamicina (2 µg); tetraciclina (30 µg) conforme a 28ª Edição do Instituto de Padrões Clínicos e (CLSI 2018). As placas foram incubadas a 35±1 °C, em aerobiose por 18 a 20 horas e interpretadas conforme as recomendações.

#### 4.4 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes pelo método da microplaca

A capacidade de formação de biofilme *in vitro* foi determinada de acordo com o descrito por (Stepanovic et al., 2004). As placas de microtitulação de poliestireno (96 poços) estéreis foram preenchidas com 180 µL de caldo TSBYE. As espécies de *Listeria* sp. foram ressuspensas em solução salina 0,85 % e ajustadas conforme escala 0.5 de McFarland e 20 µL dessa solução foi inoculada por poço, em octoplicata. Para o controle negativo, foi empregado somente o caldo TSBYE, seguido pelo controle positivo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, bactéria já descrita como forte formadora de biofilme (Schmidt et al., 2018). As placas de microtitulação foram incubadas à 37 ° C por 48 horas (Borucki et al., 2003). Posteriormente, as amostras foram lavadas com 200 µL solução salina 0,85% estéril. A fixação das bactérias foi realizada com 200 µL de metanol p.a. durante 20 minutos, em seguida as microplacas foram mantidas invertidas, *overnight* em temperatura ambiente. Após, a microplaca foi corada com 200 µL de cristal violeta (0,1%) durante 15 minutos, seguido de lavagem da placa com água destilada estéril. Após a secagem das placas, o botão corado fixado ao fundo dos poços foi ressuspensado em 200 µL de etanol 95%, e as microplacas foram mantidas em repouso durante 30 minutos e então realizada a quantificação dos biofilmes. A densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos foi quantificado com auxílio de um leitor espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 595 nm (Marca: Anthos 2010 Type 17 550 S. Nº 17 550 4894). A classificação para formação do biofilme seguiu os critérios descritos por Christensen et al. (1985) e Chusri, Phatthalung e Voravuthikunchai (2012). A DO média do controle negativo foi o ponto de corte (PC). Os isolados foram classificados da seguinte forma: Não formadores de biofilme (NF): amostras cuja DO foi menor que o

ponto de corte. Fracos formadores de biofilme (FRA): amostras com DO média acima do ponto de corte, porém menor ou igual ao dobro do PC. Moderados formadores de biofilmes (MF): amostras com DO média acima do dobro do PC, porém menor ou igual a 4 x o PC. Fortes formadores de biofilme (FF): amostras com DO média maior do que 4 x o valor do PC.

#### 4.5 Preparo dos cupons de aço inox e polipropileno para avaliação de biofilme

No estudo foram utilizados os cupons de aço inox AISI 304 e cupons de polipropileno ambos contendo 1 cm<sup>2</sup>. A preparação foi realizada conforme descrito por Alonso & Kabuki. (2019) e Bogo et al. (2020) com modificações. Para isso foi realizado a higienização com água e detergente neutro e secagem em estufa por 2 horas. Após, banho por imersão em acetona durante 30 minutos para remover qualquer gordura, oleosidade ou possível interferentes, em seguida foi realizado enxague com água estéril destilada (dH<sub>2</sub>O) e esterilizado em autoclave a 121 ° C por 30 minutos em embalagens individuais.

#### 4.6 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em meio de cultura TSBYE

Os critérios de seleção foram as bactérias que se enquadraram como forte formador de biofilme (FF) no teste da microplaca conforme os descrito no item 4.4. Os materiais utilizados foram o aço inox e polipropileno, de acordo com a metodologia descrita por Nörnberg et al. (2011) e Alonso & Kabuki (2019), com modificações. Para o experimento, as colônias bacterianas com 24 horas de crescimento foram transferidas para 3 mL de meio de cultura TSBYE e incubadas a 37 ° C durante 24 horas. Após uma alíquota de 25 µL foi transferida para 100 mL de TSBYE, para obter o início do experimento padronizado em  $\cong 3 \log_{10}$  UFC/mL de bactérias (T0). Os cupons de aço inox e polipropileno foram preparados conforme descrito no item 4.5. Três cupons foram imersos em tubos separados contendo 10 mL com os inóculos em TSBYE. Os tubos contendo os cupons foram incubados em estufa sem agitação a 37 ° C até 72 horas. A cada 24 horas um cupom de cada tubo foi assepticamente removido usando uma pinça estéril, lavado três vezes em dH<sub>2</sub>O estéril para remover células planctônicas. Os cupons

contendo células sésseis foram novamente imersos em 10 mL de solução salina 0,85 % e submetidos a agitação em vórtex por 3 min para remoção das células sésseis. As células planctônicas e sésseis foram submetidas a diluições decimais e avaliadas em T0, 24, 48 e 72 horas, pelo do método descrito por Miles & Mirsa (1938), com modificações. Para isso realizaram-se microdiluições seriadas em solução salina 0,85%, onde 20 µL de cada diluição foram distribuídos sobre placas contendo meio TSAYE. As placas foram incubadas a 37 ° C por 24 horas para determinar o número de células sésseis, expresso em log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e o número de células planctônicas, expresso em log<sub>10</sub> UFC/mL.

#### 4.7 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em substrato leite UHT integral

Os critérios de seleção da *Listeria monocytogenes* para aplicação no substrato leite integral – Temperatura Ultra Alta (UHT), foi a bactéria que se apresentou como forte formador de biofilme (FF) no teste da microplaca conforme os descrito no item 4.4 e isolada em alimento derivado de leite. Os testes foram realizados em três condições de temperatura, aplicando em cupons de aço inox e polipropileno, como descrito no item 4.6. Para o experimento com início de  $\cong 3$  log<sub>10</sub> UFC/mL do isolado, os cupons de aço inox e polipropileno foram preparados conforme descrito no item 4.5 e incubados, em estufa a 37 ° C; temperatura ambiente e temperatura de refrigeração. Para os inóculos incubados em estufa a 37 ° C e temperatura ambiente, com média de 28,6 ° C, avaliamos os tempos: T0, 24, 48 e 72 horas. Já para os inóculos mantidos em temperatura de refrigeração, com média de 7,9 ° C, as avaliações foram em: T0, 72, 120 e 168 horas. A cada tempo de incubação, foram realizadas avaliações conforme o método descrito por Miles & Mirsa (1938), com modificações. As placas de Petri contendo TSAYE foram incubadas a 37 ° C por 24 horas para determinar o número de células sésseis, expresso em log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e o número de células planctônicas, expresso em log<sub>10</sub> UFC/mL.

#### 4.8 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em substrato Leite Integral UHT com duas espécies bacterianas

As espécies bacterianas utilizadas nos ensaios foram, *Listeria monocytogenes* (QF Oxford) e *Pseudomonas fluorescens* (PL7.1), de acordo com



encontrado por Bogo et al. (2020), testadas em duas condições de temperatura em cupons conforme o item 4.5, de acordo com a metodologia descrita por Nörnberg et al. (2011) e Alonso & Kabuki. (2019), com modificações. Para o experimento, uma colônia de *L. monocytogenes*, com 24 horas de crescimento, foi transferida para 3 mL de meio de cultura caldo TSBYE e incubadas a 37 ° C durante 24 horas. Da mesma forma, a colônia de *P. fluorescens*, foi transferida para 3 mL de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubadas a 30 ° C durante 24 horas. Iniciando em  $\cong 3 \log_{10}$  UFC/mL de ambas as espécies conforme o item 4.6, foi determinado o tempo zero (T0). Os cupons foram incubados, em temperatura ambiente, com média de 27,4°C e refrigeração, com média de 8,2°C. Para os inóculos incubados em temperatura ambiente, foram avaliados os tempos: T0, 24, 48 e 72 horas. Já para os inóculos mantidos em temperatura de refrigeração, as avaliações foram em: T0, 72, 120 e 168 horas. A cada tempo de incubação, foi realizada avaliações conforme o método descrito por Miles & Mirsa (1938), com modificações. Para isso realizaram-se microdiluições seriadas em solução salina 0,85%, onde 20  $\mu$ L de cada diluição foi distribuído sobre placas contendo meio Agar Listeria Oxford e Agar Cetrimide. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 24 horas para determinar o número de células sésseis, expresso em  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> e o número de células planctônicas, expresso em  $\log_{10}$  UFC/mL.

#### 4.9 Avaliação do sanitizante na erradicação do biofilme em aço inox

A avaliação dos sanitizante sobre os biofilmes formados foi de acordo com a metodologia descrita por Young-Min et al. (2012) e Ga-Hee et al. (2016). O material empregado foi o aço inox descritos no item 4.5, higienizados conforme já detalhado anteriormente. Os desinfetantes utilizados foram: ácido peracético na concentração de 0,2% (Peroxoni Top -Launer Química Indústria e Comércio Ltda-Brasil - Teor de ativo % Ácido Peracético  $\geq 15,00$ ) e Hipoclorito de Sódio (Água sanitária Ypê cloro ativo - Amparo Ltda-Brasil - Teor de cloro ativo % 2,0 – 2,5 p/p) aplicado conforme indicação dos fabricantes. Estes produtos são empregados com frequência na Indústria de alimentos (Beltrame et al., 2015; Lee et al., 2016; Rosa et al., 2018). As condições dos biofilmes testados nesta etapa foram com duas as espécies, sendo a *L. monocytogenes* (QF Oxford) e *P. fluorescens* (PL7.1), em substrato de leite UHT integral conforme detalhado no item 4.8. Após 72 horas de formação de biofilme foi realizada a contagem das células

sésseis em cupons controle e após empregada a higienização com os 2 produtos testados. Para isso os cupons foram lavados três vezes em dH<sub>2</sub>O estéril para remover células planctônicas. Os cupons contendo células sésseis foram imersos em tubos 10 mL do produto sanitizante por 10 minutos em temperatura ambiente acompanhado do mesmo procedimento em dH<sub>2</sub>O estéril na condição de controle negativo ao sanitizante. Transcorrido o tempo, foi lavado três vezes em dH<sub>2</sub>O estéril para remover os sanitizantes e imerso em 10mL de solução salina 0,85 % NaCl e submetidos a agitação em vórtex por 3 minutos para remoção das células sésseis após ação do agente sanitizante. Nesta etapa realizamos a contagem das células sésseis por diluições decimais e avaliada através do método descrito por Miles & Mirsa (1938), com modificações. Para isso realizaram-se microdiluições seriadas em solução salina 0,85%, onde 20 µL de cada diluição foi distribuída sobre placas contendo meio ágar para contagem (PCA) e meios Listeria Oxford e Agar Cetrimide. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 24 horas para determinar o número de células sésseis, expresso em log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e o número de células planctônicas, expresso em log<sub>10</sub> UFC/mL.

#### 4.10 Análises estatísticas

Revisão e análise do banco de dados foram realizados no programa SPSS, [SPSS Inc., 2009. PASW Statistics for Windows, versão 18.0. Chicago: SPSS Inc.].

Para as análises descritivas, os dados quantitativos com distribuição simétrica foram expressos como médias e desvios padrões das médias ( $\pm$ DP). O teste de Shapiro-Wilk foi usado para determinar a normalidade da distribuição dos dados quantitativos. As variáveis categóricas foram descritas como frequências absolutas (n) e relativas (n%).

Análises bivariadas para comparações de variáveis quantitativas entre os diferentes tratamentos foram conduzidas utilizando os testes t de *Student* para amostras independentes, Análise de variância (ANOVA) de uma via ou de duas vias com *post hoc* de Bonferroni, quando aplicável. Análises bivariadas para comparações de variáveis quantitativas entre os diferentes tempos de análise foram conduzidas utilizando os testes t de *Student* para amostras pareadas.

O nível de significância foi estabelecido em 5% para todas as análises.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação das espécies de *Listeria* sp.

Os micro-organismos avaliados neste trabalho, foram isolados a partir de alimentos de origem animal, fatiados e de superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambreteria no município de Porto Alegre- RS. As bactérias foram identificadas em nível de espécie, pela técnica de MALDI-TOF/MS.

Um total de 14 bactérias foram utilizados neste estudo, sendo duas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC). A *L. monocytogenes* (ATCC 35152) foi descrita por Kumar et al. (2009) como bactéria que forma biofilme em microplaca e a *L. monocytogenes* (ATCC 7644) utilizada na avaliação da capacidade de formação de biofilme em meios suplementados utilizando a superfície de polipropileno (Wiktorczyk et al., 2018).

Deste grupo de 12 isolados, foram identificadas, quatro da espécie *L. monocytogenes*, quatro de *L. innocua* e quatro pertencentes a espécie *L. seeligeri*. As bactérias, *L. monocytogenes* 17D78/03, *L. monocytogenes* 4C, *L. innocua* 6B, foram isolados de alimentos. Os isolados *L. innocua* L07, *L. innocua* L10 e *L. innocua* L13, são de origem de leite cru de búfala. A *L. monocytogenes* 4B foi isolada de carcaça de frango. Os isolados *L. seeligeri* BQ Oxford e *L. seeligeri* BP Oxford foram isoladas de bancadas de queijo. A bactéria *L. seeligeri* BP Palcam, foi isolada da bancada do presunto e a bactéria *L. seeligeri* MP Oxford foi isolada de mãos manipulador de alimento. A *L. monocytogenes* QF Oxford foi isolada de queijo fatiado. A espécies com suas respectivas origens estão listadas na tabela 1. As coletas foram realizadas juntamente com o serviço de Vigilância de Alimentos da Secretaria da Saúde de Porto Alegre, conforme a Lei Estadual 6503/72e Decreto Estadual 23430/74– RS.

Tabela 1. Espécies de *Listeria* sp. identificadas em MALDI-TOF/MS com seu código e origens, com as respectivas classificações quanto ao potencial de formação de biofilme em microplaca

Micro-organismo (espécie)	Código	Origem	Classificação
<i>Staphylococcus epidermidis</i> * #	ATCC 35984	American Type Culture Colection	FF
<i>L. monocytogenes</i> #	ATCC 35152	American Type Culture Colection	FF
	ATCC 7644	American Type Culture Colection	MF
<i>L. monocytogenes</i>	17D78/03	Isolado de alimento	MF
	QF Oxford	Isolado de queijo fatiado	FF
	4B	Isolado de carcaça de frango	FF
	4C	Isolado de alimento	MF
<i>L. innocua</i>	L10	Isolada de leite cru de búfala	MF
	L13	Isolada de leite cru de búfala	MF
	6B	Isolado de alimento	MF
	L07	Isolada de leite cru de búfala	MF
<i>L. seeligeri</i>	BQ Oxford	Isolado de bancada de queijo	MF
	BP Palcam	Isolada da bancada do presunto	MF
	BP oxford	Isolado de bancada de queijo	MF
	MP Oxford	Isolada de mãos manipulador de alimento	FRA

\*Controle Positivo FF; #ATCC; NF-Não formador de biofilme; FRA- Fraco formador de biofilme; MF- Moderado formador de biofilme; FF- Forte formador de biofilme.

## 5.2 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.

Na avaliação da susceptibilidade aos antibióticos, observou-se que dos 12 (100%) isolados pesquisados oito (66,6%) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado. Deste grupo resistente, os isolados *L. monocytogenes* 4C e *L. seeligeri* BP Oxford, apresentaram este perfil a clindamicina (2 µg) e a sulfazotrim (25 µg). A *L. monocytogenes* ATCC 35152, *L. monocytogenes* 4B, *L. innocua* 6B, *L. innocua* L10, *L. innocua* L07, foram resistentes a clindamicina (2 µg).

As bactérias *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 17D78/03, *L. innocua* L13 e *L. seeligeri* BQ Oxford apresentaram sensibilidade intermediária a clindamicina (2 µg), sendo que o isolado *L. seeligeri* BQ Oxford apresentou este perfil também a ciprofloxacina (5 µg). Os dados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos em *Listeria sp.*

Microrganismo (espécie)	Código	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos		
		S	I	R
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 35152	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT		CLI
	ATCC 7644	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT	CLI	
	17D78/03	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP	CLI	SUT
	4B	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT		CLI
	4C	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP		CLI; SUT
	QF Oxford	ERI; AMP; CLI; TET; PEN; MER; CIP;SUT		
<i>Listeria innocua</i>	6B	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT		CLI
	L10	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT		CLI
	L13	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP	CLI	SUT
	L07	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT		CLI
<i>Listeria seeligeri</i>	BP Palcam	ERI; AMP; CLI; TET; PEN; MER; CIP;SUT		
	MP Oxford	ERI; AMP; CLI; TET; PEN; MER; CIP;SUT		
	BP Oxford	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP		CLI; SUT
	BQ Oxford	ERI; AMP; TET; PEN; MER; SUT	CLI; CIP	

S-Sensível; I- Intermediário/ sensível, exposição aumentando; R- Resistente; ERI- Eritromicina (15 µg); AMP- Ampicilina (2 µg); CLI- Clindamicina (2 µg); TET-Tetraciclina (30 µg); PEN- Penicilina (1 UI); MER- Meropenem (10 µg); CIP- Ciprofloxacina (5 µg); SUT- Sulfazotrim (25 µg)

### 5.3 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes pelo método da microplaca

Quanto a capacidade de formar biofilme em microplaca, a partir dos resultados das análises em octoplicata, três isolados de *L. monocytogenes* apresentaram perfil de forte formador de biofilme (FF), são eles: *L. monocytogenes* 4B (carcaça de frango), *L. monocytogenes* ATCC 35152, *L. monocytogenes* QF Oxford (queijo fatiado).

A *L. seeligerii* MP Oxford, isolada de mãos manipulador de alimento, apresentou-se como fraco formador de biofilme (FRA). As demais bactérias apresentaram resultados como moderado formador de biofilme (MF). Os dados encontram-se descritos na tabela 1.

### 5.4 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em TSBYE

A partir dos resultados apresentados na capacidade de formação de biofilme em microplaca, selecionaram-se as bactérias que demonstraram um perfil de forte formador de biofilme (FF) para a aplicação nos materiais de aço inox e polipropileno,

utilizando o substrato Caldo Triptona de Soja, acrescido de 0.6 % extrato de levedura (TSBYE) para as 3 espécies de *L. monocytogenes*.

Os resultados obtidos na avaliação da formação de biofilme pelas bactérias testadas a 37 ° C, mostraram que o isolado *L. monocytogenes* 4B, a cepa *L. monocytogenes* ATCC35152 e o isolado *L. monocytogenes* QF Oxford, foram capazes de formar biofilme em aço inox e polipropileno em 24 horas.

Os valores em 24 horas de incubação para células planctônicas foram 8,98 log<sub>10</sub> UFC/mL para a *L. monocytogenes* 4B, 9,10 log<sub>10</sub> UFC/mL para *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 8,93 log<sub>10</sub> UFC/mL para *L. monocytogenes* QF Oxford, nos tubos contendo os cupons de aço inox. A população de células sésseis em 24 horas no aço inox foi de 5,20 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> *L. monocytogenes* 4B, 5,41 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 5,38 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford. Nos tubos contendo os cupons de polipropileno os valores das células planctônicas foram: 8,41 log<sub>10</sub> UFC/mL para *L. monocytogenes* 4B, 9,46 log<sub>10</sub> UFC/mL na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 9,24 log<sub>10</sub> UFC/mL no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford. A população de células sésseis em polipropileno foi de 6,23 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> *L. monocytogenes* 4B, 6,55 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 7,03 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford.

As avaliações em 48 horas com cupons de aço inox foram: 8,37 log<sub>10</sub> UFC/mL para *L. monocytogenes* 4B, 8,96 log<sub>10</sub> UFC/mL na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 8,37 log<sub>10</sub> UFC/mL no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford de células planctônicas. A população de células sésseis foi de 5,52, log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> *L. monocytogenes* 4B, 4,66 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 5,36 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> log<sub>10</sub> no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford. Nos tubos contendo os cupons de polipropileno os valores das células foram: 8,43 log<sub>10</sub> UFC/mL para *L. monocytogenes* 4B, 9,28 log<sub>10</sub> UFC/mL na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 8,44 log<sub>10</sub> UFC/mL no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford de células planctônicas. A população de células sésseis em polipropileno foi 6,21, log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> para *L. monocytogenes* 4B, 6,44 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 7,02 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford.

Em 72 horas de incubação para os cupons de aço inox os valores de células planctônicas foram: 8,46 log<sub>10</sub> UFC/mL para *L. monocytogenes* 4B, 8,57 log<sub>10</sub> UFC/mL

na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 8,47 log<sub>10</sub> UFC/mL no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford. A população de células sésseis foi de 5,38 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> para *L. monocytogenes* 4B, 4,29 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 5,68 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford. Nos tubos contendo os cupons de polipropileno os valores das células planctônicas foram: 8,52 log<sub>10</sub> UFC/mL para *L. monocytogenes* 4B, 8,77 log<sub>10</sub> UFC/mL na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 8,55 log<sub>10</sub> UFC/mL no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford. A população de células sésseis foi de 6,72 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> para *L. monocytogenes* 4B, 6,62 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e 6,86 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford.

Quando comparadas as três bactérias na superfície inox (Figura 2A), não houve diferença entre os grupos para os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> em 24 horas (ANOVA de uma via, F(2,6) =0,362, p=0,710) ou em 48 horas (ANOVA de uma via, F(2,6) =3,782, p=0,087). Por outro lado, evidenciou-se que em 72 horas houve uma diferença para os Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> (ANOVA de uma via, F(2,6) =40,981, p≤0,0001), onde o grupo *L. monocytogenes* ATCC35152 apresentou menor média que os grupos *L. monocytogenes* 4B e *L. monocytogenes* QF Oxford (*post hoc* de Bonferroni, p≤0,005). Para a superfície polipropileno (Figura 2B), não houve diferença entre os grupos para os Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> em 24 horas (ANOVA de uma via, F(2,6) =2,577, p=0,156), 48 horas (ANOVA de uma via, F(2,6) =3,739, p=0,088) ou 72 horas (ANOVA de uma via, F(2,6) =0,620, p=0,569).

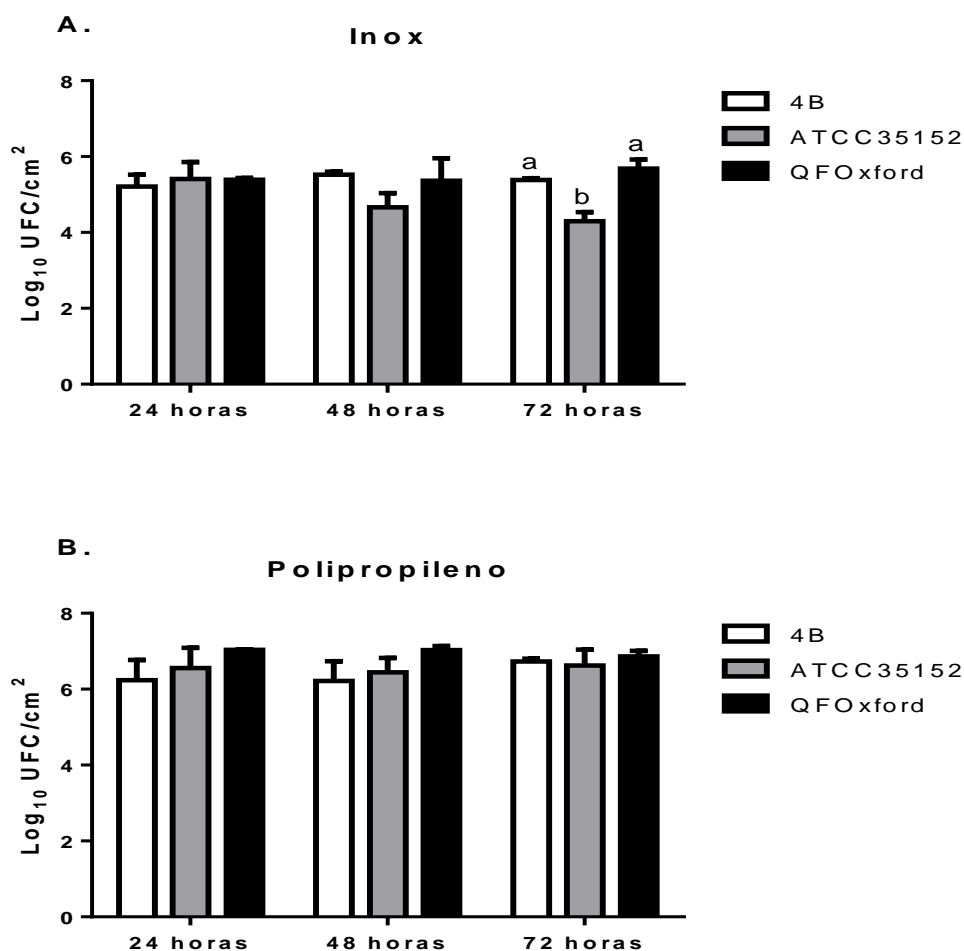


Figura 2. Avaliação de capacidade de formação de biofilme das bactérias *L. monocytogenes* 4B, *L. monocytogenes* ATCC35152 e *L. monocytogenes* QF Oxford, em aço inox (A) e polipropileno (B), com meio de cultura TSBYE à temperatura de 37 °C por 24, 48 e 72 horas. UFC – unidade formadora de colônia. <sup>ab</sup>Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos analisados. Significância fixada em 5% para todas as análises.

Quando análises pareadas compararam os diferentes tempos analisados, os Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* ATCC35152 na superfície inox apresentou uma redução significativa no tempo de 72h quando comparado ao tempo de 24h (Teste t de *Student* para amostras pareadas, p= 0,019), não apresentando diferença para as demais análises (Figura 3).



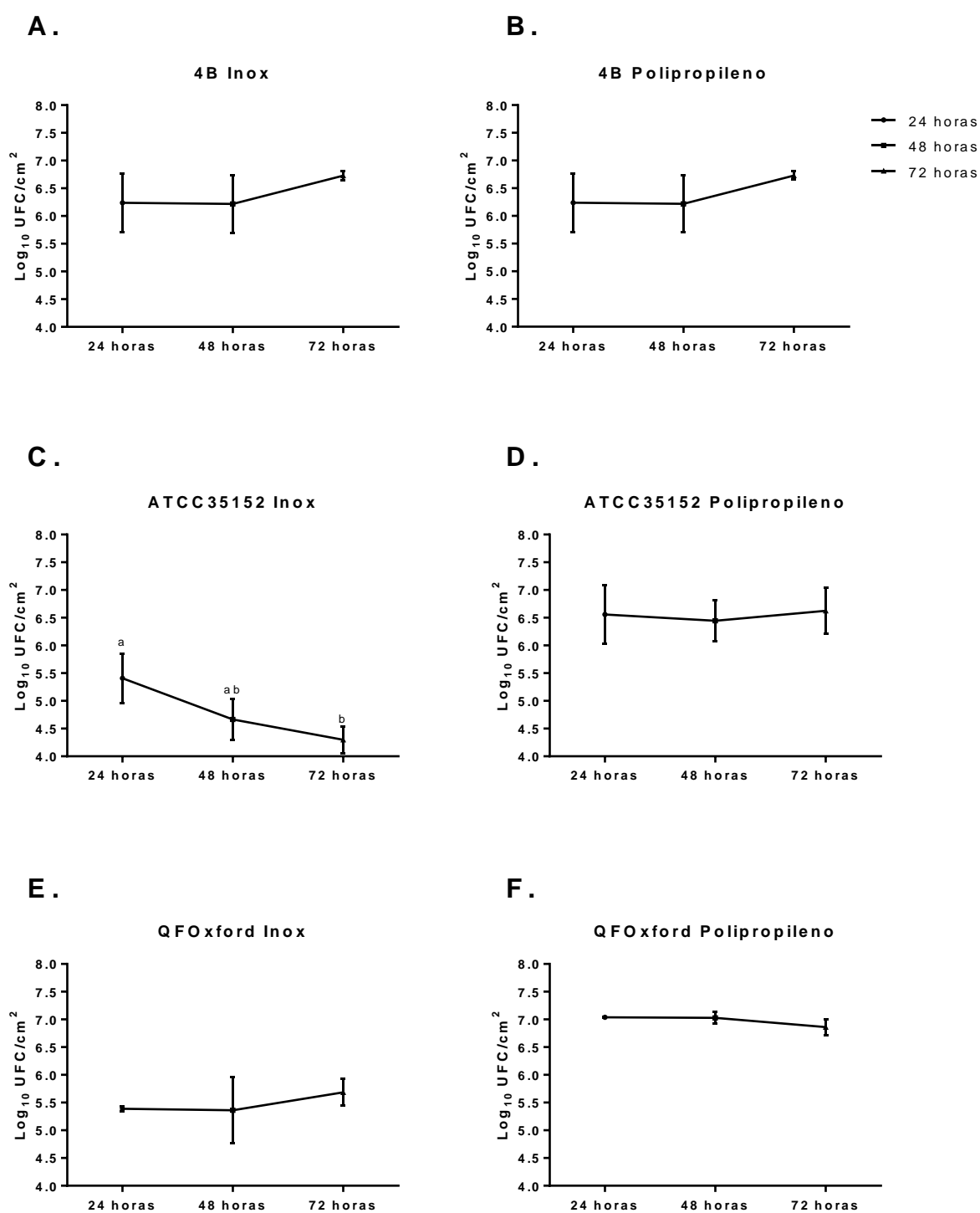


Figura 3. Avaliação de capacidade de formação de biofilme das bactérias *L. monocytogenes* 4B, *L. monocytogenes* ATCC 35152 e *L. monocytogenes* QF Oxford, em aço inox (A) e polipropileno (B), com meio de cultura TSBYE à temperatura de 37 °C, por 24, 48 e 72 horas. UFC – unidade formadora de colônia. <sup>ab</sup>Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos analisados. Significância fixada em 5% para todas

as análises.

#### 5.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes por *Listeria monocytogenes* QF Oxford em aço inox e polipropileno em substrato leite UHT a 37 ° C, ambiente e refrigeração

A bactéria *L. monocytogenes* QF Oxford que demonstrou um perfil de forte formador de biofilme (FF) em microplaca e isolada em alimento derivado de leite (queijo fatiado), foi utilizada para testar capacidade de formação de biofilme na matriz alimentar leite integral UHT em cupons de inox e polipropileno. Para isto, foram aplicadas três temperaturas: 37°C, temperatura ambiente e temperatura de refrigeração.

Na temperatura de 37 ° C a população de células planctônicas em 24 horas de incubação foi de 8,41 log<sub>10</sub> UFC/mL nos cupons de aço inox e 3,45 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis. Em 48 horas os valores foram 8,05 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 3,48 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis. Os resultados avaliados em 72h de incubação foram de 7,86 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 3,10 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis.

As avaliações nos cupons de polipropileno incubados a temperatura de 37 ° C em 24 horas foram 8,44 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 5,07 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis. Já para 48 horas, os valores foram 8,34 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 4,75 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis. Em 72 horas, obteve-se 8,33 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 5,04 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis.

Quando análises pareadas compararam os diferentes tempos analisados, os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford na superfície inox com o meio leite integral UHT apresentou uma redução significativa no tempo de 72 horas quando comparado ao tempo de 48 horas (Teste t de *Student* para amostras pareadas, p= 0,025), não apresentando diferença para as demais análises (Figura 4C).

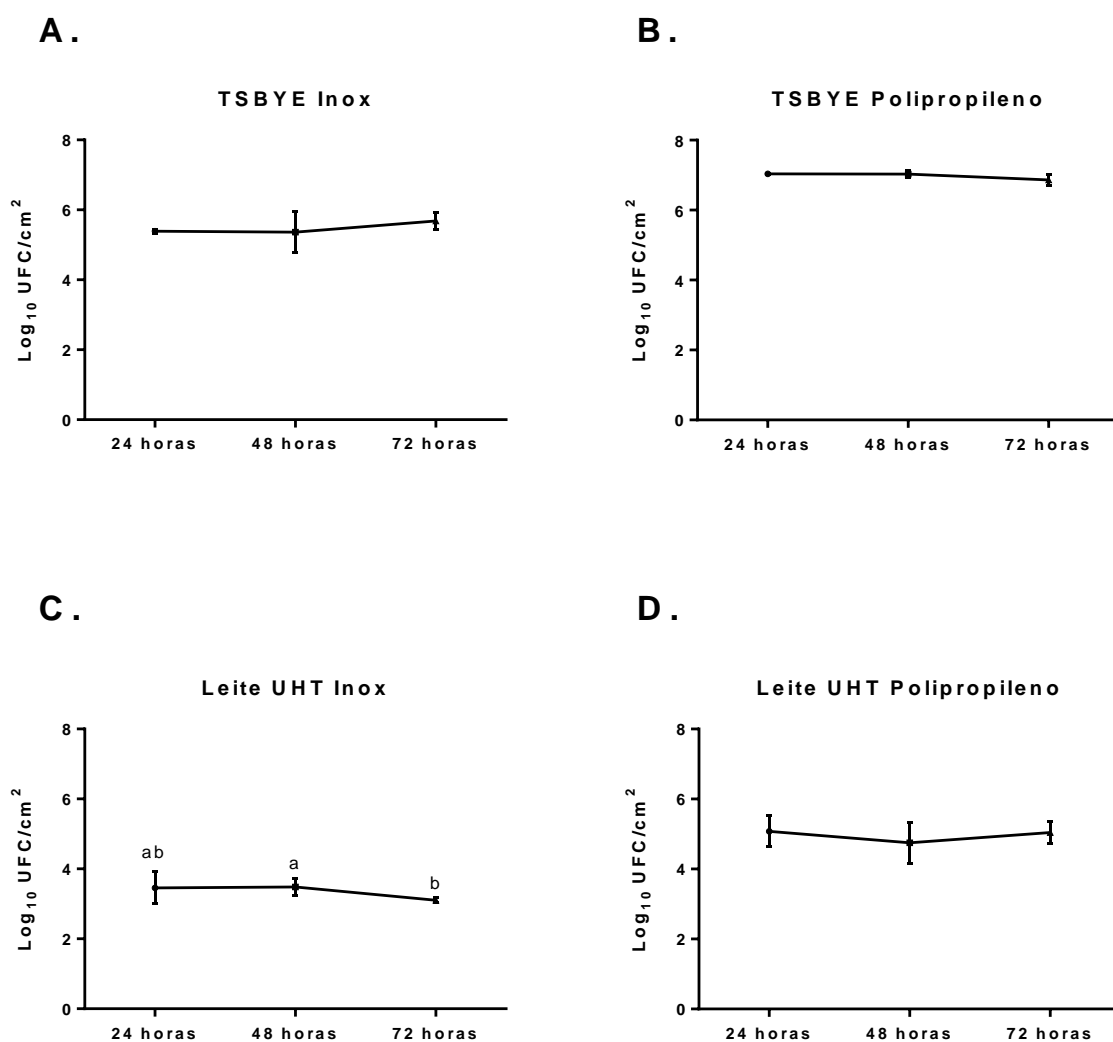


Figura 4. Avaliação de capacidade de formação de biofilme do isolado *L. monocytogenes* QF Oxford, em aço inox em meio de cultura TSBYE (A), polipropileno em meio de cultura TSBYE (B), aço inox em leite UHT (C), polipropileno em leite UHT(D) à temperatura de 37 ° C por 24, 48 e 72 horas. UFC – unidade formadora de colônia. <sup>ab</sup>Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos analisados. Significância fixada em 5% para todas as análises.

Na avaliação da capacidade de formação de biofilme em temperatura ambiente com os cupons de aço inox, os valores foram de 8,50 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 3,99 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis em 24 horas de incubação. Para 48 horas, obteve-se 8,61 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 4,23 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis. Já para as análises em 72 horas os valores foram 8,52 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 4,22 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis (Figura 5C).

As avaliações da capacidade de formação de biofilme nos cupons de polipropileno, incubados a temperatura ambiente em 24 horas, os valores foram 8,55 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 5,23 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis. Com 48 horas de incubação, os valores foram 8,48 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 5,85 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis. Nas avaliações de 72 horas, os resultados foram de 8,57 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 6,03 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis (Figura 5D).

No presente estudo, avaliou-se também a capacidade de formação de biofilme em temperatura de refrigeração. Nos cupons de aço inox os valores foram de 5,11 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas, já as células sésseis não foram recuperadas em 72 horas de incubação. Os resultados, provenientes de 120 horas de incubação, foram 7,61 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 3,31 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis, e nas avaliações de 168 horas, os resultados foram de, 8,36 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 4,04 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis (Figura 5E).

As avaliações da capacidade de formação de biofilme nos cupons de polipropileno incubados a temperatura de refrigeração por 72 horas foram 6,03 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 3,23 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis. Nas análises em 120 horas, os valores foram de 7,44 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 4,17 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis. Nas avaliações de 168 horas obtivemos 8,41 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas e 4,78 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis (Figura 5F).

Em 37 °C, os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford diminuíram em 72 horas em relação a 48 horas na superfície inox (Teste t de *Student* para amostras pareadas, p=0,025, Figura 5A), não se observando alterações na superfície polipropileno (Figura 5B). Em temperatura ambiente, os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo QF Oxford aumentaram em 48 horas em relação a 24 horas na superfície inox (Teste t de *Student* para amostras pareadas, p=0,043, Figura 5C) e em 72 horas em relação a 24 horas na superfície polipropileno (Teste t de *Student* para amostras

pareadas,  $p=0,035$ , Figura 5D). Em temperatura de refrigeração, os  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford, na superfície de inox, aumentaram em 120 horas em relação a 72 horas (Teste t de *Student* para amostras pareadas,  $p=0,001$ , Figura 5E) e em 168 horas em relação a 120 horas (Teste t de *Student* para amostras pareadas,  $p=0,049$ , Figura 5E). Um aumento no  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford, em polipropileno, foi evidenciado em 120 e 168 horas em relação a 72 horas, quando mantidas em temperatura de refrigeração (Figura 5F).

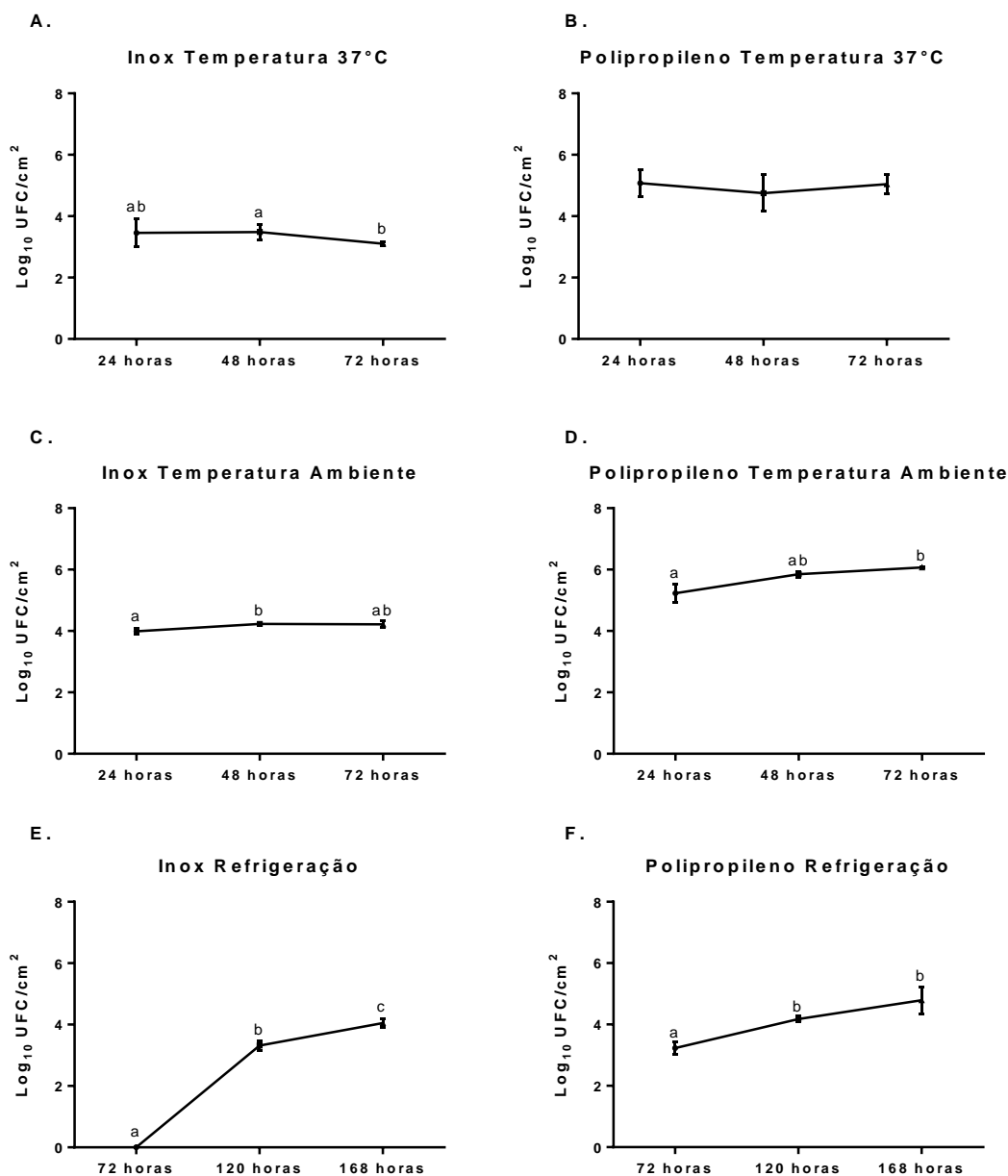


Figura 5. Avaliação de capacidade de formação de biofilme do isolado *L. monocytogenes* QF Oxford, em aço inox (A, C, E) e Polipropileno (B, D, F) em substrato em leite UHT em temperatura de 37 °C (A, B), temperatura ambiente (C, D) por 24, 48 e 72 horas e temperatura de refrigeração (E, F) por 72,120,168 horas. UFC – unidade formadora de colônia. <sup>ab</sup>Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos analisados. Significância fixada em 5% para todas as análises.

Adicionalmente, observou-se uma diferença entre os  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford em 72 horas tanto na superfície inox ( $F(2,5) = 2122.375$ ,  $p \leq 0,0001$ , Figura 6A) quanto em polipropileno (ANOVA de uma via,  $F(2,6) = 133,646$ ,  $p \leq 0,0001$ , Figura 6B). Em ambas as superfícies, houve uma redução na taxa de UFC pela exposição à temperatura de refrigeração, uma manutenção intermediária desta taxa no grupo exposto à 37°C e uma aumento de UFC nos expostos à temperatura ambiente (*post hoc* de Bonferroni,  $p \leq 0,05$  para ambos os casos).

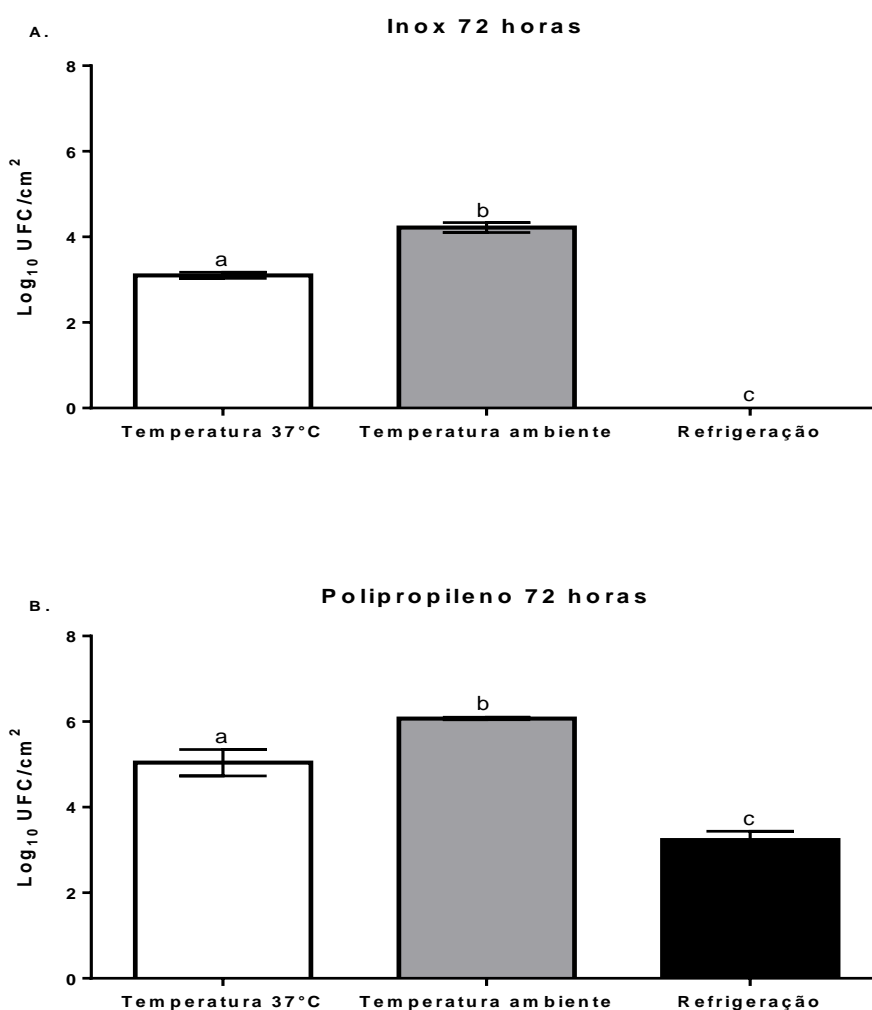


Figura 6. Avaliação de capacidade de formação de biofilme do isolado *L. monocytogenes* QF Oxford, em aço inox (A) e Polipropileno (B) em substrato em leite UHT em temperatura de 37 °C, temperatura ambiente e temperatura de refrigeração por 72 horas. UFC – unidade formadora de colônia. <sup>ab</sup>Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos analisados. Significância fixada em 5% para todas as análises.

## 5.6 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* QF Oxford associada a *P. fluorescens* PL7.1 em aço inox e polipropileno em substrato leite Integral UHT em diferentes temperaturas

Os resultados da capacidade de formação de biofilme em aço inox e polipropileno com duas bactérias associadas (*Listeria monocytogenes* QF Oxford e *Pseudomonas fluorescens* PL7.1) foi avaliada em duas temperaturas de incubação, sendo a temperatura ambiente (Figura 7 A, B) em tempos de 24, 48 e 72 horas e temperatura de refrigeração (Figura 7 C, D) nos tempos de 72, 120 e 168 horas.

As avaliações em 24 horas de incubação nos cupons de aço inox em temperatura ambiente foram: 8,48 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas da *L. monocytogenes* QF Oxford e 7,44 log<sub>10</sub> UFC/mL da *P. fluorescens* PL7.1. As células sésseis foram 3,99 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> da *L. monocytogenes* QF Oxford e 3,54 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> da bactéria *P. fluorescens* PL7.1.

Com as avaliações, a 48 horas de incubação em temperatura ambiente para os cupons de aço inox, obteve-se os seguintes valores: 8,38 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas para *L. monocytogenes* QF Oxford e 8,33 log<sub>10</sub> UFC/mL para *P. fluorescens* PL7.1. Já as células sésseis foram, 4,34 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e 5,23 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>, para as bactérias *L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1, respectivamente. Para 72 horas de incubação, os valores foram 7,83 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas para *L. monocytogenes* QF Oxford e de 8,83 log<sub>10</sub> UFC/mL para *P. fluorescens* PL7.1. Já, as células sésseis foram de 4,84 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e 6,07 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>, para as bactérias *L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1, respectivamente.

Os cupons de Polipropileno quando incubados em temperatura ambiente, por 24 horas, apresentaram valores de, 8,40 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas para *L. monocytogenes* QF Oxford e 7,88 log<sub>10</sub> UFC/mL para *P. fluorescens* PL7.1. As células sésseis foram 5,66 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> *L. monocytogenes* QF Oxford e 5,40 log<sub>10</sub> UFC/mL para *P. fluorescens* PL7.1.

Nas avaliações em 48 horas em temperatura ambiente para os cupons de polipropileno, obtivemos os seguintes valores: 8,45 log<sub>10</sub> UFC/mL de células planctônicas para bactéria *L. monocytogenes* QF Oxford e 8,07 log<sub>10</sub> UFC/mL para bactéria *P. fluorescens* PL7.1. As células sésseis foram 5,46 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> *L. monocytogenes* QF



Oxford de  $6,14 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> *P. fluorescens* PL7.1. Na avaliação de 72 horas, os valores foram  $7,91 \log_{10}$  UFC/mL de células planctônicas para *L. monocytogenes* QF Oxford e  $8,07 \log_{10}$  UFC/mL *P. fluorescens* PL7.1. As células sésseis foram  $5,65 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $6,71 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>, para as bactérias *L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1, respectivamente.

Nas avaliações em temperatura de refrigeração, em 72 horas de incubação os valores para os cupons de aço inox, foram  $5,10 \log_{10}$  UFC/mL de células planctônicas para *L. monocytogenes* QF Oxford e  $6,81 \log_{10}$  UFC/mL para *P. fluorescens* PL7.1. As células sésseis da *L. monocytogenes* QF Oxford não foram recuperadas em 72 horas de incubação. Já as células sésseis de *P. fluorescens* PL7.1 tiveram os valores de  $4,40 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>.

Os valores para as análises em 120 horas em cupons de inox na temperatura de refrigeração, foram de  $7,13 \log_{10}$  UFC/mL de células planctônicas para *L. monocytogenes* QF Oxford e  $7,86 \log_{10}$  UFC/mL para *P. fluorescens* PL7.1. Já as células sésseis foram  $3,04 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $4,49 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> para *L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1, respectivamente. Avaliando-se em 168 horas de incubação, obteve-se  $7,85 \log_{10}$  UFC/mL de células planctônicas para *L. monocytogenes* QF Oxford e  $8,33 \log_{10}$  UFC/mL para *P. fluorescens* PL7.1. Os valores das células sésseis foram  $3,85 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $4,73 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>, para as bactérias estudadas (*L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1, respectivamente).

Os cupons de polipropileno, quando incubados a temperatura de refrigeração, por 72 horas, os valores foram  $4,36 \log_{10}$  UFC/mL de células planctônicas para *L. monocytogenes* QF Oxford e  $6,35 \log_{10}$  UFC/mL *P. fluorescens* PL7.1. As células sésseis da *L. monocytogenes* QF Oxford não foram recuperadas em 72 horas de incubação, já as células sésseis de *P. fluorescens* PL7.1 apresentaram valores de  $5,60 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> neste período de incubação.

Com 120 horas de incubação em temperatura de refrigeração, os valores em cupons de polipropileno foram de  $5,51 \log_{10}$  UFC/mL de células planctônicas para *L. monocytogenes* e de  $7,04 \log_{10}$  UFC/mL para *P. fluorescens*. As células sésseis foram  $2,89 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> para *L. monocytogenes* e de  $5,77 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> para *P. fluorescens*. Os resultados obtidos nas avaliações de 168 horas, mostraram valores de  $6,36 \log_{10}$  UFC/mL de células planctônicas para *L. monocytogenes* QF Oxford e  $7,04 \log_{10}$  UFC/mL para *P. fluorescens* PL7.1. Os valores das células sésseis foram  $3,82 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> e

5,70  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>. *L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1, respectivamente.

Observou-se um maior  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford em 24 horas em inox e temperatura ambiente em relação ao grupo *P. fluorescens* PL7.1 (Teste t de Student para amostras independentes, p=0,028), e um aumento em 72 horas em inox e temperatura ambiente do grupo *P. fluorescens* PL7.1 em relação ao grupo *L. monocytogenes* QF Oxford (Teste t de Student para amostras independentes, p=0,028) (Figura 7A). Similarmente, em polipropileno e temperatura ambiente, o grupo *P. fluorescens* PL7.1 apresentou maior  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> em 72 horas (Teste t de Student para amostras independentes, p=0,038) (Figura 7B). Em inox e temperatura de refrigeração, o grupo *P. fluorescens* PL7.1 apresentou maior  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> em 72 horas (Teste t de Student para amostras independentes, p≤0,0001) (Figura 7C). Em polipropileno e temperatura de refrigeração, o grupo *P. fluorescens* PL7.1 apresentou maior  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> em 72, 120 e 168 horas (Teste t de Student para amostras independentes, p=0,003, p=0,022, p=0,001, respectivamente) (Figura 7D).

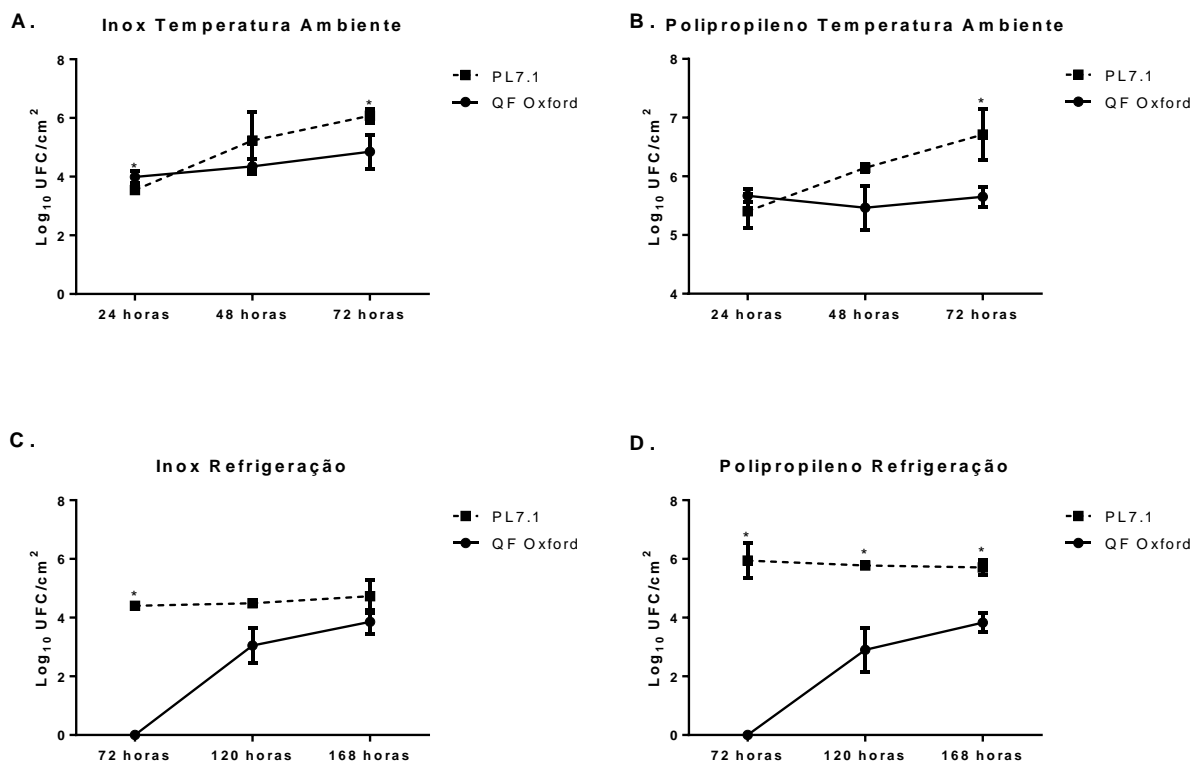


Figura 7. Avaliação de capacidade de formação de biofilme com associação de *L. monocytogenes* QF Oxford, e *P. fluorescens* PL7.1 em aço inox (A) e Polipropileno (B)

em substrato em leite UHT em temperatura ambiente (A, B) em 24,48,72 horas e temperatura de refrigeração 72,120,168 horas (C, D). UFC – unidade formadora de colônia. \*Diferença estatística entre os grupos analisados. Significância fixada em 5% para todas as análises.

Em 72 horas na superfície inox, um efeito de grupo (ANOVA de duas vias,  $F(1,10) = 233,831$ ,  $p \leq 0,0001$ ) foi observado, sendo a média de  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *P. fluorescens* PL7.1 maior que a do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford. Um efeito da temperatura (ANOVA de duas vias,  $F(1,10) = 233,831$ ,  $p \leq 0,0001$ ) foi observado, sendo a média de  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo em temperatura ambiente maior que em temperatura de refrigeração. Adicionalmente, uma interação entre os efeitos de grupo e de temperatura foi observada (ANOVA de duas vias,  $F(3,8) = 207,129$ ,  $p \leq 0,0001$ ), onde o grupo *P. fluorescens* PL7.1 em temperatura ambiente apresentou uma maior média de  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> em relação aos demais grupos, e o grupo *L. monocytogenes* QF Oxford em refrigeração, uma menor média de  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> em relação aos demais grupos, não apresentando diferença entre o grupo *L. monocytogenes* QF Oxford em temperatura ambiente e o grupo *P. fluorescens* PL7.1 em temperatura de refrigeração (post hoc de Bonferroni,  $p \leq 0,05$  para todas as análises) (Figura 8A). Já na superfície polipropileno, em 72 horas, um efeito do grupo (ANOVA de duas vias,  $F(1,10) = 257,728$ ,  $p \leq 0,0001$ ), sendo a média de  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *P. fluorescens* PL7.1 maior que a do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford. Um efeito da temperatura (ANOVA de duas vias,  $F(1,10) = 217,017$ ,  $p \leq 0,0001$ ) foi observado, sendo a média de  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo em temperatura ambiente maior que em temperatura de refrigeração. Adicionalmente, uma interação entre os efeitos de grupo e de temperatura foi observada (ANOVA de duas vias,  $F(3,8) = 199,982$ ,  $p \leq 0,0001$ ), onde o grupo *L. monocytogenes* QF Oxford em temperatura de refrigeração apresentou uma menor média de  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> em relação aos demais grupos (post hoc de Bonferroni,  $p \leq 0,05$  para todas as análises) (Figura 8B).

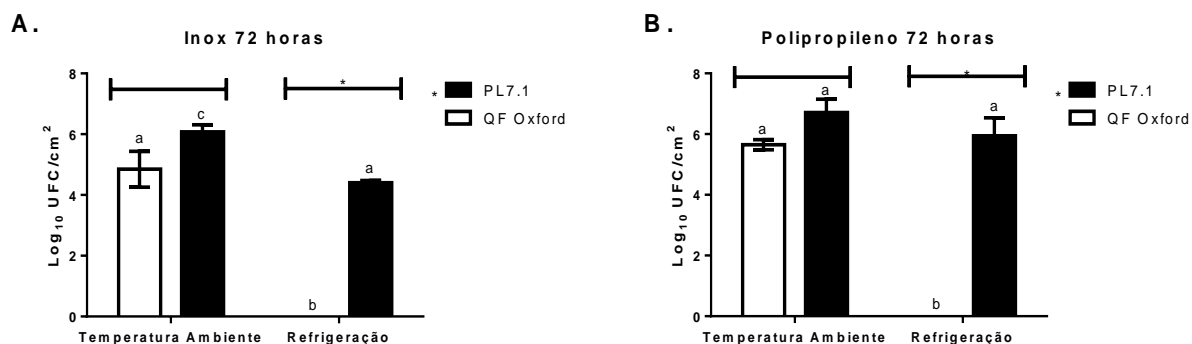


Figura 8. Avaliação de capacidade de formação de biofilme com associação de *L. monocytogenes* QF Oxford, e *P. fluorescens* PL7.1 em aço inox (A) e Polipropileno (B) em substrato em leite UHT em temperatura ambiente e refrigeração 72 em horas. UFC – unidade formadora de colônia. \*Diferença estatística entre os grupos analisados. <sup>ab</sup>Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos analisados. Significância fixada em 5% para todas as análises.

### 5.7 Avaliação do sanitizante na erradicação do biofilme em aço inox

Os isolados testados nesta fase foi com associação das duas espécies bacterianas, *L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1 em aço inox com substrato leite integral com incubação de 72 horas em temperatura ambiente. Após a incubação os cupons de aço inox contendo 4,23 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis da bactéria *L. monocytogenes* QF Oxford e 5,46 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis da bactéria *P. fluorescens* PL7.1 foram imersos nos dois tipos de sanitizante, ácido peracético e hipoclorito de sódio. Transcorrido o tempo da aplicação, foi realizada a contagem das células sésseis por diluições decimais, aos quais não foi recuperado nenhuma célula viável.

Em 72 horas na bactéria *L. monocytogenes* QF Oxford, um efeito de grupo (ANOVA de uma via, F(4,9) = 2686,580, p ≤ 0,0001) foi observado, sendo a média de log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford maior que a da água estéril (controle) e todas maiores que os sanitizante (ácido peracético e hipoclorito de sódio) (*post hoc* de Bonferroni, p ≤ 0,05) (Figura 9A). O mesmo efeito foi evidenciado em 72 horas na bactéria *P. fluorescens* PL7.1 sendo a média de log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo PL7.1 (ANOVA de uma

via,  $F(4,9)=8811,621$ ,  $p \leq 0,0001$ , *post hoc* de Bonferroni,  $p \leq 0,05$ ) (Figura 9B).

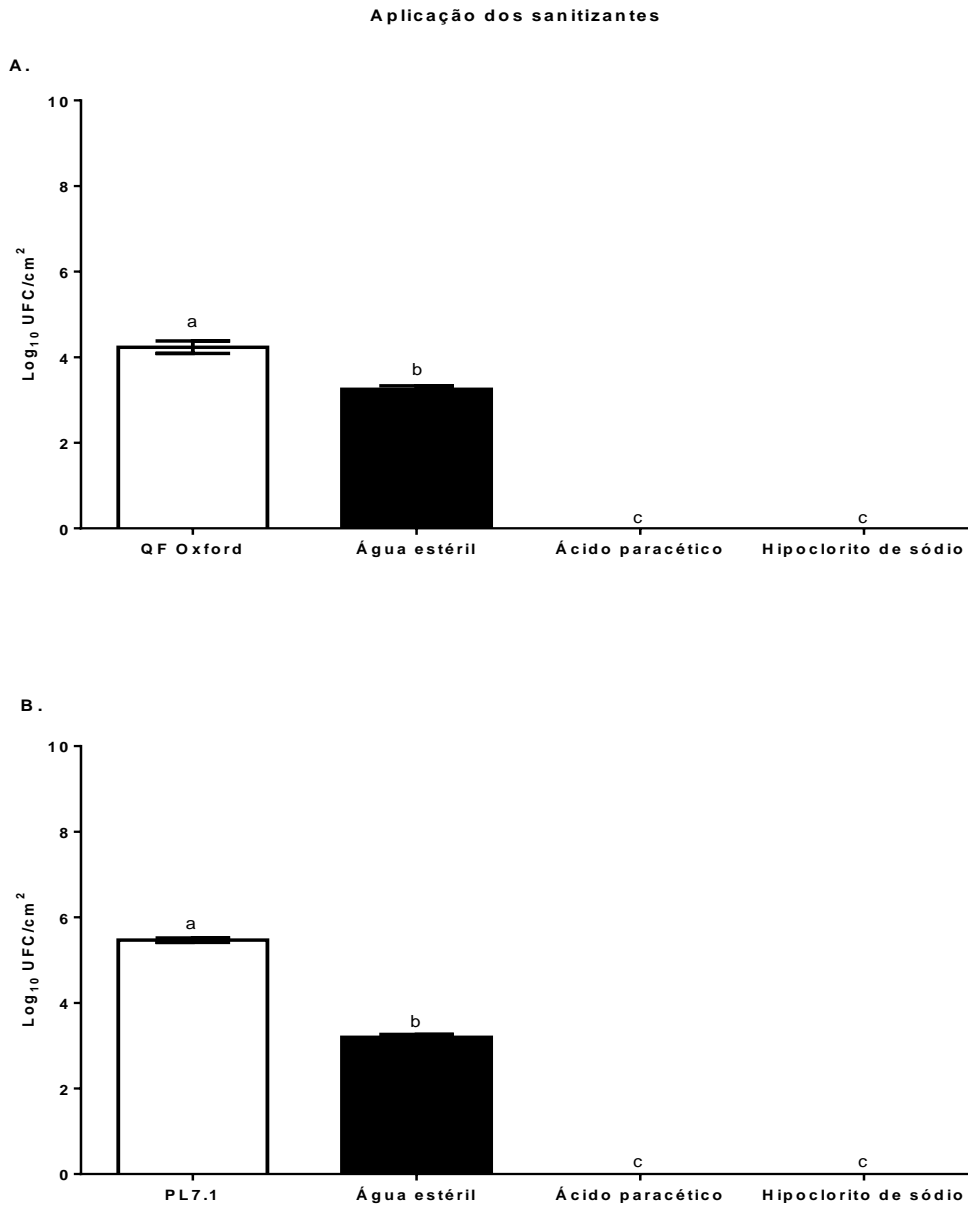


Figura 9. Avaliação da ação dos sanitizante (C) ácido peracético (0,2%) e hipoclorito de sódio (% 2,0 – 2,5 p/p) por 10 minutos sobre as células aderida e biofilmes de *L. monocytogenes* QF Oxford (A), e *P. fluorescens* PL7.1 (B) em aço inox em 72 horas a temperatura ambiente com substrato leite integral UHT. UFC – Unidades formadora de colônia. <sup>ab</sup>Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos analisados. Significância fixada em 5% para todas as análises.

## 6. DISCUSSÃO

O gênero *Listeria* sp. compreende bactérias psicrotolerantes, que condescendem uma variedade de condições estressantes, por estas circunstâncias os alimentos podem ser os principais veiculadores deste micro-organismos (Pasonen et al., 2019; Silva et al., 2020; Rossi et al., 2020).

O presente estudo, analisou espécies de *Listeria* sp. a partir de amostras de alimentos, fatiados e superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambreteria no município de Porto Alegre- RS e identificou-se três espécies de *Listeria* sp. Neste grupo de isolados, foram avaliados a susceptibilidade a antimicrobianos, o potencial de formação de biofilme bem como a aplicação de dois produtos de sanitização.

Em nosso estudo identificamos quatro espécies de *L. monocytogenes*, quatro de *L. innocua* e quatro pertencentes a espécie *L. seeligeri*. A ocorrência destas bactérias em alimentos prontos para consumo ou em locais, como bancadas de manipulação indica que as medidas de segurança para prevenir a contaminação devem ser melhoradas imediatamente. As espécies de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seelegeri* são relatadas por outros trabalhos identificando estes micro-organismos em amostras semelhantes ao presente estudo (Skowron et al., 2019; Osman et al., 2020; Gwida et al., 2020). No Brasil, Pessoa et al. (2020) descreveram a presença de *Listeria* sp. em salames do tipo Italiano, prontos para consumo. De Souza et al. (2020) relataram a presença de *L. monocytogenes* e *L. innocua* em isolados de carcaça de frango. Estes dados reforçam os resultados do presente estudo e indicam possíveis falhas no processo de produção e processamento do alimento. Assim alertam para os cuidados de manipulação dos alimentos a fim de evitar a contaminação do produto final.

Para a maioria das infecções causadas por *L. monocytogenes* o tratamento de escolha é a ampicilina ou a penicilina. No entanto, pode ser utilizado eritromicina, gentamicina ou substituído por sulfametoxazol-trimetoprima (sulfazotrim) (Beckerleg et al., 2017; Durán-Garrido et al., 2020; Rzepniewski et al., 2020). Na avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos, dos oito antimicrobiano testados, os mais utilizados no controle da infecção causada por este micro-organismo, demonstraram-se eficientes na eliminação desta bactéria. Já no perfil de resistência observamos que, (66,6%) dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado,

sendo a clindamicina (2 µg) e sulfazotrim (25 µg).

A resistência a clindamicina com isolados de *Listeria* sp. também é descrita por outros autores (Escolar et al., 2017; Ha et al., 2017; Oliveira et al., 2018; Arslan & Selin, 2019) os quais reforçam os resultados obtidos no presente estudo. Esta resistência pode ser descrita pela conjugação do plasmídeo IP501 relatado em *Listeria monocytogenes* (Abdollahzadeh et al., 2016; Oliveira et al., 2018; Matereke & Okoh 2020), ou pela presença de genes de resistência *mefA*, *erm*, *Inu A* e *Inu B* relacionados também com à resistência a clindamicina (Escolar et al., 2017; Camargo et al., 2017; Maung et al., 2019).

A resistência a sulfametoxazol-trimetoprima (sulfazotrim 25 µg) é importante por ser o medicamento de segunda opção em pacientes alérgicos a penicilinas (Demoliner et al., 2015; Olaimat et al., 2018; Sanlıbaba et al., 2018). Esta resistência é descrita como sendo relacionada a aquisição de genes que codificam dihidrofolato redutases resistentes a trimetoprim (*dhfrD*, *dhfrG* *dhfrI*) e estes conferem mutações genéticas, habilitam níveis altos de resistência, além da transferência conjugativa do transposon *Tn6198* que codifica a resistência ao trimetoprim entre *Enterococcus faecalis* e *L. monocytogenes* (Olaimat et al., 2018; Baquero et al., 2020).

Em estudo realizado por Osman et al. (2016) avaliou-se a resistência antimicrobiana de *Listeria* sp. observou-se que a susceptibilidade dos isolados variou entre 84,2 e 100% para a maioria dos antimicrobianos. Os isolados de *Listeria* sp. foram resistentes uma faixa considerável de antibióticos incluindo penicilina. Este dado foi diferente dos encontrados no presente estudo, sendo concordante nos antimicrobianos clindamicina e sulfazotrim contudo a resistência a penicilina não foi observada.

Skowron et al. (2019) descreveram sensibilidade em todas as espécies de *L. innocua* aos antimicrobianos testados. Por outro lado, entre os isolados de *L. monocytogenes*, relatou-se resistência à penicilina e a eritromicina. Estes resultados diferem do presente estudo, pois os isolados foram sensíveis a penicilina e a eritromicina.

No estudo de Gomez et al. (2014), Escolar et al. (2017) e Caruso et al. (2020) avaliaram a sensibilidade a antimicrobianos por *Listeria* sp. isoladas de alimentos (carne, lácteos e superfícies) os quais descreveram resistência à clindamicina como o fenótipo mais comumente identificado. No presente trabalho das 14 (100%) *Listeria* sp. testadas, 11 (79%) apresentaram perfil de sensibilidade intermediária ou resistente a clindamicina. O estudo de Sanlıbaba et al. (2018) relatou-se a resistência a antibióticos de *L.*

*monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo na Turquia, observando a resistência sulfazotrim em aproximadamente 18% dos isolados. No presente estudo, quatro (28%) isolados apresentaram um perfil intermediário ou resistência ao antibiótico sulfazotrim, reforçando os dados encontrados no presente estudo.

Uma forma importante da *Listeria* sp. resistir ao ambiente é o potencial de formação de biofilme. Segundo Lee et al. (2019) mecanismos complexos regulam o crescimento sésil bacteriano e a formação de biofilme representada por etapas de adesão, maturação e dispersão, que é afetada, tanto por fatores intrínsecos, como extrínsecos. Com os resultados obtidos neste trabalho, classificamos os isolados de *Listeria* sp. em não formadores, fracos, moderados e fortes formadores de biofilme. Do grupo de *Listeria monocytogenes*, três apresentaram o perfil de forte formadores de biofilme, no grupo de *L. innocua* todas apresentaram-se como moderados formadores de biofilme, já no grupo das espécies de *L. seeligeri*, três apresentaram perfil de moderado formador de biofilme e uma foi classificada como fraca a capacidade de formação de biofilme em microplaca.

No trabalho de Harvey e Gilmour (2007) foram utilizadas 138 isolados de *L. monocytogenes*, de diversas fontes, como ambientais, alimentos e clínico. Desse total de bactérias, 127 foram avaliadas como fracas, 9 como moderadas e 2 como forte formadores de biofilme de acordo com a classificação da técnica da microplaca em meio de cultura TSB. Estes dados corroboram com os encontrados no presente estudo, contudo no presente estudo a maioria (10 de 14) das bactérias apresentaram um perfil de moderado formador de biofilme. Segundo Nilsson et al. (2011) o ensaio utilizando o método da microplaca é uma medida reprodutível de adesão celular e produção de biofilme quando usados dentro dos parâmetros da aplicação, ou seja, avaliação comparativa indireta de adesão bacteriana irreversível na produção de biofilme e, subsequentemente, medição de biofilme *in vitro*.

No estudo conduzido por Dygico et al. (2020) classificou-se a capacidade de formação de biofilme em microplaca de 73 dos isolados de *L. monocytogenes*, estas exibiram níveis variados de formação de biofilme, variando entre fraco, moderado e forte, dados também observados no presente estudo. Já Osman et al. (2020) relataram que todos os isolados *L. monocytogenes* apresentaram perfil de forte formador de biofilme em microplaca. Estes dados diferem dos apresentados neste estudo. Contudo a capacidade da *Listeria* sp. em formar biofilme depende da presença de genes *LIP*-



1, *hly* e *prf* A, podendo ser este fator de diferença nos resultados (Price et al., 2018; Manso et al., 2019).

Um parâmetro importante para determinar se há adesão bacteriana ou formação de biofilme maduro, é o número de micro-organismos presentes na superfície. Segundo Wiktorczyk et al. (2018) e Alonso & Kabuki (2019) contagens acima  $5 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> são considerado com biofilme maduro. A formação de biofilmes acima destes valores é relatada também por outros trabalhos (Castro et al., 2017; Ramires et al., 2021).

No presente estudo observamos que as três *L. monocytogenes* (4B, ATCC 35152 e QF Oxford) que demonstraram esta capacidade de formar biofilme no teste da microplaca foram capazes de formar biofilme em 24 horas de incubação, em meio de cultura TSBYE a 37 °C, tanto em cupons de aço inox quanto em cupons de polipropileno.

Um estudo descrito por Alonso & Kabuki (2019) onde foi avaliado biofilme em aço inox de espécies de *L. monocytogenes* isoladas de laticínios e fábricas de laticínios, demonstraram que os biofilmes de espécies únicas se formaram após 24 horas de incubação para *L. monocytogenes* ( $5,39 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) em meio de cultura BHI. O presente estudo encontrou valores semelhantes utilizando o meio de cultura TSBYE para os isolados de *L. monocytogenes* (4B, ATCC 35152 e QF Oxford) com população de ( $5,20$ ;  $5,41$  e  $5,38 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) em cupons de aço inox e ( $6,23$ ;  $6,55$  e  $7,03 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) em cupons de polipropileno.

A fim de avaliar a capacidade de formar biofilme em aço inox por *Listeria monocytogenes*, isolado de alimentos em estabelecimentos especializados em sushi, Ramires et al. (2021) observaram que as contagens de células sésseis variaram entre  $6,4$  e  $7,2 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> em 24 horas de incubação, sendo que todos os isolados produziram biofilme em superfícies de aço inoxidável a 37 °C, utilizando o meio de cultura TSBYE. Estes dados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

Bonsaglia et al. (2014) avaliaram 30 isolados previamente de ambientes de processamento de leite, vegetais e alimentos, na temperatura de 35 °C e após 24 horas em aço inox, os isolados produziram biofilme, mas em 48 e 72 horas o número de células foi reduzido em 62,5% e 81,3%, respectivamente. Estes dados foram observados com o presente trabalho, em cupons de aço inox, onde os três isolados de *Listeria monocytogenes* (4B, ATCC 35152 e QF Oxford) avaliadas apresentaram esta capacidade de formar biofilme em temperatura semelhante em 24 horas de incubação com substrato meio de cultura. Contudo a *L. monocytogenes* ATCC 35152 obteve

diminuição de células sésseis ao decorrer do tempo com diferença foi significativa em 72 horas de avaliação.

Ripolles-Avila et al. (2019) e Skowron et al. (2019) analisaram diferentes isolados de *L. monocytogenes*, avaliando a capacidade em biofilme em aço inox, com valores da população celular semelhante aos descritos no presente estudo.

Os substratos como os meios de cultura podem inibir ou favorecer o crescimento de micro-organismos e alterar a composição do biofilme, dependendo das estruturas químicas envolvidas da matriz (Bassi et al., 2017). Neste estudo avaliamos a capacidade da *L. monocytogenes* em formar biofilme na matriz alimentar leite integral UHT, onde observamos uma adesão bacteriana nos cupons testados.

Alonso & Kabuki (2019) observaram uma redução de aproximadamente 1  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> na quantidade de células sésseis em 24 horas, na proteína do soro de leite, *L. monocytogenes* com 4,36  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>, quando comparada ao o substrato meio de cultura 5,39  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>. Uma redução de 1,93 e 1,96  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> foi observada no presente estudo com valores para *L. monocytogenes* QF Oxford a 37°C em cupons de aço inox de 5,38  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> e cupons de polipropileno de 7,03  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis em 24 horas no meio de cultura. Quando comparado a matriz alimentar leite integral UHT as células sésseis no aço inox foram 3,45  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> e 5,07  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> em cupons de polipropileno. Essa redução em  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> pode ser atribuída a proteína do leite devido a sua composição em disputar o mesmo local na superfície do aço inox, influenciando a capacidade de adesão bacteriana (Bassi et al., 2017; Alonso et al., 2020). Portanto a diferença nos valores relacionados aos cupons, podem ser influenciadas pela superfície do mesmo, pois o crescimento de *L. monocytogenes* depende das propriedades da superfície, incluindo umidade, topografia, disponibilidade de nutrientes, entre outros fatores (Marik et al., 2020; Dygico et al., 2020).

O fator da temperatura também é um influenciador importante. Observamos que a *L. monocytogenes* QF Oxford apresentou melhor desenvolvimento em temperatura ambiente, em ambas as superfícies. Houve uma redução na taxa de  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> pela exposição à temperatura de refrigeração, uma manutenção intermediária desta taxa no grupo exposto à 37°C. A temperatura em torno de 30°C foi relatada como a de maior contagem de células sésseis por Mendez et al. (2020) em materiais de inox e policarbonato. O policarbonato é um material semelhante ao polipropileno da família dos polímeros (Ginzburg et al., 2020). Este fator é influenciado pela motilidade, expressada

em *Listeria monocytogenes* em temperaturas próximas ao ambiente, e reduzida quando expostas em temperaturas de 37°C (Mendez et al., 2020; Muchaamba et al., 2021).

Em temperatura ambiente os valores do presente estudo apresentados em meio de cultura leite UHT nos tempos de 24, 48, 72 horas foram 3,99, 4,23 e 4,22 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis em inox e 5,23, 5,85, 6,03 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> em polipropileno respectivamente. Esses dados são semelhantes ao apresentado por Dygico et al. (2020) em inox, polipropileno, alumínio, vidro, rede, nullatarp, concreto selado, policarbonato e borracha avaliados em 48 horas em ambos os materiais em temperaturas próximas (25°C) obtiveram valores entre 4,2 a 5,3 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>.

A interação cooperativa entre espécies bacterianas, pode alterar a composição da matriz do biofilme aumentando a resistência, a biomassa do biofilme formado, aderência ou apresentar um ambiente de competição microbiana. Entender o desenvolvimento de biofilme de espécies mistas aumenta as chances de desenvolver novas ferramentas para erradicar esses biofilmes (Chen et al., 2019; Govaert et al., 2019; Fagerlund et al., 2020).

No presente estudo com cultivo associado em substrato leite UHT observamos a adesão celular em superfície de aço inox pela espécie *L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1, nos tempos de 24, 48 e 72 horas em temperatura ambiente. Em polipropileno foi possível observar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* QF Oxford nos tempos e temperaturas mencionadas. A *P. fluorescens* PL7.1 apresentou adesão celular em 24 horas em aço inox e formou biofilme após 48 horas de incubação para ambas as superfícies testadas.

Alonso et al. (2020) avaliaram as interações em biofilmes de duas espécies, onde foram analisadas na presença de *B. cereus* produtor de substância antagônica e *B. cereus* não produtor de substância antagônica para *L. monocytogenes*. O estudo mostrou que a *L. monocytogenes* apresentou aderência ao aço inox com contagens entre 1,70 e 1,39 log UFC/cm<sup>2</sup> o que não é considerado formação de biofilme, quando em crescimento com a espécie produtor de substância antagonista. Por outro lado, ocorreu cooperação de crescimento e formação de biofilme, apresentando contagens entre 6,04 e 5,49 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>.

Maggio et al. (2021) avaliaram as interações entre *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* em biofilmes, os resultados mostraram que *L. monocytogenes* foi capaz de aderir à superfície de aço inox. Em condições de multiespécies, e ao longo do período a

quantidade de células sésseis da *L. monocytogenes* obteve um decaimento, por outro lado não influenciaram o nível populacional de *P. fluorescens*.

No presente estudo quando avaliamos as culturas mistas em temperatura de refrigeração em 72, 120 e 168 horas, observamos que no decorrer do tempo as células sésseis de *L. monocytogenes* se mantiveram inferiores a *P. fluorescens* nesta temperatura estudada.

Bogo et al. (2020) avaliaram a formação de biofilme em aço inox e em polipropileno a temperaturas de 7°C, 23°C e 30°C por 24, 48 e 72 horas em duas espécies de bactérias psicrotróficas. Na avaliação das células sésseis, foi observado que ambas as culturas de *Pseudomonas fluorescens*, foram capazes de aderir a ambos os tipos de superfícies. A contagem de células bacterianas aderentes à superfície de polipropileno foi maior do que aquelas aderentes ao aço inox para ambos os isolados, isso em decorrência do tipo de superfície dos materiais testados. Estes resultados corroboram com os encontrados no presente estudo. Porém, Bogo et al. (2020) não observaram diferença entre os tempos e as temperaturas testadas, demonstrando que as duas espécies podem aderir aos cupons.

As práticas sanitárias nos ambientes de produção de alimentos visam a eliminação de micro-organismos que possam ser patogênicos ou deteriorantes dos alimentos. As soluções à base de cloro, como o hipoclorito e o ácido peracético são os desinfetantes amplamente utilizados como sanitizantes em indústria de alimentos (Demoliner et al., 2015; Aryal & Peter 2019). Deste modo o presente trabalho avaliou a eficácia dos sanitizantes ácido peracético e hipoclorito de sódio na erradicação de células sésseis e de biofilme em cultivo associado. Estes dois produtos foram eficazes quando aplicados por 10 minutos, em cupons contendo 4,23 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis da bactéria *L. monocytogenes* QF Oxford e 5,46 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis da *P. fluorescens* PL7.1.

Dhowlaghar et al. (2018) e Aryal & Peter. (2019) avaliaram a eficiência de desinfetantes incluindo hipoclorito e ácido peracético e descreveram que hipoclorito em baixa concentração é ineficaz na camada orgânica do biofilme, já o ácido peracético aplicado por 5 minutos em superfícies pode ser eficaz na redução de biofilmes formados, ou ainda a utilização em conjunto de desinfetantes, como compostos de amônio quaternário com peróxido de hidrogênio ou ácido peracético com peróxido de hidrogênio para obtenção de eficiência completa. Lee et al. (2019) avaliaram ácido peracético em

biofilmes formados por *Listeria monocytogenes* isoladas de uma fábrica de processamento de queijo, brasileira, indicando a eficiência deste sanitizante em biofilmes formados em aço inox. Resultados semelhantes foram observados neste estudo, indicando que a aplicação por 10 minutos foi eficaz na eliminação de células aderidas de *L. monocytogenes* e biofilmes de *P. fluorescens* em cultivo associado.

Os isolados de *Listeria* sp. obtidos, mostraram-se como persistentes, com capacidade de adesão e formação de biofilme em superfície usadas nas indústrias de alimentos (aço inox e polipropileno). Além disso, demonstraram ser resistente a alguns antimicrobianos podendo representar risco para os consumidores.

## 7. CONCLUSÃO

Este estudo identificou três espécies de isoladas de produtos de origem animal, fatiados e superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambreteria. As espécies identificadas foram: *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. seeligeri*, sendo que na susceptibilidade a antimicrobiano das espécies avaliadas, observamos que todos os isolados são sensíveis aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções causadas por *L. monocytogenes*. Contudo (66,6%) apresentaram resistência a clindamicina ou a sulfazotrin. A pesquisa demonstrou que, os isolados de *Listeria* sp. exibiram níveis variados de formação de biofilme, entre fraco, moderado e forte formador de biofilmes *in vitro*.

A *L. monocytogenes* 4B, *L. monocytogenes* ATCC 35152 e *L. monocytogenes* QF Oxford, demonstraram capacidade de formar biofilme em cupons de aço inox e polipropileno com substrato meio de cultura TSBYE além disso a *L. monocytogenes* QF Oxford demonstrou capacidade de adesão em cupons, utilizando substrato de leite integral UHT e em cultivo de mono-espécie ou em cultivo associado a *Pseudomonas fluorescens* PL7.1 em diferentes temperaturas.

Os sanitizantes ácido peracético na concentração de 0,2% e hipoclorito de sódio (% 2,0 – 2,5 p/p), demonstraram eficiência na erradicação de células sésseis e biofilme em aço inox, quando aplicados por aplicado por 10 minutos.

As superfícies e os alimentos quando manipulados de forma inadequada podem abrigar estes microrganismos, e como potencial formadoras de biofilmes aumentam a prevalência de *Listeria* sp. nestes locais, tornando assim motivo de preocupação para o setor de alimentos.

## 8. REFERÊNCIAS

- Abdollahzadeh E, Ojagh SM, Hosseini H, Ghaemi EA, Irajian G, Naghizadeh Heidar M. 2016. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and humans in Iran. *Microb Pathog.* 100: 70 -74.
- Ahmed JK, Freitag NE. 2016. Secretion Chaperones PrsA2 and HtrA Are Required for *Listeria monocytogenes* Replication following Intracellular Induction of Virulence Factor Secretion. *Infect Immun.* 84 (10): 3034-3046.
- Aksono EB, Riwu K, Estoepangestie A, Pertiwi H. 2020. Phylogenetic Analysis and Antibiotics Resistance of *Listeria Monocytogenes* Contaminating Chicken Meat in Surabaya, Indonesia. *Veterinary medicine international*, 20 (1):1-7.
- Allam M, Tau N, Smouse SL, Phillip S, Mtshali F, Mnyameni Z, Khumalo TH, Arshad I, Nevashan G, Juno T, Smith AM. 2018. Whole-Genome Sequences of *Listeria monocytogenes* Sequence Type 6 Isolates Associated with a Large Foodborne Outbreak in South Africa, 2017 to 2018. *Genome Announc.* 6(25): e00538-18.
- Almeida RM de, Barbosa AV, Lisbôa RC, Santos AFM, Hofer E, Vallim DC, Hofer CB. 2017. "Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil." *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 21: 282-289.
- Alonso VPP, Kabuki DY. 2019. "Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates." *International Journal of Dairy Technology* 72.3: 472-478.
- Alonso, Perez VP, Harada A, Miho MKDY. 2020. Competitive and/or cooperative interactions of *Listeria monocytogenes* with *Bacillus cereus* in dual-species biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 177.
- Alvarez-Molina A, Cobo-Díaz JF, López M, Prieto M, de Toro M, Alvarez-Ordóñez. 2021. "Unraveling the emergence and population diversity of *Listeria monocytogenes* in a

- newly built meat facility through whole genome sequencing." *International Journal of Food Microbiology* 340: 109043.
- Andrade JM, Moura FML, Silva TMSS, Medeiros ES. 2019. *Listeria monocytogenes* in ham sliced in supermarkets in Recife city, Pernambuco state. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.86, 1-4, e0652018.
- Arslan S & Selin B. 2019. "Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species and subtyping and virulence factors of *Listeria monocytogenes* from retail meat." *Journal of Food Safety* 39.1: e12578.
- Aryal M & Peter MM. 2019. "Efficacy of commercial sanitizers used in food processing facilities for inactivation of *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157: H7, and *Salmonella* biofilms." *Foods* 8.12: 639
- Baba H, Kanamori H, Kakuta R, Sakurai H, Oshima K, Aoyagi T, Kaku M. 2021. Genomic characteristics of *Listeria monocytogenes* causing invasive listeriosis in Japan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 99, n. 3, p. 115233.
- Ballom KF, Tsai HC, Taylor M, Tang J, Zhu MJ. 2020. Stability of *Listeria monocytogenes* in non-fat dry milk powder during isothermal treatment and storage. *Food Microbiology*, 87, 103376.
- Baquero F, Lanza VF, Duval M, Coque TM. 2020. Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 113 (3):570-579.
- Bassi D, Cappa F, Gazzola S, Orrù L, Cocconcelli PS. Biofilm Formation on Stainless Steel by *Streptococcus thermophilus* UC8547 in Milk Environments Is Mediated by the Proteinase PrtS. 2017. *Appl Environ Microbiol.*83(8):e02840-16.
- Bayoumi MA, Kamal RM, Abd El Aal SF, Awad EI. 2012. Assessment of a regulatory sanitization process in egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms. *Int J Food Microbiol.* 158(3):225-31



- Beckerleg W, Keskar V, Karpinski J. 2017. Peritonitis as the First Presentation of Disseminated Listeriosis in a Patient on Peritoneal Dialysis - a Case Report. *Peritoneal Dialysis International*, v. 37, n. 2, p. 239-240.
- Beltrame CA, Martelo EB, Mesquita RA, Barbosa J, Steffens C, Toniiazso G, Valduga E, Cansian RL. 2015. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to cutting board surfaces and removal by different sanitizers. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, v. 10, n. 1, p. 41-47.
- Bergholz TM, Shah MK, Burall LS, Rakic-Martinez M, Datta AR. 2018. Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 3475–3485.
- Bogo M, Costa GA, Frazzon APG, Motta ASM. 2020. Evaluation of the adhesion potential of psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw buffalo milk: Simulating storage conditions. *Buffalo Bulletin*, v. 39, n. 2, p. 215-228.
- Bonsaglia ECR, Silva NCC, Fernandes Júnior S, Araújo Júnior JP, Tsunemi MH, Rall VLM. 2014 "Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures." *Food control* 35.1: 386-391.
- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Douglas RC. 2003. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *American Society for Microbiology*. 69(12): 7336-7342.
- Braga V, Vázquez S, Vico V, Pastorino V, Mota MI, Legnani M, Schelotto F, Lancibidad G, Varela G. 2017. Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 689-694.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa, Nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos.

Diário oficial da União. Edição, 249. Seção, 1. Página, 133.

Buchanan RL, Leon GM, Gorris M, Hayman M, Timothy CJ, Richard C. 2017. "A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments." *Food control* 75: 1-13.

Bucur FI, Grigore-Gurgu L, Crauwels P, Riedel CU, Nicolau AI. 2018. "Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments." *Frontiers in microbiology* 9: 2700.

Camargo AC, Woodward JJ, Call DR, Nero LA. 2017. "*Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario." *Foodborne Pathogens and Disease* 14.11: 623-636.

Camargo, AC, Vallim DC, Hofer E, Nero LA. 2016. "Molecular serogrouping of *Listeria monocytogenes* from Brazil using PCR." *Journal of food protection* 79.1: 144-147.

Caruso M, Fraccalvieri R, Pasquali F, Santagada G, Latorre LM, Difato LM, Miccolupo A, Normanno G, Parisi A. 2020. "Antimicrobial susceptibility and multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* isolated over 11 years from food, humans, and the environment in Italy." *Foodborne pathogens and disease* 17.4: 284-294.

Castro MR, Fernandes MG, Kabuki DY, Kuaye AY. 2017. "Biofilm formation on stainless steel as a function of time and temperature and control through sanitizers." *International Dairy Journal* 68: 9-16.

Chen P, Wang JJ, Hong B, Tan L, Yan J, Zhang Z, Zhao Y. 2019. Characterization of Mixed-Species Biofilm Formed by *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 2543(10), 1-15.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical

- devices. J Clin Microbiol. 22(6), 996-1006.
- Chusri S, Phatthalung PN, Voravuthikunchai SP. 2012. Anti-biofilm activity of *Quercus infectoria* G. Olivier against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology. 54(6): 511-7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: CLSI.
- Colagiorgi A, Di Ciccio P, Zanardi E, Ghidin S, Ianieri A. 2016. "A look inside the *Listeria monocytogenes* biofilms extracellular matrix." Microorganisms 4(3): 22.
- Cooper AL, Carrillo CD, Deschênes M, Blais BW. 2021. "Genomic Markers for Quaternary Ammonium Compound Resistance as a Persistence Indicator for *Listeria monocytogenes* Contamination in Food Manufacturing Environments." Journal of Food Protection 84.3: 389-398.
- Demoliner F, Damasceno K, Oliveira D, Hallal E, Mello J, Lameiro K, Gandra E. 2015. "Resistance to disinfectants and antibiotics of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* spp. biofilms on polystyrene and stainless steel." African Journal of Microbiology Research 9.27: 1706-1715.
- De Souza COSS, Roça RO, Pinto JPAN, Sakate RI, Matos AVR, Moura. GF. 2020. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em frangos alternativos. Brazilian Journal of Developmental 6: 6. 34791-34804.
- Dhowlaghar N, Abeysundara PA, Nannapaneni R, Schilling MW, Chang S, Cheng WH, Sharma CS. 2018. Growth and Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* in Catfish Mucus Extract on Four Food Contact Surfaces at 22 and 10°C and Their Reduction by Commercial Disinfectants. J Food Prot. 81(1):59-67.
- Durán-Garrido FJ, Gómez-Palomo JM, Estades-Rubio FJ, & Jiménez-Garrido C. 2020.

- Infección por *Listeria monocytogenes* en paciente con sarcoma pélvico. Rev.Esp Casos Clin Med Intern (RECCMI), 2: 81-83.
- Dygico LK, Gahan CG, Grogan H, Burgess CM. 2020. The ability of *Listeria monocytogenes* to form biofilm on surfaces relevant to the mushroom production environment. International Journal of Food Microbiology, 317(20), 1-10.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R& Lindqvist R. 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. EFSA Journal, 16(1), e05134.
- El Hag MM, El Zubeir IE, M, Mustafa NE. 2021. Prevalence of *Listeria* species in dairy farms in Khartoum State (Sudan). Food Control, 123, 107699.
- Escolar C, Gómez D, del Carmen Rota García M, Conchello P, & Herrera A. 2017. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from ready-to-eat products of animal origin in Spain. Foodborne pathogens and disease, 14(6): 357-363.
- Eucast- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Breakpoint Tables* v. 9.0, valid from. 2019. Disponible en: <http://www.eucast.org>.
- European Food Safety Authority and European Center for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). 2019. The European Union one health 2018 zoonoses report. EFSA Journal, v. 17, n. 12, p. e 05926.
- Fagerlund A, Heir E, Moretro T, Langsrud, S. 2020. *Listeria monocytogenes* Biofilm Removal Using Different Commercial Cleaning Agents. Molecules Basel, Switzerland, 25(4): 777-792.
- Fagerlund A, Langsrud S, & Møretrø T. 2020. Microbial diversity and ecology of biofilms in food industry environments associated with *Listeria monocytogenes* persistence. Current Opinion in Food Science. 37: 171-178

- Filipello V, Mughini-Gras L, Gallina S, Vitale N, Mannelli A, Pontello M, Decasteli L, Allard Marc W, Brown EW, Lomonaco S. 2020. "Attribution of *Listeria monocytogenes* human infections to food and animal sources in Northern Italy." *Food Microbiology* 89: 103433.
- Lotfollahi L, Chaharbalesh A, Rezaee MA, Hasani A. 2017. Prevalence, antimicrobial susceptibility and multiplex PCR-serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from humans, foods and livestock in Iran. *Microbial pathogenesis*, 107, 425-429.
- Ga-Hee B, Dong-Hyun K . 2016. Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. *Food Microb.* 55(1)47-54.
- Galié S, Gutiérrez CG, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. 2018. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology*. 898(9), 1-18.
- Ginzburg A, Ramakrishnan V, Rongo, L, Rozanski A, Bouyahyi M, Jasinska-Walc L, Duchateau R. 2020. The influence of polypropylene-block/graft-polycaprolactone copolymers on melt rheology, morphology, and dielectric properties of polypropylene/polycarbonate blends. *Rheol Acta* 59, 601–619.
- Gómez D, Azón E, Noelia M, Carramiñana JJ, Rota C, Ariño A, Yangüela J. 2014. "Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment." *Food microbiology* 42 (2014): 61-65.
- Govaert M, Smet C, Walsh JL, Van Impe JFM. 2019. "Dual-species model biofilm consisting of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*: development and inactivation with cold atmospheric plasma (CAP)." *Frontiers in microbiology* 10: 2524.
- Gwida M, Lüth S, El-Ashker M, Zakaria A, El-Gohary F, Elsayed M, Kleta S, Al Dahouk

- S. 2020. Contamination pathways can be traced along the poultry processing chain by whole genome sequencing of *Listeria innocua*. *Microorganisms*, v. 8, n. 3, p. 414.
- Halbedel S, Wilking H, Holzer A, Kleta S, Fischer MA, Lüth S, Flieger A. 2020. Large nationwide outbreak of invasive listeriosis associated with blood sausage, Germany, 2018–2019. *Emerging infectious diseases*, 26(7), 1456.
- Hanson H, Whitfield Y, Lee C, Badiani T, Minielly C, Fenik J, Makrostergios T, Kopko C, Majury A, Hillyer E, Fortuna L, Maki A, Murphy A, Lombos M, Zittermann S, Yu Y, Hill K, Kong A, Sharma D, Warshawsky B. 2019. *Listeria monocytogenes* Associated with Pasteurized Chocolate Milk, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis.* 25(3):581-584.
- Harvey J, Keenan KP, & Gilmour A. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380-392.
- Herod A, Goodridge L, Rohde J. 2019. Recalls of Foods due to Microbial Contamination Classified by Canadian Food Inspection Agency, 2000 a 2017. *Journal of food protection*, v. 82, n. 11, p. 1901-1908.
- Hua Z, Korany AM, El-Shinamy SH, Zhu M-J. 2019. Comparative evaluation of different sanitizers against *Listeria monocytogenes* biofilms on major food-contact surfaces. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 2462, 2019.
- Huang Y, Morvay AA, Shi X, Suo Y, Shi C, Knochel S. 2018. "Comparison of oxidative stress response and biofilm formation of *Listeria monocytogenes* serotypes 4b and 1/2a." *Food Control* 85: 416-422.
- IDF- International Dairy Federation. 2019. Ecology of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Bulletin*, 502/2019, 1-45.
- Jackson KA, Gould LH, Hunter JC, Kucerova Z, Jackson B. 2018. Listeriosis outbreaks associated with soft cheeses, United States, 1998–2014. *Emerging infectious*

diseases, 24(6), 1116.

Jiang X, et al. 2018. "Role of efflux pumps in the in vitro development of ciprofloxacin resistance in *Listeria monocytogenes*." *Frontiers in microbiology* 9: 2350.

Kaptchouang T, Christ-Donald F, Justine, DS, Brandi M, Schiavano G, Giuditta F, Amagliani G, Ateba CN. 2020. "Listeriosis Outbreak in South Africa: A Comparative Analysis with Previously Reported Cases Worldwide" *Microorganisms* 8- 1: 135.

Kim NH & Rhee MS. 2016. Synergistic bactericidal action of phytic acid and sodium chloride against *Escherichia coli* O157:H7 cells protected by a biofilm. *International Journal of Food Microbiology*. 227(16)17-21.

Köseoğlu VK, Heiss C, Azadi P, Topchiy E, Güvener ZT, Lehmann TE, Miller KW, Gomelsky M. 2015. *Listeria monocytogenes* exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation. *Mol Microbiol*. 96(4):728-43.

Kumar S, Parvathi A, George J, Krohne G, Karunasagar I, & Karunasagar I. 2009. A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 527-531.

Labrador M, Giménez-Rota, C, Rota C. 2021. Real-Time PCR Method Combined with a Matrix Lysis Procedure for the Quantification of *Listeria monocytogenes* in Meat Products. *Foods*, v. 10, n. 4, p. 735.

Lee SH, Barancelli GV, Corassini CH, Rosim RE, Coppa CFSC, De Oliveira CAF. 2017. "Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Listeria monocytogenes* strains isolated from a Brazilian cheese processing plant." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 53(3):e00071

Lee SHI, Cappato LP, Corassin CH, Cruz AG, Oliveira CAF. 2016. Effect of peracetic

acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 3, p. 2384-2390.

Lee B-H, Cole S, Badel-Berchoux S, Guillier L, Feliz B, Krezdorn N, Hébraud M, Bernardi T, Sultan I, Piveteaus P. 2019. "Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* strains under food processing environments and pan-genome-wide association study." *Frontiers in Microbiology* 10: 2698.

Lee J, Seo Y, Ha J, Kim S, Choi Y, Oh H, Lee Y, Kim Y, Kang J, Park E, Yoon Y. 2020. "Influence of milk microbiota on *Listeria monocytogenes* survival during cheese ripening." *Food Science & Nutrition* 8.9: 5071-5076.

Liao C, Wang T, Maslov S, Xavier JB. 2020. "Modeling microbial cross-feeding at intermediate scale portrays community dynamics and species coexistence." *PLoS computational biology* 16.8: e1008135.

Lima ICB, Araujo LRS. 2020. A importância da *Listeria monocytogenes* na indústria alimentícia. *Fundamentos e Atualidades em Tecnologia e Inspeção de Alimentos*. p.5-14: Editora In Vivo.

Lungu, Bwalya, et al. 2011. "*Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production." *Foodborne pathogens and disease* 8.5: 569-578.

Lungu B, O'Bryan CA, Muthaiyan A, Milillo SR, Johnson MG, Crandall PG, Ricke SC. 2010. *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. *Foodborne Pathog Dis.* 8(5):569-78.

Luo L, Chen X, Payne M, Cao X, Wang Y, Zhang J, Deng J, Wang H, Zhang Z, Li Q, Lan R, Ye C. 2019. Case report: whole genome sequencing based investigation of maternal-neonatal listeriosis in Sichuan, China. *BMC Infect Dis.* 26;19(1):893.

Maggio F, Rossi C, Chaves-López C, Serio A, Valbonetti L, Pomilio F, & Paparella A. 2021. Interactions between *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* in dual-species



biofilms under simulated dairy processing conditions. *Foods*, 10(1), 176.

Manso B, Melero B, Stessl B, Fernández-Natal I, Jaime I, Hernández M, Wagner M, Rovira J, Rodríguez-Lázaro D. 2019. Characterization of Virulence and Persistence Abilities of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food Processing Premises. *J Food Prot.* 82(11):1922-1930.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. CIRCULAR Nº 175/2005. Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. Brasília, D.O.U; 2005. Disponível em: <<https://www.cn3.com.br/wp-content/uploads/2016/04/Circular-N%C2%BA175-de-16-de-maio-de-2005.pdf>>. Acesso em: 02 maio. 2021.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368/1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/ industrializadores de alimentos. 1997. Brasília, D.O.U; 1997. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtosanimal/empresario/Portaria\\_368.1997.pdf/view](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtosanimal/empresario/Portaria_368.1997.pdf/view)>. Acesso em: 01 maio 2021.

Marik CM, Zuchel J, Schaffner DW, Strawn LK. 2020. Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* on Intact Fruit and Vegetable Surfaces during Postharvest Handling: A Systematic Literature Review. *J Food Prot.* 83(1):108-128.

Martinez-Rios V & Paw Dalgaard. 2018. "Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis." *Food Control* 84: 205-214.

Matereke LT, & Okoh AI. 2020. "*Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A Review." *Pathogens* 9.7: 528.

Maung AT, Mohammadi TN, Nakashima S, Liu P, Masuda Y, Honjoh KI, Miyamoto T. 2019. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from

- chicken meat in Fukuoka, Japan. *Int J Food Microbiol.* 2; 304:49-57.
- Maury MM, Bracq-Dieve H, Huang L, Vales G, Lavina M, Thouvenot P, Disson O, Leclercq A, Brisse S, Lecuit M. 2019. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat. Commun.* 10:2488.
- Mendez E, Walker DK, Vipham J, Trinetta V. 2020. "The use of a CDC biofilm reactor to grow multi-strain *Listeria monocytogenes* biofilm." *Food Microbiology* 92: 103592.
- Miles AA, Mirsa SS, Irwin JO. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene.* 38(6):732-49.
- Monroe D. 2007. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* 5:2458-2461.
- Møretrø Trond, Solveig Langsrud. 2017. "Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16.5: 1022-1041.
- Muchaamba F, Stephan R & Taurai T. 2021. "*Listeria monocytogenes* Cold Shock Proteins: Small Proteins with A Huge Impact." *Microorganisms* 9.5: 1061.
- Nilsson RE, Ross T, & Bowman JP. 2011. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of food Microbiology*, 150(1), 14-24.
- Nörnberg MBL, Mentges ML, Silveira ST, Tondo EC, Brandelli A. 2011. A psychrotrophic *Burkholderia cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk showing proteolytic activity and adhesion to stainless steel. *Journal of Dairy Research.* 78:257-262.
- Notermans S, Dufrenne J, Teunis P, Chackraborty T. 1998. Studies on the risk

assessment of *Listeria monocytogenes*. J Food Prot.61(2):244-8.

Nüesch-Inderbinnen M, Bloemberg GV, Müller A, Stevens MJA, Cernela N, Kollöffel B, Stephan R. 2021. Listeriosis Caused by Persistence of *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Sequence Type 6 in Cheese Production Environment. Emerg Infect Dis. 27(1):284-288.

Olaimat AN, Al-Holy MA, Shahbaz M, Al-Nabulsi AA, Ghoush MHA, Osaili TQ, Ayyash MM, Holley RA. 2018. "Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: a comprehensive review." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 17.5: 1277-1292.

Oliveira TS, Varjão LM, da Silva LNN, Pereira RCL, Hofer E, VallimDC, & de Castro Almeida RC. 2018. *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among isolates, and evaluation of antimicrobial susceptibility. Food Control, 88, 131– 138.

Osman KM, Samir A, Abo-Shama UH, Mohamed EH, Orabi A, Zolnikov T. 2016. Determination of virulence and antibiotic resistance pattern of biofilm producing *Listeria* species isolated from retail raw milk. BMC Microbiol 16, 263.

Osman KM, Kappell AD, Fox EM Orabi A, Samir A. 2020. Prevalence, Pathogenicity, Virulence, Antibiotic Resistance, and Phylogenetic Analysis of Biofilm-Producing *Listeria monocytogenes* Isolated from Different Ecological Niches in Egypt: Food, Humans, Animals, and Environment. Pathogens. 18;9(1):5.

Oxaran V, Lee SHI, Chaul LT, Corassin CH, Barancelli GV, Alves VF, de Oliveira CAF, Gram L, De Martinis ECP. 2017. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. Food Microbiol. 68:16-23.

Paduro C, Montero DA, Chamorro N, Carreño LJ, Vidal M, Vidal R. 2020. Ten years of

- molecular epidemiology surveillance of *Listeria monocytogenes* in Chile 2008-2017. Food Microbiol. 85:103280.
- Palma JM, Lisboa RC, Rodrigues DL, Santos AFM, Hofer E, Santana AP. 2016. Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira [online]. v. 36, n. 10
- Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70, 5607-5612
- Pasonen P, Ranta J, Tapanainen H, Valsta L, Tuominen P. 2019. *Listeria monocytogenes* risk assessment on cold smoked and salt-cured fishery products in Finland - A repeated exposure model. International Journal of Food Microbiology. 304(1), 97-105.
- Pessoa CASS, Aragão BB, Costa CA, Santos HCS, Silva MGV, de Moura APBL. 2020. Ocorrência de *Listeria* spp. em salame tipo Italiano comercializados em supermercados do bairro de Casa Amarela, Recife-PE. Medicina Veterinária (UFRPE), v. 14, n. 4, p. 341-345, 2020.
- Price R, Jayeola V, Niedermeyer J, Parsons C, Kathariou S. 2018. The *Listeria monocytogenes* Key Virulence Determinants *hly* and *prfA* are involved in Biofilm Formation and Aggregation but not Colonization of Fresh Produce. Pathogens, 7-18.
- Pyz-lukasik R, Gondek M, Winiarczyk D, Michalak K, Paszkiewicz W, Piróg-Komorowska A, Policht A, Ziomek M. 2021. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Artisanal Cheeses from Poland and Its Identification by MALDI-TOF MS. Pathogens, v. 10, n. 6, p. 632

- Ramires T, Kleinubing NR, Iglesias MA, Vitola HRSV, Nuncio ASP, Kroning IS, Moreira GMSG, Fiorentini AM, da Silva WP. 2021. "Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi." Food Research International 140: 109871.
- Ramirez-Mora T, Retana-Lobo C, Valle-Bourrouet G. 2018. Biochemical characterization of extracellular polymeric substances from endodontic biofilms. PloS one vol. 13. n 11.
- Raschle S, Stephan R, Stevens MJA, Cernela N, Zurfluh K, Muchaamba F, Nüesch-Inderbinnen M. 2021. Environmental dissemination of pathogenic *Listeria monocytogenes* in flowing surface waters in Switzerland." Scientificreports vol. 11,1 9066. 27.
- Reis RM, da Silva JS, Pimentel ET, de Oliveira BCR, de Vasconcelos LAS, dos Santos FF. 2020. Ocorrência de microrganismos psicrotróficos em carne moída in natura comercializada na cidade de Manaus, Amazonas. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 6, p. 41750-41759.
- Ripolles-Avila C, Cervantes-Huaman BH, Hascoët AS, Yuste J, & Rodríguez-Jerez JJ. 2019. Quantification of mature *Listeria monocytogenes* biofilm cells formed by an in vitro model: A comparison of different methods. International journal of food microbiology, 289, 209-214.
- Rosa JV, Conceição NV, Conceição RCS, Timm CD. 2018. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on different surfaces and its resistance to sodium hypochlorite. Ciência Rural, v. 48, n. 12.
- Rossi F, Amadoro C, Conficoni D, Giaccone V, Colavita G. 2020. Occurrence, Diversity of *Listeria* spp. Isolates from Food and Food-Contact Surfaces and the Presence of Virulence Genes. Microorganisms 8 (3), 1-10.
- Ruviaro CF, de Leis CM, Florindo TJ, de Medeiros Florindo GIB, da Costa JS, Tang WZ,

- Pinto AT, Soares SR. 2020. Life cycle cost analysis of dairy production systems in Southern Brazil. *Sci Total Environ.* 1;741:140273.
- Rzepniewski P, Goluchowska N, Idziakowska EG, Najman BK. 2020. Neonatal Listeriosis-Infection Leading to Death of the Newborn. A Case Report. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, v. 29, n. 2, p. 22311-22313.
- Sanlıbaba P, BaşarUymaz T & GürcüAybigеÇ. 2018. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat foods in Turkey. *Journal of Food Quality*. ID 7693782 | doi.org/10.1155/2018/7693782
- Saraoui T, Fall PA, Leroi F, Antignac JP, Chéreau S, Pilet MF. 2016. Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Food Microbiol.* 53(Pt A):70-8.
- Sauders BD, D'Amico DJ. 2016. *Listeria monocytogenes* cross-contamination of cheese: risk throughout the food supply chain. *Epidemiology and Infection.* 144(13), 2693-2697.
- Schmidt K, Estes C, McLaren A, Spangehl, MJ. 2018. Chlorhexidine Antiseptic Irrigation Eradicates *Staphylococcus epidermidis* From Biofilm: An In Vitro Study. *Clinical orthopaedics and related research*, 476 (3),648-653.
- Sereno, MJ, Viana C, Pegoraro K, da Silva DAL, Yamatogi RS, Nero LA, Bersot LS. 2019. et al. 2019. "Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil." *Food microbiology* 84: 103234.
- Shamloo E, Hosseini H, Abdi Moghadam Z, Halberg Larsen M, Haslberger A, Alebouyeh M. 2019. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iran J Vet Res.* 20(4):241-254.
- Silva AS, Duarte EAA, de Oliveira TAS, Evangelista-Barreto NS. 2020. "Identification of

*Listeria monocytogenes* in cattle meat using biochemical methods and amplification of the hemolysin gene." Anais da Academia Brasileira de Ciências 92.

Silva HR, Gianoglou MF, Campos MF, Graciano E, Toledo MA, Clemente RC. 2016. Listeriose: uma doença de origem alimentar pouco conhecida no Brasil. Hig. aliment, v. 30, n. 262/263, p. 17-20.

Silva ROP, Bueno CRF, Rodrigues Sá, PBZ. 2017 Aspectos relativos à produção de soro de leite no Brasil, 2007 – 2016. Informações Econômicas, SP, v. 47, n. 2.

Silva DAL, Botelho CV, Martins BTF, Tavares RM, Camargo AC, Yamatogi RS, Bersot LS, Nero LA. 2020 *Listeria monocytogenes* From Farm to Fork in a Brazilian Pork Production Chain. J Food Prot.1;83(3):485-490.

Skowron K, Wiktorczyk N, Grudlewska K, Kwiecińska-Piróg J, Walecka-Zacharska E, Paluszak Z, Gospodarek-Komkowska E. 2019. Drug-susceptibility, biofilm-forming ability and biofilm survival on stainless steel of *Listeria* spp. strains isolated from cheese. *Food Microb.* 296(2),75-82.

Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology. 38(5), 428-432.

Szymczak B, Szymczak M, Trafiałek J. 2020. Prevalence of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods in the West Pomeranian region of Poland: Correlations between the contamination level, serogroups, ingredients, and producers. Food Microbiology, v. 91, p. 103532.

Teixeira LAC, Carvalho FT, Vallim DC, Pereira RCL, Cunha NA, Vieira BS, Carvalho RCT, Figueiredo EES. 2020. *Listeria monocytogenes* in export-approved beef from Mato Grosso, Brazil: prevalence, molecular characterization and resistance to antibiotics and disinfectants. Microorganisms 8.1: 18.

- Wiktorczyk N, Grudlewska K, Skowron K, Gryń G, &Gospodarek-Komkowska E. 2018. The effect of blood on the ability of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. Medical Research Journal, 3(1): 28-31.
- Yan S, Li M, Luque-Sastre L, Wang W, Hu Y, Peng Z, Dong Y, Gan X, Nguyen S, Anes J, Bai Y, Xu J, Fanning S, Li F. 2019. Susceptibility (re)-testing of a large collection of *Listeria monocytogenes* from foods in China from 2012 to 2015 and WGS characterization of resistant isolates. J Antimicrob Chemother. 1;74(7):1786-1794.
- Young-Min B, Seung-Youb B, Sun-Young L. 2012. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. International Journal of Food Microbiology. 153(3)465-473.
- Zetzmann M, Bucur F I, Crauwels P, Borba D, Nicolau A I, Grigore-Gurgu L, Seibold G M, Riedel C. 2019. Characterization of the biofilm phenotype of a *Listeria monocytogenes* mutant deficient in *agr* peptide sensing. MicrobiologyOpen, 826(8), 1-9.
- Zhang Y, Wei J, Yuan Y, Yue T. 2019. Diversity and characterization of spoilage-associated psychrotrophs in food in cold chain. Int J Food Microbiol. 2;290:86-95.
- Zoz F, Grandvalet C, Lang E, Iaconelli C, Gervais P, Firmesse O, Guyot S, Beney L. 2017. *Listeria monocytogenes* ability to survive desiccation: Influence of serotype, origin, virulence, and genotype. Int J Food Microbiol. 2;248:82-89.
- Zwirzitz B, Wetzels SU, Dixon ED, Fleischmann S, Selberherr E, Thalguter S, Quijada NM, Dzieciol M, Wagner M, Stessl B. 2021. Co-Occurrence of *Listeria* spp. and Spoilage Associated Microbiota During Meat Processing Due to Cross-Contamination Events. Front Microbiol. 2021.



## APÊNDICE

### Artigo

#### BIOFILMES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* FORMADOS EM SUPERFÍCIES DE MANIPULAÇÃO DE ALIMENTOS: INFLUÊNCIA DA MATRIZ ALIMENTAR

Daniel Leirias Caurio<sup>1</sup>, Danieli Quadros da Silva<sup>1</sup>, Luana Dornelles<sup>1</sup>, Nathasha Noronha Arechavaleta, Amanda de Souza da Motta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Health Science, Microbiology, Immunology and Parasitology Department, 222/500 Sarmiento Leite Street, 90050-170, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

ORCID Daniel Leirias Caurio: <https://orcid.org/0000-0002-8068-5606>

ORCID Danieli Quadros da Silva: <https://orcid.org/0000-0002-9360-6807>

ORCID Luana Dornelles: <https://orcid.org/0000-0002-9866-3317>

ORCID Nathasha Noronha Arechavaleta: <https://orcid.org/0000-0001-6653-1531>

ORCID Amanda de Souza da Motta: <https://orcid.org/0000-0001-8637-3868>

### RESUMO

Na indústria de alimentos, a formação de biofilmes resulta em graves problemas de recontaminação microbiana. Este trabalho buscou estudar isolados de *Listeria* sp. obtidos de produtos fatiados e superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambreteria. Foram identificadas *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* e *L. seeligeri*. Na avaliação da susceptibilidade aos antibióticos, os isolados foram sensíveis à ampicilina e penicilina, que são os principais antibióticos utilizados no tratamento. Os isolados demonstraram capacidade de formação de biofilme em microplaca e em cupons de aço inox e polipropileno, com variação de células sésseis entre 4,29 a 7,03 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> em TSBYE. Esta capacidade também foi observada em matriz alimentar composta de leite integral UHT em cultivo de mono-espécie e em cultivo associado de *L. monocytogenes* com *Pseudomonas fluorescens*. A aplicação dos sanitizantes ácido peracético e hipoclorito de sódio demonstraram eficiência na erradicação de células aderidas e biofilmes formados em cupons de aço inox. Portanto, os isolados de *Listeria* sp. mostraram-se como persistentes e com capacidade de formar biofilme em cultivo de mono-espécie ou associado à *P. fluorescens*, com diferentes condições. Levando-se em consideração esses aspectos, destaca-se a necessidade de higienização adequada no processo de produção de alimentos a fim de evitar riscos à saúde dos consumidores.

**Palavras-chave:** adesão; *L. innocua*; *L. seeligeri*; inox; polipropileno; sanitizante

## INTRODUÇÃO

O aumento na frequência de doenças transmitidas por alimentos tem sido relatado nos últimos anos, sendo a *Listeria* sp. um dos microrganismos implicados em surtos. Esta bactéria é encontrada em diferentes ambientes como solo, água, animais, humanos e nos Laboratórios de Fiambreteria. Estes ambientes manipulam produtos de origem animal prontos para consumo sendo ambientes importantes de serem estudados considerando o risco da permanência de bactérias em superfícies de processamento (Andrade, Moura, Silva & Medeiros, 2019, Skowron et al., 2019).

A *Listeria* sp. é um bacilo Gram-positivo, não esporulado, anaeróbio facultativo, que possui capacidade de crescimento em temperaturas de 2,5°C a 44°C, bem como em pH entre 6,0 e 8,0 e tolera diferentes concentrações de sal (Skowron et al., 2019; EFSA, 2019). Atualmente para o gênero *Listeria* são descritas vinte e oito espécies assim nomeadas: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. cossartiae*, *L. costaricensis*, *L. denitrificans*, *L. farberii*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. goaensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. immobilis*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. newyorkensis*, *L. portnoyi*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. rustica*, *L. seeligeri*, *L. thailandensis*, *L. valentina*, *L. weihenstephanensis* e *L. welshimeri* (Parte, Sardà Carbasse, Meier-Kolthoff, Reimer & Göker, 2020). A *Listeria monocytogenes* representa uma das principais preocupações em alimentos de origem animal, devido à sua taxa de mortalidade de 15,6% especialmente para indivíduos imunocomprometidos, idosos e gestantes (Baba et al., 2021; Mazaheri, Cervantes-Huamán, Bermúdez-Capdevila, Ripolles-Avila & Rodriguez-Jerez, 2021).

A capacidade de persistência deste microrganismo deve-se a habilidade em aderir-se à superfícies e formar biofilme (Ramires, T., Kleinubing, N. R., Iglesias, M.A., Vitola, H. R. S., Nuncio, A. S. P., Kroning, I. S., Moreira, G. M. S. G., Fiorentini, Â. M., da Silva, W. P, 2021). O termo biofilme é definido como uma comunidade estruturada de células bacterianas, dentro de uma matriz polimérica microbiana, associadas a uma superfície, conferindo proteção à bactéria (Fagerlund, Heir, Moretro & Langsrud, 2020). *Listeria* sp. isoladas de alimentos e de ambientes de processamento de alimentos, vem sendo descritas como bactérias formadoras de biofilme em diferentes ambientes (Lee et al., 2019; Skowron et al., 2019; Alonso, Perez, Harada & Miho, 2020). As células que compõem os biofilmes são mais resistentes do que as células em seu estado planctônico, podendo sobreviver aos processos de sanitização, impactando negativamente na segurança dos alimentos (Fagerlund et al., 2020). Diante disto o presente trabalho objetivou identificar espécies de *Listeria* sp. isoladas a partir de Laboratórios de Fiambreteria e avaliar o potencial de formação de biofilme em diferentes condições.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **Linhagens de *Listeria* sp. e condições de cultivo**

Foram estudadas 14 bactérias do gênero *Listeria* sp. Destas, 12 foram isoladas de amostras de produtos de origem animal, alimentos fatiados e superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambreteria em Porto Alegre – RS. Estes isolados foram mantidos em glicerol 20% a uma temperatura de - 20 °C. Para reativação, as bactérias foram transferidas para tubos com *Trypticase Soy Broth*, acrescido de 0.6 % *Yeast Extract* (TSBYE) (Hua, Korany, El-Shinamy & Zhu, 2019) incubados a temperatura de 37 °C por 24 horas. Após seu crescimento, as bactérias foram semeadas por esgotamento em placas de *Trypticase Soy Agar* com 0.6 % *Yeast Extract* (TSAYE) e incubados a temperatura de 37 °C por 24 horas. A identificação dos isolados foi realizada através do método *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectroscopy* (MALDI-TOF/MS). Esta técnica foi realizada através do método de extração química, de acordo com o protocolo etanol/ácido fórmico (Pyz-lukasik, Gondek, Winiarczyk, Michalak, Paszkiewicz, Piróg-Komorowska, Policht & Ziomek, 2021). Este procedimento foi realizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde/ UFRGS pelo equipamento MALDI Biotyper 4.0 software MBT OC.

### **Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos**

Para esta avaliação foi empregado o Método Kirby-Bauer. Para isto as suspensões bacterianas foram padronizadas pela escala de McFarland 0.5 e semeadas em superfície de Agar Mueller-Hinton (MH) com 5% de sangue de cavalo desfibrinado. Foram empregados os discos de antibióticos contendo penicilina (1 UI); ampicilina (2 µg); meropenem (10 µg); eritromicina (15 µg) e sulfazotrim (25 µg), conforme recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST 2019). Também foram empregados os discos de ciprofloxacina (5 µg); clindamicina (2 µg); tetraciclina (30 µg) conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute 28th Edition* (CLSI, 2018). As placas foram incubadas a 35±1°C, em aerobiose por 18 a 20 horas e interpretadas conforme as recomendações.

### **Avaliação da capacidade de formação de biofilmes pelo método da microplaca**

A capacidade de formação de biofilme *in vitro* foi determinada de acordo com o descrito por (Stepanovic, Cirkovic, Ranin & Svabic-Vlahovic, 2004). As placas de microtitulação de poliestireno (96 poços) estéreis foram preenchidas com 180 µL de caldo TSBYE. As espécies de *Listeria* sp. foram ressuspensas em solução salina 0,85 % e ajustadas conforme escala 0.5 de McFarland e 20 µL dessa solução foi inoculada por poço, em octoplicata. Para o controle negativo, foi empregado somente o caldo TSBYE, seguido pelo controle positivo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (Schmidt, Estes, McLaren & Spangehl, 2018). As placas de microtitulação foram incubadas à 37 ° C por 48 horas. Posteriormente, foram lavadas com 200 µL solução salina 0,85% e a fixação das bactérias foi realizada com 200 µL de metanol durante 20 minutos. Após, a microplaca foi corada com 200 µL de cristal violeta (0,1%) durante 15 minutos, seguido de lavagem com água destilada estéril. Após a secagem das microplacas, o botão corado fixado ao fundo dos poços foi ressuspensado em 200 µL de etanol 95%, e mantidas em repouso durante 30 minutos e então realizada a quantificação dos biofilmes. A densidade óptica (DO) da suspensão foi quantificada com auxílio de um leitor espectrofotômetro de microplacas em comprimento de onda de 595 nm (Marca: Anthos 2010 Type 17 550 S. Nº 17 550 4894). A classificação para formação do biofilme seguiu os critérios descritos por Chusri, Phatthalung e Voravuthikunchai (2012). A DO média do controle negativo foi o ponto de corte (PC). Os isolados foram classificados da seguinte forma: Não formadores de biofilme (NF): amostras cuja DO foi menor que o ponto de corte. Fracos formadores de biofilme (FRA): amostras com DO média acima do ponto de corte, porém menor ou igual ao dobro do PC. Moderados formadores de biofilmes (MF): amostras com DO média acima do dobro do PC, porém menor ou igual a 4 x o PC. Fortes formadores de biofilme (FF): amostras com DO média maior que 4 x o valor do PC.

### **Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em meio de cultura TSBYE**

No estudo foram utilizados os cupons de aço inox AISI 304 e cupons de polipropileno ambos contendo 1 cm<sup>2</sup>. Os cupons foram higienizados conforme descrito por Alonso et al. (2020) e e Bogo, Costa, Frazzon & da Motta, (2020) com modificações. Para o experimento, as colônias bacterianas selecionadas foram transferidas para meio de cultura TSBYE e incubadas a 37 ° C durante 24 horas. Após uma alíquota de 25 µL foi transferida para 100 mL de TSBYE, obtendo-se  $\cong 3 \log_{10}$  UFC/mL (T0). Três cupons de cada material foram imersos em tubos separados

contendo 10 mL com os inóculos em TSBYE e incubados em estufa sem agitação a 37 ° C até 72 horas. A cada 24 horas um cupom de cada tubo foi assepticamente removido, lavado em dH<sub>2</sub>O estéril para remover células planctônicas e após, foram imersos em 10 mL de solução salina 0,85 % e submetidos a agitação em vórtex por 3 min para remoção das células sésseis (Alonso & Kabuki. 2019). A avaliação da contagem das células foi realizada em T0, 24, 48 e 72 horas, pelo método descrito por Miles, Mirsa, & Irwin (1938), com modificações. As placas de Petri contendo TSAYE foram incubadas a 37 ° C por 24 horas para determinar o número de células sésseis, expresso em log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e o número de células planctônicas, expresso em log<sub>10</sub> UFC/mL.

### **Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em substrato leite UHT integral**

Os cupons foram preparados conforme experimento anterior sendo aqui empregado o substrato leite UHT integral em diferentes temperaturas. Nas incubações a 37 ° C e temperatura ambiente, com média de 28,6 °C, as células sésseis e planctônicas foram avaliadas nos tempos: T0, 24, 48 e 72 horas. Já para os inóculos mantidos em temperatura de refrigeração, com média de 7,9 ° C, as avaliações foram em: T0, 72, 120 e 168 horas. A cada tempo de incubação, foram realizadas avaliações conforme o método descrito por Miles et al. (1938), com modificações.

### **Avaliação da capacidade de formação de biofilme em aço inox e polipropileno em substrato leite UHT integral com duas espécies bacterianas**

As espécies bacterianas utilizadas foram *Listeria monocytogenes* QF Oxford e *Pseudomonas fluorescens* PL7.1 (Bogo et al., 2020). Estes microrganismos foram cultivados nas temperaturas ótimas de crescimento por 24 horas padronizando-se os inóculos iniciais em  $\cong 3 \log_{10}$  UFC/mL de ambas as espécies (T0) e associados (1:1). Os cupons foram incubados, em temperatura ambiente (27,4°) com avaliações nos tempos de T0, 24, 48 e 72 horas e em refrigeração (8,2°C) com avaliações em: T0, 72, 120 e 168 horas. A cada tempo de incubação, foram realizadas avaliações conforme o método descrito por Miles et at. (1938), com modificações. As contagens foram realizadas em meio de cultura seletivos: Agar *Listeria* Oxford e Agar Cetrimide. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 24 horas e o número de células expressos conforme descrito anteriormente.

## **Erradicação do biofilme formado em aço inox por ação de sanitizantes**

A avaliação dos sanitizantes sobre os biofilmes formados foi de acordo com a metodologia descrita por Young-Min, Seung-Youb e Sun-Young (2012) e Ga-Hee e Dong-Hyun (2016). Os sanitizantes utilizados foram: ácido peracético na concentração de 0,2% (Peroxoni Top -Launer Química Indústria e Comércio Ltda-Brasil - Teor de ativo % Ácido Peracético  $\geq 15,00$ ) e Hipoclorito de Sódio (Água sanitária Ypê cloro ativo - Amparo Ltda-Brasil - Teor de cloro ativo % 2,0 – 2,5 p/p) aplicado conforme indicação dos fabricantes. As condições dos biofilmes testados nesta etapa foram com duas espécies, sendo empregadas a *L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1, em substrato de leite UHT integral conforme detalhado no item 2.6. Após 72 horas de formação de biofilme em cupons de aço inox, foi realizada a contagem das células sésseis em cupons controle e após empregada a higienização com os dois produtos. Para isso os cupons foram lavados três vezes em dH<sub>2</sub>O estéril para remover células planctônicas. Os cupons de aço inox contendo células sésseis foram imersos em tubos com 10 mL do produto sanitizante por 10 minutos em temperatura ambiente, sendo acompanhado do mesmo procedimento em dH<sub>2</sub>O estéril na condição de controle negativo. Transcorrido o tempo os cupons foram lavados três vezes em dH<sub>2</sub>O estéril para remover os sanitizantes e imerso em 10 mL de solução salina 0,85 % NaCl e submetidos a agitação em vórtex por 3 minutos para remoção das células sésseis após ação do agente sanitizante. Nesta etapa foi realizada a contagem das células sésseis através do método descrito por Miles et al. (1938), com modificações. As contagens foram realizadas em meio Plate Count Agar (PCA), Agar *Listeria* Oxford e Agar Cetrimide. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 24 horas e o número de células sésseis, expresso em log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e o número de células planctônicas, expresso em log<sub>10</sub> UFC/mL.

### **Statistical analysis**

Data were analysis using SPSS, version 18.0. Qualitative data comparisons were performed by the Chi-square test with adjusted residual analysis. Quantitative data were compared using Student's t-test for independent or paired samples, and Analysis of Variance (ANOVA) with post hoc Bonferroni test, when applicable. Significance fixed at 5% for all analyses.

## **RESULTADOS**

## Identificação das espécies de *Listeria* sp.

Um total de 14 bactérias foram utilizados neste estudo. Foram identificadas quatro espécies pertencentes a *L. monocytogenes*, quatro de *L. innocua* e quatro pertencentes a espécie *L. seeligeri*. Além destes isolados as cepas padrão *L. monocytogenes* ATCC 35152 e *L. monocytogenes* ATCC 7644 também foram empregadas no estudo (Kumar, Parvathi, George, Krohne, Karunasagar, & Karunasagar, 2009; Wiktorczyk, Grudlewska, Skowron, Gryń, & Gospodarek-Komkowska, 2018). As bactérias, *L. monocytogenes* 17D78/03, *L. monocytogenes* 4C, *L. innocua* 6B, foram isolados de alimentos. Os isolados *L. innocua* L07, *L. innocua* L10 e *L. innocua* L13, foram isolados de leite cru de búfala. A *L. monocytogenes* 4B foi isolada de carcaça de frango. Os isolados *L. seeligeri* BQ Oxford e *L. seeligeri* BP Oxford foram isolados de bancadas de queijo. A bactéria *L. seeligeri* BP Palcam, foi isolada da bancada do presunto e a bactéria *L. seeligeri* MP Oxford foi isolada de mãos de manipulador de alimento. A *L. monocytogenes* QF Oxford foi isolada de queijo fatiado. A espécie com suas respectivas origens estão listadas na tabela 1. As coletas foram realizadas juntamente com o serviço de Vigilância de Alimentos da Secretaria da Saúde de Porto Alegre, conforme a *Lei Estadual 6503/72* e *Decreto Estadual 23430/74*– RS.

Table 1. Species of *Listeria* sp. identified in MALDI-TOF/MS with their code and origins, with the respective classifications regarding the potential of biofilm formation in microplate

Microorganism (species)	Code	Origin	Classification
<i>Staphylococcus epidermidis</i> * #	ATCC 35984	American Type Culture Collection	SF
<i>L. monocytogenes</i> #	ATCC 35152	American Type Culture Collection	SF
	ATCC 7644	American Type Culture Collection	MF
<i>L. monocytogenes</i>	17D78/03	food isolate	MF
	QF Oxford	sliced cheese isolate	SF
	4B	Chicken carcass isolate	SF
	4C	food isolate	MF
<i>L. innocua</i>	L10	Isolated from raw buffalo milk	MF
	L13	Isolated from raw buffalo milk	MF
	6B	food isolate	MF
	L07	Isolated from raw buffalo milk	MF
<i>L. seeligeri</i>	BQ Oxford	Cheese Countertop isolate	MF
	BP Palcam	Ham Countertop isolate	MF
	BP oxford	Cheese Countertop isolate	MF
	MP Oxford	Food handler hands isolated	WF

\*Positive Control SF; #ATCC; NF-Non-biofilm former; WF- Weak biofilm former; MF- Moderate biofilm former; SF- Strong biofilm former.

## **Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos**

Na avaliação da susceptibilidade aos antibióticos as bactérias pesquisadas demonstraram sensibilidade a Ampicilina (2 µg); Penicilina (1 UI); Tetraciclina (30 µg); Meropenem (10 µg) e Eritromicina (15 µg). Contudo, observou-se que das 14 (100%) bactérias pesquisadas nove (64,3%) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado. Deste grupo resistente, os isolados *L. monocytogenes* 4C e *L. seeligeri* BP Oxford, apresentaram este perfil a clindamicina (2 µg) e a sulfazotrim (25 µg). A *L. monocytogenes* ATCC 35152, *L. monocytogenes* 4B, *L. innocua* 6B, *L. innocua* L10, *L. innocua* L07, foram resistentes a clindamicina (2 µg). As bactérias *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 17D78/03, *L. innocua* L13 e *L. seeligeri* BQ Oxford apresentaram sensibilidade intermediária a clindamicina (2 µg), sendo que o isolado *L. seeligeri* BQ Oxford apresentou este perfil também a ciprofloxacina (5 µg).

## **Avaliação da capacidade de formação de biofilmes pelo método da microplaca**

Na avaliação da formação de biofilmes pelo método da microplaca, três isolados de *L. monocytogenes* apresentaram perfil de forte formador de biofilme (FF): *L. monocytogenes* 4B (carcaça de frango), *L. monocytogenes* ATCC 35152, *L. monocytogenes* QF Oxford (queijo fatiado). *L. seeligerii* MP Oxford, isolada de mãos manipulador de alimento, apresentou-se como fraco formador de biofilme (FRA). As demais bactérias apresentaram resultados como moderado formador de biofilme (MF). Os dados encontram-se descritos na Tabela 1.

## **Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em aço inox e polipropileno em meio de cultura TSBYE**

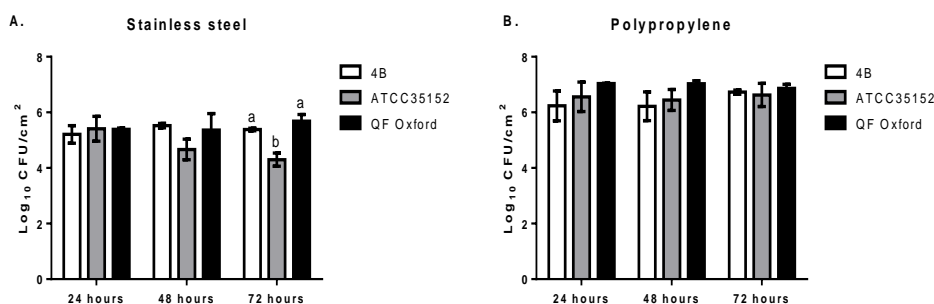
Os resultados obtidos neste teste mostraram que os isolados *L. monocytogenes* 4B, *L. monocytogenes* ATCC 35152 e o isolado *L. monocytogenes* QF Oxford, foram capazes de formar biofilme em aço inox e em polipropileno nos tempos observados. A média dos valores de células planctônicas observados durante o tempo de estudo de até 72 horas, foi de  $8,76 \pm 0,4 \log_{10}$  UFC/mL.

A população de células sésseis em aço inox foi entre 5,20 e 5,52  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> para a *L. monocytogenes* 4B, entre 5,41 e 4,29  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> na cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e entre 5,36 e 5,68  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford nos tempos estudados



de até 72 horas (Figura 1A).

Em superfície de polipropileno os valores de células sésseis foi entre 6,22 e 6,72 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> para a *L. monocytogenes* 4B, entre 6,44 e 6,62 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> para a cepa *L. monocytogenes* ATCC 35152 e entre 6,86 e 7,03 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> no isolado *L. monocytogenes* QF Oxford nos tempos estudados (Figura 1B).



**Figure 1.** Evaluation of biofilm formation capacity of bacteria *L. monocytogenes* 4B, *L. monocytogenes* ATCC 35152 and *L. monocytogenes* QF Oxford, stainless steel (A) and polypropylene (B), with TSBYE culture at temperature of 37 °C for 24, 48 and 72 hours. CFU – colony forming unit. <sup>ab</sup>Different letters indicate a statistical difference between the analyzed groups.

Quando comparadas as três bactérias na superfície inox (Figura 1A), não houve diferença entre os grupos para os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> em 24 horas (ANOVA de uma via, F (2,6) = 0,362, p=0,710) ou em 48 horas (ANOVA de uma via, F (2,6) = 3,782, p = 0,087). Por outro lado, evidenciou-se que em 72 horas houve uma diferença para os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> (ANOVA de uma via, F (2,6) =40,981, p≤0,0001), onde o grupo *L. monocytogenes* ATCC 35152 apresentou menor média que os grupos *L. monocytogenes* 4B e *L. monocytogenes* QF Oxford (*post hoc* de Bonferroni, p≤0,005). Para a superfície polipropileno (Figura 1B), não houve diferença entre os grupos para os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> em 24 horas (ANOVA de uma via, F (2,6) =2,577, p=0,156), 48 horas (ANOVA de uma via, F (2,6) =3,739, p=0,088) ou 72 horas (ANOVA de uma via, F (2,6) =0,620, p=0,569).

### **Avaliação da capacidade de formação de biofilmes por *Listeria monocytogenes* QF Oxford em aço inox e polipropileno em substrato leite UHT em diferentes condições**

Na temperatura de 37 °C a média da população de células planctônicas nos tubos contendo cupons de aço inox e polipropileno foi de 8,24±0,4 log<sub>10</sub> UFC/mL nos tempos de até 72 horas.

A população de células sésseis em cupons de aço inox variou entre 3,10 a 3,48 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> (figura 2A). Já em cupons de polipropileno os valores das células sésseis foram entre 4,75 a 5,07 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> (figura 2B), nos tempos estudados.

Quando análises pareadas compararam os diferentes tempos analisados, os  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford na superfície inox com o meio leite integral UHT apresentou uma redução significativa no tempo de 72 horas quando comparado ao tempo de 48 horas (Teste t de *Student* para amostras pareadas,  $p= 0,025$ ), não apresentando diferença para as demais análises.

Na avaliação da capacidade de formação de biofilme em temperatura ambiente a média dos valores de células planctônicas em aço inox e polipropileno foi de  $8,54 \pm 0,1 \log_{10}$  UFC/mL nos tempos de até 72 horas. A população de células sésseis em aço inox variou entre 3,99 a 4,23  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> (figura 2C). Nos cupons de polipropileno a população de células sésseis foram entre 5,23 a 6,03  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> nos tempos estudados (figura 2D).

No presente estudo, avaliou-se também a capacidade de formação de biofilme em temperatura de refrigeração com tempos de 72, 120 e 168 horas. Nestes tempos a média dos valores de células planctônicas nos tubos contendo os cupons de aço inox e polipropileno foi de  $7,16 \pm 1,3 \log_{10}$  UFC/mL. Nos cupons de aço inox os valores de células sésseis não foram observados em 72 horas de incubação. Já os resultados, provenientes de 120 e 168 horas foram 3,31 a 4,04  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis respectivamente (figura 2E). Os valores referentes as células sésseis nos cupons de polipropileno foram entre 3,23 a 4,78  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> nos tempos estudados (figura 2F).

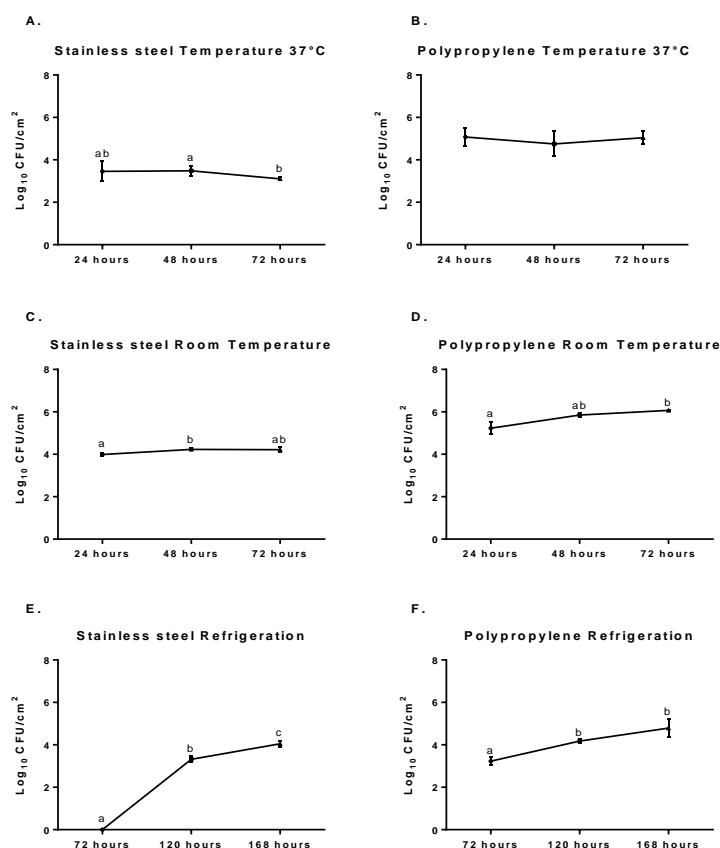


Figure 2. Evaluation of the biofilm formation capacity of the isolate *L. monocytogenes* QF Oxford, in stainless steel (A, C, E) and Polypropylene (B, D, F) in substrate in UHT milk at a temperature of 37 °C (A, B), room temperature (C, D) for 24, 48 and 72 hours and refrigeration temperature (E, F) for 72,120,168 hours. CFU – colony forming unit. <sup>ab</sup>Different letters indicate statistical difference between the analyzed groups.

Em 37 °C, os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford diminuíram em 72 horas em relação a 48 horas na superfície inox (Teste t de *Student* para amostras pareadas, p=0,025, Figura 2A), não se observando alterações na superfície polipropileno (Figura 2B). Em temperatura ambiente, os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo QF Oxford aumentaram em 48 horas em relação a 24 horas na superfície inox (Teste t de *Student* para amostras pareadas, p=0,043, Figura 2C) e em 72 horas em relação a 24 horas na superfície polipropileno (Teste t de *Student* para amostras pareadas, p=0,035, Figura 2D). Em temperatura de refrigeração, os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford, na superfície de inox, aumentaram em 120 horas em relação a 72 horas (Teste t de *Student* para amostras pareadas, p=0,001, Figura 2E) e em 168 horas em relação a 120 horas (Teste t de *Student* para amostras pareadas, p=0,049, Figura 2E). Um aumento no log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford, em polipropileno, foi evidenciado em 120 e 168 horas em relação a 72 horas, quando mantidas em temperatura de refrigeração (Figura 2F). Adicionalmente, observou-se uma diferença entre os log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford em 72 horas tanto na superfície de aço inox (F(2,5) = 2122.375, p ≤ 0,0001, Figura 2 A,

C, E) quanto em polipropileno (ANOVA de uma via,  $F(2,6)=133,646$ ,  $p\leq 0,0001$ , Figura 2B, D, F). Em ambas as superfícies, houve aumento dos  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> quando expostos à temperatura ambiente em comparação com as demais temperaturas testadas (*post hoc* de Bonferroni,  $p\leq 0,05$  para ambos os casos).

### **Avaliação da capacidade de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* QF Oxford associado a *P. fluorescens* PL7.1 em aço inox e polipropileno com substrato leite UHT em diferentes temperaturas**

Os resultados da capacidade de formação de biofilme em aço inox e polipropileno com duas bactérias associadas (*Listeria monocytogenes* QF Oxford e *Pseudomonas fluorescens* PL7.1) foi avaliada em temperatura ambiente em tempos de 24, 48 e 72 horas e temperatura de refrigeração nos tempos de 72, 120 e 168 horas. Nas avaliações em temperatura ambiente a média das células planctônicas de *L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1 foi de  $8,17\pm 0,4$   $\log_{10}$  UFC/mL nos tempos estudados. Em temperatura ambiente as avaliações no aço inox apresentaram contagens de células sésseis entre 3,99 a 4,84  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> para o isolado *L. monocytogenes* QF Oxford e entre 3,54 a 6,07  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> para a bactéria *P. fluorescens* PL7.1 (Figura 3A). Nos cupons de polipropileno os valores de células sésseis foram entre 5,46 e 5,66  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> para o isolado *L. monocytogenes* QF Oxford e entre 5,40 a 6,71  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> para *P. fluorescens* PL7.1 (Figura 3B).

Nas avaliações em temperatura de refrigeração a média dos valores de células planctônicas de *L. monocytogenes* QF Oxford e *P. fluorescens* PL7.1 foi de  $6,71\pm 1,1$   $\log_{10}$  UFC/mL nos tempos estudados. Nos cupons de aço inox os valores de células sésseis do isolado *L. monocytogenes* QF Oxford não foram recuperadas em 72 horas de incubação. Já os resultados, provenientes de 120 e 168 horas foram 3,04 e 3,85  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis respectivamente. Para *P. fluorescens* PL7.1 os valores de células sésseis foram entre 4,40 a 4,73  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> nos tempos estudados (Figura 3C).

Nos cupons de polipropileno os valores de células sésseis do isolado *L. monocytogenes* QF Oxford não foram observados em 72 horas de incubação. Já nos tempos de 120 e 168 horas os valores foram de 2,89 e 3,82  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> células sésseis respectivamente. Para a *P. fluorescens* PL7.1 os valores de células sésseis em polipropileno foram entre 5,60 a 5,77  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> nos tempos estudados (Figura 3D).

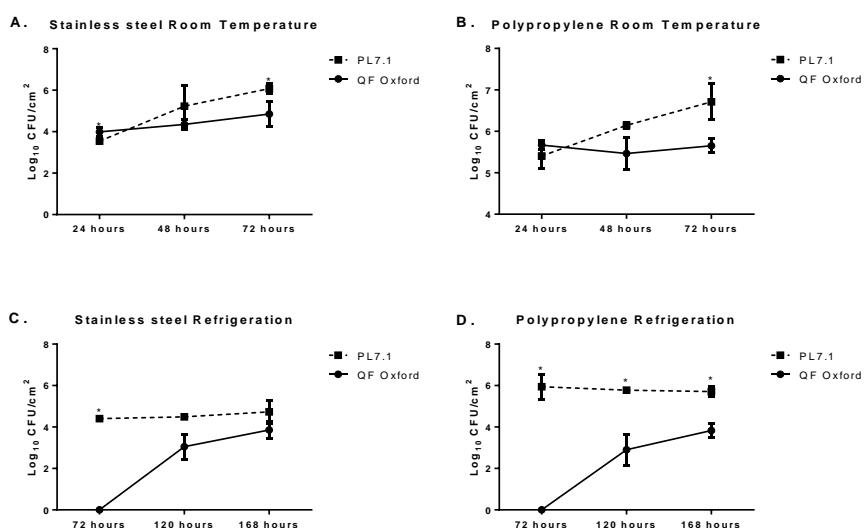


Figure 3. Biofilm formation capacity evaluation with association of *L. monocytogenes* QF Oxford, and *P. fluorescens* PL7.1 in stainless steel (A) and Polypropylene (B) in substrate in UHT milk at room temperature (A, B) at 24, 48, 72 hours and refrigeration temperature 72, 120, 168 hours (C, D). CFU – colony forming unit. \*Statistical difference between analyzed groups.

Observou-se um maior log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford em 24 horas em aço inox e temperatura ambiente em relação as células sésseis do grupo *P. fluorescens* PL7.1 (Teste t de Student para amostras independentes, p=0,028). Também foi observado um aumento de células sésseis em 72 horas em cupons de aço inox e temperatura ambiente do grupo *P. fluorescens* PL7.1 em relação ao grupo *L. monocytogenes* QF Oxford (Teste t de Student para amostras independentes, p=0,028) (Figura 3A). Similarmente, nos cupons de polipropileno e temperatura ambiente, o grupo *P. fluorescens* PL7.1 apresentou maior log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis em 72 horas (Teste t de Student para amostras independentes, p=0,038) (Figura 3B). Em aço inox e polipropileno na temperatura de refrigeração, o grupo *P. fluorescens* PL7.1 apresentou maior log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis em 72, 120 e 168 horas em relação ao grupo *L. monocytogenes* QF Oxford (Teste t de Student para amostras independentes, p≤0,0001) (Figura 3C e 3D).

### Avaliação dos sanitizantes na erradicação do biofilme em aço inox

Os sanitizantes foram aplicadas em biofilme multi-espécies conforme descrição no item 2.7. Após a incubação os cupons de aço inox contendo 4,23 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis da bactéria *L. monocytogenes* QF Oxford e 5,46 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis da bactéria *P. fluorescens* PL7.1 foram imersos em ácido peracético e hipoclorito de sódio. Transcorrido o tempo

da aplicação, foi realizada a contagem das células sésseis, para quais não foi observado crescimento no grupo tratado. Em 72 horas, na bactéria *L. monocytogenes* QF Oxford, um efeito de grupo (ANOVA de uma via,  $F(4,9) = 2686,580$ ,  $p \leq 0,0001$ ) foi observado, sendo a média de  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo *L. monocytogenes* QF Oxford maior que o grupo controle e todas maiores que os sanitizante (ácido peracético e hipoclorito de sódio) (*post hoc* de Bonferroni,  $p \leq 0,05$ ). O mesmo efeito foi evidenciado em 72 horas na bactéria *P. fluorescens* PL7.1 sendo a média de  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> do grupo PL7.1 (ANOVA de uma via,  $F(4,9) = 8811,621$ ,  $p \leq 0,0001$ , *post hoc* de Bonferroni,  $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

O presente estudo, analisou espécies de *Listeria* sp. a partir de amostras de alimentos, fatiados e superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambreteria no município de Porto Alegre - RS e identificou quatro espécies de *L. monocytogenes*, quatro de *L. innocua* e quatro pertencentes a espécie *L. seeligeri*. A ocorrência destas bactérias em alimentos prontos para consumo ou em locais, como bancadas de manipulação indica que as medidas de segurança para prevenir a contaminação devem ser melhoradas imediatamente. As espécies de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* são relatadas por outros trabalhos identificando estes micro-organismos em amostras semelhantes ao presente estudo (Skowron et al., 2019; Osman, Kappel, Fox, Orabi, & Samir, 2020; Gwida et al., 2020). No Brasil, Pessoa et al. (2020) descreveram a presença de *Listeria* sp. em salames do tipo Italiano, prontos para consumo. Souza et al. (2020) relataram a presença de *L. monocytogenes* e *L. innocua* em isolados de carcaça de frango. Estes dados reforçam os resultados apresentados e indicam possíveis falhas no processo de produção e processamento do alimento.

Para a maioria das infecções causadas por *L. monocytogenes* o tratamento de escolha é a ampicilina ou a penicilina, podendo ser utilizado eritromicina, gentamicina ou substituído por sulfametoxazol-trimetoprima (sulfazotrim) (Durán-Garrido, Gómez-Palomo, Estades-Rubio & Jiménez-Garrido, 2020; Rzepniewski, Goluchowska, Idziakowska & Najman, 2020). Na avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos, dos oito antimicrobiano testados, a ampicilina e a penicilina demonstraram-se eficientes na eliminação desta bactéria. Contudo observamos que 64,3% das bactérias utilizados no estudo apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado. Os antibióticos para os quais a resistência foi identificada foram a clindamicina (2 µg) e o sulfazotrim (25 µg). A resistência a clindamicina com isolados de *L. monocytogenes* é amplamente

descrita por outros trabalhos (Escolar, Gómez, del Carmen Rota García, Conchello, & Herrera, 2017; Ha, Myung & Yong, 2017; Oliveira et al., 2018; Arslan & Selin, 2019). A resistência ao sulfazotrim é importante por ser o medicamento de segunda opção em pacientes alérgicos a penicilina (Demoliner et al., 2015; Olaimat et al., 2018; Sanlıbaba et al., 2018). Estes fatores de resistência aos antimicrobianos mencionados é relacionada especialmente a aquisição de genes como (*mefA*, *erm*, *lnuA* e *lnuB*, *dfrD*, *dfrG* *dhfr*). Outro aspecto importante da resistência ao sulfazotrim é a conjugação do plasmídeo IP501 e transferência do transposon *Tn6198* entre *Enterococcus faecalis* para a *L. monocytogenes*, tornando-a resistente ao composto do sulfazotrim (Olaimat et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Matereke & Okoh, 2020; Escolar et al., 2017; Camargo et al., 2017; Maung et al., 2019).

Uma forma importante da *Listeria* sp. resistir ao ambiente é o potencial de formação de biofilme (Chusri & Voravuthikunchai, 2012; Lee et al., 2019). Das espécies de *Listeria monocytogenes*, três apresentaram-se com perfil de forte formadores de biofilme, na espécie de *L. innocua* todas apresentaram-se como moderados formadores de biofilme, já das espécies de *L. seeligeri*, três apresentaram perfil de moderado formador de biofilme e uma foi classificada como fraca formadora de biofilme em microplaca. Estudos com esta técnica exibiram níveis variados entre fraco, moderado e forte formador de biofilme (Harvey & Gilmour 2007; Dygico, Gahan, Grogan & Burgess, 2020; Osman et al., 2020). O ensaio da microplaca é uma medida reprodutível indireta de adesão celular e produção de biofilme e subsequentemente mensuração de biofilme *in vitro* (Nilsson, Ross & Bowman, 2011).

Um parâmetro importante para determinar se há adesão bacteriana ou formação de biofilme maduro é o número de micro-organismos presentes na superfície. Contagens acima  $5 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> são considerado com biofilme maduro (Wiktorczyk et al., 2018; Alonso & Kabuki, 2019; Ramires et al., 2021).

No presente estudo observamos que as três *L. monocytogenes* (4B, ATCC 35152 e QF Oxford) que demonstraram capacidade de formar biofilme no teste da microplaca, também foram capazes de formar biofilme em cupons após 24 horas de incubação, em meio de cultura TSBYE a 37 °C, tanto em material de aço inox quanto em polipropileno. Estudos com estas superfícies descrevem a formação de biofilme, com valores de células sésseis semelhantes ao presente trabalho (Alonso & Kabuki, 2019; Ripolles-Avila, Cervantes-Huaman, Hascoët, Yuste, & Rodríguez-Jerez, 2019; Skowron et al., 2019; Ramires et al., 2021). Contudo se os isolados produzirem biofilme apresentando células sésseis superiores a  $5 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> em 24 horas, algumas bactérias podem reduzir o número de células sésseis quando expostos em longos períodos

(Bonsaglia et al., 2014; Ramires et al., 2021). No presente estudo este dado foi observado, em cupons de aço inox, onde a *L. monocytogenes* ATCC 35152 obteve diminuição significativa de células sésseis em 72 horas quando comparado a 24 horas de avaliação.

Os substratos como os meios de cultura podem inibir ou favorecer o crescimento de micro-organismos e alterar a composição do biofilme, dependendo das estruturas químicas envolvidas (Bassi, Cappa, Gazzola, Orrù & Cocconcelli, 2017). Neste estudo avaliamos a capacidade da *L. monocytogenes* em formar biofilme na matriz alimentar leite UHT integral, onde observamos uma redução no valor de UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis em comparação ao meio de cultura utilizado. Alonso e Kabuki (2019) observaram uma redução de aproximadamente 1 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> na quantidade de células sésseis de *L. monocytogenes* em 24 horas de incubação, na proteína do soro de leite, quando comparado ao o substrato meio de cultura. Neste estudo observamos uma redução de 1,93 e 1,96 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> nos valores de células sésseis em cupons de aço inox e polipropileno respectivamente, quando cultivadas em substrato leite UHT em relação as culturas em meio TSBYE em 24 horas de avaliação. Essa redução em log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> pode ser atribuída a proteína do leite, devido a sua composição, em disputar o mesmo local na superfície dos cupons, influenciando a capacidade de adesão bacteriana (Bassi et al., 2017; Alonso et al., 2020). Portanto a diferença nos valores relacionados aos cupons pode ser influenciada pela porosidade e textura da superfície entre os dois materiais testados (Marik et al., 2020; Dygico et al., 2020).

No processo de adesão o fator da temperatura também é um influenciador importante. Neste estudo observamos que a *L. monocytogenes* QF Oxford apresentou melhor desenvolvimento em temperatura ambiente, em ambas as superfícies com maior taxa de log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> em temperatura ambiente com médias de 28,6°C quando comparada as demais temperaturas testadas.

A temperatura em torno de 25 e 30°C é relatada como a de maior contagem de células sésseis deste micro-organismo quando utilizados materiais semelhantes (Dygico et al., 2020; Mendez, Walker, Vipham & Trinetta, 2020). Este fator é influenciado pela motilidade expressada em *L. monocytogenes* em temperaturas próximas ao ambiente, e reduzida quando expostas em temperaturas de 37°C (Mendez et al., 2020; Muchaamba et al., 2021).

A interação cooperativa entre espécies bacterianas pode alterar a composição da matriz do biofilme aumentando a resistência, a biomassa do biofilme formado, aderência ou apresentar um ambiente de competição microbiana (Chen et al., 2019; Govaert, Smet, Walsh & Impe, 2019; Fagerlund et al., 2020). No presente estudo com cultivo associado em substrato leite UHT observamos a adesão celular em superfície de aço inox pela espécie *L. monocytogenes* QF Oxford, nos tempos de 24, 48 e 72 horas em temperatura ambiente. Já na superfície de polipropileno foi



possível observar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* QF Oxford nos tempos e temperatura mencionada. A *P. fluorescens* PL7.1 apresentou adesão celular em 24 horas em aço inox e formou biofilme após 48 horas de incubação para ambas as superfícies testadas em temperatura ambiente.

As avaliações das interações em biofilmes de duas espécies bacterianas, *Bacillus cereus* produtor de substância antagônica e *B. cereus* não produtor de substância antagônica para *L. monocytogenes* demonstraram que a *L. monocytogenes* apresentou aderência ao aço inox com contagens em torno de  $1 \log \text{ UFC/cm}^2$  o que não é considerado formação de biofilme, quando o crescimento ocorreu com a espécie produtor de substância antagonista. Por outro lado, a cooperação de crescimento apresentou contagens acima de  $5 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$  compatíveis com a formação de biofilme (Alonso et al., 2020). As avaliações descritas entre *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* em biofilmes, demonstraram que *L. monocytogenes* foi capaz de aderir à superfície de aço inox em condições de multi-espécies, e ao longo do período a quantidade de células sésseis da *L. monocytogenes* obteve um decaimento, por outro lado não influenciado o nível populacional de *P. fluorescens* (Maggio et al., 2021).

No presente estudo quando avaliamos as culturas mistas em temperatura de refrigeração em 72, 120 e 168 horas, observamos que no decorrer do tempo as células sésseis de *L. monocytogenes* se mantiveram inferiores a *P. fluorescens* na temperatura de refrigeração, sendo que a *P. fluorescens* demonstrou capacidade de formar biofilme mesmo em temperaturas de refrigeração ( $8,2^{\circ}\text{C}$ ). Estudos avaliaram a formação de biofilme em aço inox e em polipropileno em temperaturas de  $7^{\circ}\text{C}$ ,  $23^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C}$  por 24, 48 e 72 horas em duas espécies de bactérias psicrotólicas, relatando que ambas as culturas de *Pseudomonas fluorescens*, foram capazes de aderir a ambos os tipos de superfícies. A contagem de células bacterianas aderentes à superfície de polipropileno foi maior do que aquelas aderentes ao aço inox para ambos os isolados, isso em decorrência do tipo de superfície dos materiais testados (Bogo et al., 2020). Estes resultados corroboram com os valores encontrados no presente estudo.

As práticas sanitárias nos ambientes de produção de alimentos visam a eliminação de micro-organismos que possam ser patogênicos ou deteriorantes para os alimentos. As soluções à base de cloro, como o hipoclorito e o ácido peracético são os desinfetantes amplamente utilizados como sanitizantes em indústria de alimentos (Demoliner et al., 2015; Aryal & Peter 2019). Deste modo o presente trabalho avaliou a eficácia dos sanitizantes ácido peracético e hipoclorito de sódio na erradicação de células aderidas e de biofilme em cultivo associado. Estes dois produtos foram eficazes quando aplicados por 10 minutos em cupons contendo  $4,23 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$  de células

sésseis da bactéria *L. monocytogenes* QF Oxford e biofilmes com 5,46 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células sésseis da *P. fluorescens* PL7.1. Avaliações da eficiência de desinfetantes incluindo hipoclorito e ácido peracético descreveram que hipoclorito em baixa concentração é ineficaz na camada orgânica do biofilme, já o ácido peracético aplicado por 5 minutos em superfícies pode ser eficaz na redução de biofilmes formados. A utilização em conjunto de desinfetantes é descrita como eficiente, como a utilização dos compostos de amônio quaternário com peróxido de hidrogênio ou ácido peracético com peróxido de hidrogênio para obter a eficiência completa (Dhowlaghar et al., 2018; Aryal & Peter. 2019). Estudos que avaliaram ácido peracético em biofilmes formados por *Listeria monocytogenes* isoladas de uma fábrica de processamento de queijo, indicaram a eficiência deste sanitizante em biofilmes formados em aço inox (Lee et al., 2019). Resultados semelhantes foram observados neste estudo, indicando que a aplicação por 10 minutos é eficaz na eliminação de células aderidas de *L. monocytogenes* e biofilmes de *P. fluorescens* em cultivo associado.

Os isolados de *Listeria* sp. obtidos, mostraram-se como persistentes, com capacidade de adesão e formação de biofilme em superfície usadas nas indústrias de alimentos. Além disso, demonstraram ser resistente a antimicrobianos de segunda escolha no tratamento de infecções causadas por *L. monocytogenes*, podendo representar risco para os consumidores.

## CONCLUSÃO

Este estudo identificou três espécies bacterianas isoladas de produtos de origem animal, alimentos fatiados e de superfícies de manipulação de alimentos. As espécies identificadas foram: *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. seeligeri*, sendo que na susceptibilidade a antimicrobiano das espécies avaliadas, observamos que todos os isolados são sensíveis aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções causadas por *L. monocytogenes*. Contudo (64,3%) apresentaram resistência a clindamicina ou a sulfazotrin. A pesquisa demonstrou que, os isolados de *Listeria* sp. exibiram níveis variados de formação de biofilme *in vitro*, variando entre fraco, moderado e forte formador de biofilme.

A *L. monocytogenes* 4B, *L. monocytogenes* ATCC 35152 e *L. monocytogenes* QF Oxford, demonstraram capacidade de formar biofilme em cupons de aço inox e polipropileno com substrato meio de cultura TSBYE, além disso, a *L. monocytogenes* QF Oxford demonstrou capacidade de adesão em cupons, utilizando substrato de leite UHT integral em cultivo mono-espécie ou em cultivo associado à *Pseudomonas fluorescens* PL7.1 em diferentes temperaturas.

Os sanitizantes testados, o ácido peracético e hipoclorito de sódio, demonstraram eficiência na erradicação de células aderidas e biofilme em aço inox, quando aplicados conforme as recomendações dos fabricantes.

Portanto as superfícies e os alimentos quando manipulados de forma inadequada podem abrigar estes microrganismos, e como potencial formadoras de biofilmes aumentam a persistência de *Listeria* sp. nestes locais, tornando assim motivo de preocupação para o setor de alimentos. Destacamos a importância de a higienização adequada no processo de produção de alimentos a fim minimizar o risco a saúde do consumidor.

## REFERÊNCIAS

- Alonso, V. P. P., & Kabuki, D. Y. (2019). Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates. *International Journal of Dairy Technology*, 72(3), 472-478.
- Alonso, V. P. P., Harada A. M. M., Kabuki, D. Y. (2020). Competitive and/or cooperative interactions of *Listeria monocytogenes* with *Bacillus cereus* in dual-species biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 11:177. doi: 10.3389/fmicb.2020.00177
- Andrade, J. M., Moura, F. M. L., Silva, T. M. S. S., & Medeiros, E. S. (2019). *Listeria monocytogenes* in ham sliced in supermarkets in Recife city, Pernambuco state. *Arq. Inst. Biol*, 86, 1-4. e0652018
- Arslan, S. & Selin, B. (2019). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species and subtyping and virulence factors of *Listeria monocytogenes* from retail meat. *Journal of Food Safety*, 39(1), e12578.
- Aryal, M., & Peter, M. M. (2019). Efficacy of commercial sanitizers used in food processing facilities for inactivation of *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157: H7, and *Salmonella* biofilms. *Foods*, 8(12), 639
- Baba, H., Kanamori, H., Kakuta, R., Sakurai, H., Oshima, K., Aoyagi, T., & Kaku M. (2021). Genomic characteristics of *Listeria monocytogenes* causing invasive listeriosis in Japan. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 99(3),115233. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115233.
- Bassi, D., Cappa, F., Gazzola, S., Orrù, P. S., & Cocconcelli, P. S. (2017). Biofilm formation on stainless steel by *Streptococcus thermophilus* UC8547 in milk environments is mediated by the proteinase PrtS. *Applied and environmental microbiology* 83(8).
- Bogo, M., Costa, G. A., Frazzon, A. P. G., & Motta, A. S. (2020). Evaluation of the adhesion potential of psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw buffalo milk: Simulating

- storage conditions. *Buffalo Bulletin*, 39(2), 215-228.
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., Araújo, M. H., Tsunemi, V., & Rall., L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food control*, 35(1), 386-391.
- Camargo, A. C., Woodward, J.J., Call, D. R., & Nero, L. A. (2017). *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(11), 623-636.
- Chen, P., Wang, J. J., Hong, B., Tan, L., Yan, J., Zhang, Z., & Zhao Y. (2019). Characterization of Mixed-Species Biofilm Formed by *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 2543 (10), 1-15.
- Chusri, S., Phatthalung, P. N., & Voravuthikunchai, S. P. (2012). Anti-biofilm activity of *Quercus infectoria* G. Olivier against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 54(6), 511-7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: CLSI.
- Demoliner, F., Damasceno, K. S., Oliveira, D. P., Hallal, E. D., Mello, J. F., Lameiro, K. R., & Gandra, E. A. (2015). Resistance to disinfectants and antibiotics of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* spp. biofilms on polystyrene and stainless steel. *African Journal of Microbiology Research* 9(27), 1706-1715.
- Dhowlaghar, N., Abeyesundara, P.A., Nannapaneni, R., Schilling, M.W., Chang, S., Cheng, W.H., & Sharma, C.S. (2018). Growth and Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* in Catfish Mucus Extract on Four Food Contact Surfaces at 22 and 10°C and Their Reduction by Commercial Disinfectants. *J Food Prot* 81(1), 59-67.
- Durán-Garrido, F. J., Gómez-Palomo, J. M., Estades-Rubio, F.J., & Jiménez-Garrido, C. (2020). Infección por *Listeria monocytogenes* en paciente con sarcoma pélvico. *Rev Esp Casos Clin Med Intern (RECCMI)*, 2, 81-83.
- Dygico, L. K., Gahan, C. G., Grogan, H., & Burgess, C. M. (2020). The ability of *Listeria monocytogenes* to form biofilm on surfaces relevant to the mushroom production environment. *International Journal of Food Microbiology*, 317(20), 1-10.
- Escolar, C., Gómez, D., García, M. D. C. R., Conchello P., & Herrera A. (2017). Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from ready-to-eat products of animal origin in Spain. *Foodborne pathogens and disease*, 14(6), 357-363.
- Eucast - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2019). *Clinical*

*Breakpoint Tables v. 9.0,*

- European Food Safety Authority and European Center for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2019). The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926.
- Fagerlund, A., Heir, E., Moretro, T., & Langsrud, S. (2020). *Listeria monocytogenes* Biofilm Removal Using Different Commercial Cleaning Agents. *Molecules*, 25(4), 777-792.
- Ga-Hee, B., & Dong-Hyun, K. (2016). Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. *Food Microb*, 55(1), 47-54.
- Govaert, M., Smet, C., Walsh, J. L., & Impe, J. F. M. V. (2019). Dual-species model biofilm consisting of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*: development and inactivation with cold atmospheric plasma (CAP). *Frontiers in microbiology* 10: 2524.
- Gwida, M., Lüth, S., El-Ashker, M., Zakaria, A., El-Gohary, F., Elsayed, M., ... & Al Dahouk, S. (2020). Contamination Pathways can Be Traced along the Poultry Processing Chain by Whole Genome Sequencing of *Listeria innocua*. *Microorganisms*, 8(3), 414.
- Harvey, J., Keenan, K. P., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380-392.
- Hua, Z., Korany, A. M., El-Shinawy, S. H., & Zhu, M-J. (2019). Comparative evaluation of different sanitizers against *Listeria monocytogenes* biofilms on major food-contact surfaces. *Frontiers in microbiology*, 10, 2462.
- Kumar, S., Parvathi, A., George, J., Krohne, G., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2009). A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 527-531.
- Lee, B-H., Cole, S., Badel-Berchoux, S., Guillier, L., Feliz, B., Krezdorn, N., ... Piveteau, P. (2019). Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* strains under food processing environments and pan-genome-wide association study. *Frontiers in microbiology*, 10: 2698.
- Maggio, F., Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Valbonetti, L., Pomilio, F. & Paparella, A. (2021). Interactions between *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* in dual-species biofilms under simulated dairy processing conditions. *Foods*, 10(1), 176.
- Marik, C. M., Zuchel, J., Schaffner, D. W., & Strawn, L. K. (2020). Growth and survival of *Listeria monocytogenes* on intact fruit and vegetable surfaces during postharvest handling: A

- systematic literature review. *Journal of food protection*, 83(1), 108-128.
- Matereke, L. T., & Okoh, A. I. (2020). *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A Review. *Pathogens*, 9(7), 528.
- Maung, A.T., Mohammadi, T. N., Nakashima, S., Liu, P., Masuda, Y., Honjoh, K. I., & Miyamoto T. (2019). Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan. *International journal of food Microb*, 304, 49-57.
- Mazaheri, T., Cervantes-Huamán, B. R. H., Bermúdez-Capdevila, M., Ripolles-Avila, C., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2021). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen? *Microorganisms*. 9(1), 181
- Mendez, E., Walker, D. K., Vipham, J., & Trinetta, V. (2020). The use of a CDC biofilm reactor to grow multi-strain *Listeria monocytogenes* biofilm. *Food Microb*, 92: 103592.
- Miles, A. A., Mirsa, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*. 38(6), 732-49
- Muchaamba, F., Stephan, R., & Taurai, T. (2021). *Listeria monocytogenes* Cold Shock Proteins: Small Proteins with A Huge Impact. *Microorganisms* 9(5),1061.
- Nilsson, R. E., Ross, T., & Bowman, J. P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of food Microb*, 150(1), 14-24.
- Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Shahbaz, H. M., Al-Nabulsi, A. A., Abu- Ghoush, M. H., Osaili, T. M., ...Holley, R. A. (2018). Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1277-1292.
- Oliveira, T. S., Varjão, L. M., da Silva, L. N. N., Pereira, R. C. L., Hofer, E., Vallim, D. C., & de Castro Almeida, R. C. (2018). *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among isolates, and evaluation of antimicrobial susceptibility. *Food Control*, 88, 131– 138.
- Osman, K. M., Samir, A., Abo-Shama, U. H., Mohamed, E. H., Orabi, A., & Zolnikov, T. (2016). Determination of virulence and antibiotic resistance pattern of biofilm producing *Listeria* species isolated from retail raw milk. *BMC Microbiol*, 16, 263.
- Osman, K. M., Kappell, A. D., Fox, E. M., Orabi, A., & Samir, A. (2020). Prevalence, Pathogenicity, Virulence, Antibiotic Resistance, and Phylogenetic Analysis of Biofilm-Producing *Listeria monocytogenes* Isolated from Different Ecological Niches in Egypt:

- Food, Humans, Animals, and Environment. *Pathogens*, 9(1), 5. doi:10.3390/pathogens9010005
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microb*, 70, 5607-5612
- Pessoa, C. A. S. S., Aragão, B. B., Costa, C. A., Santos, H. C. S., Silva, M. G. V., Moura, A. P. B. L. (2020). Ocorrência de *Listeria* spp. em salame tipo Italiano comercializados em supermercados do bairro de Casa Amarela, Recife-PE. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, 14(4), 341-345.
- Pyz-Łukasik, R., Gondek, M., Winiarczyk, D., Michalak, K., Paszkiewicz, W., Piróg-Komorowska, A., ... & Ziomek, M. (2021). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Artisanal Cheeses from Poland and Its Identification by MALDI-TOF MS. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(6), 632.
- Ramires, T., Kleinubing, N. R., Iglesias, M. A., Soares, H. R., Nuncio, A. S. P., Kroning, I. S., ... Silva, W. P. (2021). Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi. *Food Research International*, 140: 109871.
- Ripolles-Avila, C., Cervantes-Huaman, B.H., Hascoët, A.S., Yuste, J., & Rodríguez-Jerez, J.J. (2019). Quantification of mature *Listeria monocytogenes* biofilm cells formed by an in vitro model: A comparison of different methods. *International journal of food Microb*, 289, 209-214.
- Rzepniewski, P., Goluchowska, N., Idziakowska, E. G., & Najman, B. K. (2020). Neonatal Listeriosis-Infection Leading to Death of the Newborn. A Case Report. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 29(2), 22311-22313.
- Schmidt, K., Estes, C., McLaren, A., & Spangehl, M. J. (2018). Chlorhexidine Antiseptic Irrigation Eradicates *Staphylococcus epidermidis* From Biofilm: An In Vitro Study. *Clinical orthopaedics and related research*, 476(3), 648-653.
- Skowron, K., Wiktorczyk, N., Grudlewska, K., Kwiecińska-Piróg, J., Wałęcka-Zacharska, E., Paluszak, Z., & Gospodarek-Komkowska, E. (2019). Drug-susceptibility, biofilm-forming ability and biofilm survival on stainless steel of *Listeria* spp. strains isolated from cheese. *Food Microb*. 296(2),75-82.
- Souza, C. O. S. S. S., Roça, R. O., Pinto, J. P. A. N., Sakate, R. I., Matos, A. V. R., & Moura, G. F. (2020). Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em frangos alternativos. *Brazilian Journal of Development*, 6 (6).

- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., & Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 428-432.
- Wiktorczyk, N., Grudlewska, K., Skowron, K., Gryń, G., & Gospodarek-Komkowska, E. (2018). The effect of blood on the ability of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Medical Research Journal*, 3(1): 28-31.
- Young-Min, B., Seung-Youb, B., & Sun-Young, L. (2012). Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 465-473.