UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Regiane Priscila Ratti

***Listeria monocytogenes* em alimentos fatiados e equipamentos:
ocorrência, formação de biofilme e controle**

Ribeirão Preto

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

***Listeria monocytogenes* em alimentos fatiados e equipamentos:
ocorrência, formação de biofilme e controle**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas a Farmácia, para
obtenção do título de Mestre em Biociências
Aplicadas a Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
a Farmácia
Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina
Pereira De Martinis

Ribeirão Preto

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Ratti, Regiane Priscila

Listeria monocytogenes em alimentos fatiados e equipamentos: ocorrência, formação de biofilme e controle. Regiane Priscila Ratti; Orientadora: Elaine Cristina Pereira De Martinis.

Ribeirão Preto, 2006.

96 p.: il.; 30cm

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia, área de concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

1. Biofilmes. 2. Co-culturas. 3. *L. monocytogenes*. 4. Nisina. 5. Ácido peracético. 6. Alimentos.

Autora: Regiane Priscila Ratti

Título: *Listeria monocytogenes* em alimentos fatiados e equipamentos:
ocorrência, formação de biofilme e controle

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis
(Orientadora)

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em ____/____/2006.

*“Para se fazer grandes coisas, não basta sonhar,
mas sonhar e acreditar”*

Anatole France

É com muito orgulho que dedico este trabalho a meus pais, por serem fonte de inspiração e guias nessa minha longa jornada. Pela dedicação por completo, a sua filha, através de amizade, educação, alegria, compreensão, incentivo e principalmente, muito amor, só tenho agradecer, amo vocês!

Ao meu sobrinho Vinícius, que tanto amo.

Ao meu irmão, Jean, pessoa que sempre respeitei, admirei e amo.

Ao meu grande amor, Rogério, pela compreensão e carinho dedicados nos momentos mais difíceis de minha vida. Amo você!

A minha grande amiga Karina, sempre presente em todos os momentos importantes de minha vida, como fonte de estímulo e como exemplo de ser humano.

À Deus por me conceder a graça de sempre ter tido saúde e sabedoria para chegar ao final de mais uma etapa de minha vida.

Agradecimentos

A pesquisa científica não é solitária, no decorrer deste trabalho fui orientada, inspirada e apoiada por diversas pessoas, às quais tenho muito que agradecer.

Agradeço a Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis, por me conceder a oportunidade de trabalho, pelo apoio e confiança depositados em mim durante o curso.

Aos meus queridos amigos e companheiros de pós-graduação do laboratório de Microbiologia da FCFRP-USP, Bruna, Cadu, Carol, Cláudia, Rafael e Virgínia por todos os momentos felizes, difíceis e de mútua orientação.

A técnica Vanessa Maciel, pelo auxílio e pela agradável convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento desta pesquisa (Edital Universal, 480407/2004-5) e pela concessão de bolsa de mestrado (131087/2005-3).

Ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela realização das análises microscópicas.

A técnica Maria Dolores Ferreira da FMRP - USP, pela valiosa colaboração nas análises por Microscopia Eletrônica de Varredura.

A Profa. Dra. Maria Teresa Destro da FCF- USP e a sua equipe pela caracterização das amostras pela técnica de PFGE.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Sicchiroli Lavrador da FCFRP-USP, pela colaboração com a análise estatística.

*À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP,
juntamente com a coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biociências
Aplicada à Farmácia, da mesma unidade.*

*Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para
a conclusão deste trabalho.*

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS E ANEXO.....	vi
RESUMO	xvii
SUMMARY	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> e listeriose	1
1.2. Biofilmes	7
1.2.1. Formação de biofilmes por <i>L. monocytogenes</i> em culturas mistas ...	12
1.2.2. Técnicas para o estudo de biofilmes	14
1.2.3. Controle da formação de biofilme	15
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Amostras	21
3.2. Isolamento e identificação de <i>Listeria</i> sp.....	21
3.3. Classificação sorológica	24
3.4. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) dos isolados de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	25
3.5. Avaliação da formação de biofilmes	26
3.5.1. Formação de biofilmes por culturas puras de <i>L. monocytogenes</i> ..	26
3.5.1.1. Sistema estático	26
3.5.1.2. Sistema com agitação	29
3.5.2. Formação de biofilmes em culturas puras de <i>L. mesenteroides</i> ...	30

3.5.3. Co-cultura de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. mesenteroides</i>	32
3.5.4. Estudos com preparações de bacteriocinas semi-purificadas.....	34
3.6. Avaliação da formação de biofilmes por microscopia eletrônica de varredura	35
3.7. Controle da formação de biofilmes	37
3.7.1. Ácido peracético	37
3.7.2. Nisina	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Isolamento e identificação de <i>Listeria</i> sp.....	40
4.2. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	43
4.3. Avaliação da formação de biofilme	44
4.3.1. Formação de biofilmes por culturas puras de <i>L. monocytogenes</i>	44
4.3.1.1. Sistema estático	44
4.3.1.2. Sistema com agitação	47
4.3.2. Formação de biofilmes em culturas puras de <i>L. mesenteroides</i>	49
4.3.3. Co-cultura de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. mesenteroides</i>	50
4.3.4. Estudos com preparações de bacteriocinas semi-purificadas	56
4.4. Avaliação da formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura.....	57
4.5. Controle da formação de biofilmes	66
4.5.1. Ácido peracético	66
4.5.2. Nisina	67
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS	77

LISTA DE ABREVIATURAS

Bac+: cepa produtora de bacteriocina

Bac-: cepa não produtora de bacteriocina

BHI: caldo Infusão Cérebro-Coração

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças – EUA, do inglês “Center for Disease Control”

EMS: Electron Microscopy Sciences

FDA: Administração de Alimentos e Medicamentos – EUA, do inglês “Food and Drug Administration”

ICMSF: Comissão Internacional de Especificações em Microbiologia de Alimentos

LEB: caldo de enriquecimento para listérias

***L. mesenteroides* bac+:** *Leuconostoc mesenteroides* A11, produtor de bacteriocina

***L. mesenteroides* bac-:** *Leuconostoc mesenteroides* A13, não produtor de bacteriocina

MB: caldo de carne

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MRS: de Man, Rogosa Sharpe

MWB: caldo Welshimer’s modificado

PBS: solução salina fosfatada tamponada

PCR: reação da polimerase em cadeia

PFGE: Eletroforese em gel de campo pulsado

TSA: ágar soja trypticase

TSA-YE: ágar soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura

TSB: caldo soja tripticase

USDA: Departamento de Agricultura dos EUA, do inglês “United States Department of Agriculture”

WHO: Organização Mundial de Saúde, do inglês “World Health Organization”

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: <i>Listeria</i> sp em alimentos fatiados e superfície de equipamentos de fatiar obtidas a partir de coletas realizadas entre os dias 17/05/2004 e 29/11/2004, no comércio varejista de Ribeirão Preto – SP	41
Tabela 2: Comparação das populações máximas aderidas de <i>L. monocytogenes</i> , em sistema estático e com agitação, em estudos com lâminas de aço inoxidável em caldo BHI. *	48
Tabela 3: Comparação entre <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. mesenteroides</i> Bac+ e <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. mesenteroides</i> Bac-. *	55
Tabela 4: Avaliação da efetividade do ácido peracético para o controle de <i>L. monocytogenes</i> aderidas à lâmina de aço inoxidável após 24 h de incubação em caldo BHI, contendo a solução de ácido peracético preparada de acordo com as instruções do fabricante	66
Tabela 5: Avaliação da efetividade da bacteriocina nisina para o controle de <i>L. monocytogenes</i> aderidas à lâmina de aço inoxidável após 24 h de incubação em caldo BHI, contendo a solução de 10^3 UI/mL de nisina	67

LISTA DE FIGURAS E ANEXOS

	Pág.
Figura 1: Representação esquemática do método utilizado para o isolamento de <i>Listeria</i> sp., de acordo com Pagotto et al. (2002)	23
Figura 2: Representação esquemática das provas utilizadas para a identificação das espécies de <i>Listeria</i> , de acordo com Pagotto et al. (2002). X: Xilose; G: Glicose; R: Ramnose; M: Manitol; α : α -metil-D-manosídeo	24
Figura 3: Representação esquemática do teste de sorologia de <i>L.monocytogenes</i> , de acordo com o Manual da Difco, 1975	25
Figura 4: Representação esquemática do método utilizado para a enumeração de <i>L. monocytogenes</i> no corpo de prova de aço inoxidável	28
Figura 5: Representação esquemática do método utilizado para a enumeração de <i>L. monocytogenes</i> no corpo de prova de aço inoxidável, mantida em caldo BHI sob agitação, na posição vertical	29
Figura 6: Representação esquemática da técnica utilizada para enumeração de <i>L. mesenteroides</i> produtor (Bac+) e não produtor de bacteriocina (Bac-) aderidas aos corpos de prova de aço inoxidável	31
Figura 7: Representação esquemática dos testes de co-cultura <i>L.</i>	33

mesenteroides e *L. monocytogenes*, para enumeração destas bactérias aderidas aos corpos de prova de aço inoxidável

- Figura 8:** Representação esquemática do cultivo de *L. monocytogenes* em culturas brutas de bacterocina, para enumeração das bactérias aderidas aos corpos de prova de aço inoxidável 34
- Figura 9:** Representação esquemática da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), para a visualização de células de *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* aderidas às lâminas de aço inoxidável circulares (diâmetro de 1,2 cm) 36
- Figura 10:** Representação esquemática do tratamento com ácido peracético do biofilme de *L. monocytogenes* aderidas aos corpos de prova de aço inoxidável 38
- Figura 11:** Representação esquemática do tratamento com nisina do biofilme de *L. monocytogenes* aderidas aos corpos de prova de aço inoxidável 39
- Figura 12:** Perfis de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado dos isolados de *L. monocytogenes* estudados neste trabalho. **1:** 23; **2:** 26 A; **3:** 26 C; **4:** VA1; **5:** VA2, (dados obtidos por Destro e colaboradores, 2005, vide item 3.4.) 43
- Figura 13 A:** Formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA1, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões 45
- Figura 13 B:** Formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA2, inoculadas 45

em caldo BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões

- Figura 14 A:** Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 23, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões 46
- Figura 14 B:** Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 26 A, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões 46
- Figura 14 C:** Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 26 C, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões 46
- Figura 15:** Formação de biofilme por *L. monocytogenes* ATCC 19115, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões 46
- Figura 16 A:** Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 23 no sistema 47

sob agitação constante, em caldo BHI, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões

Figura 16 B: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 26 A em um 47

sistema onde a lâmina de aço inoxidável foi mantida na posição vertical sob agitação constante, em caldo BHI, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões

Figura 16 C: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 26 C em um 48

sistema onde a lâmina de aço inoxidável foi mantida na posição vertical sob agitação constante, em caldo BHI, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões

Figura 17: Formação de biofilme por *L. mesenteroides* Bac+ e *L.* 49

mesenteroides Bac- inoculados isoladamente, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em ágar MRS. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões

Figura 18: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L.* 50

mesenteroides produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* ATCC 19115, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões

Figura 19: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões 50

Figura 20 A: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* 23, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões 51

Figura 20 B: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* 23, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão 51

apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões

Figura 21 A: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* 26 A, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões 52

Figura 21 B: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* 26 A, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões 52

Figura 22 A: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* 26 C, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões 53

Figura 22 B: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L.* 53

monocytogenes 26 C, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões

Figura 23 A: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L.* 54

mesenteroides (Bac+) e *L. monocytogenes* ATCC 19115, em caldos BHI, acrescidos de 2% de sacarose, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões

Figura 23 B: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L.* 54

mesenteroides (Bac-) e *L. monocytogenes* ATCC 19115, em caldos BHI, acrescidos de 2% de sacarose, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões

Figura 24: Formação de biofilme nos testes de inoculação de *L.* 56

monocytogenes ATCC 19115 (1%) nas preparações brutas de bacteriocina de *L. mesenteroides* Bac+ e *L. mesenteroides* Bac- em caldos BHI incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em ágar TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e

os respectivos desvios padrões

- Figura 25:** Formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA1 visualizada através da MEV. 25A e 25B mostra as células de *L. monocytogenes* VA1 aderidas à superfície de aço inoxidável após 3 h de incubação no menor (1000X) e maior (5000X) aumento, respectivamente. 25C e 25D mostra a formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA1 após 24 h de incubação no menor e maior aumento 58
- Figura 26:** Formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA2 visualizada através da MEV. 26A e 26B mostra as células de *L. monocytogenes* VA2 aderidas à superfície de aço inoxidável após 3 h de incubação no menor (1000x) e maior (5000x) aumento, respectivamente. 26C e 26D mostra a formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA2 após 24 h de incubação no menor e maior aumento 59
- Figura 27:** Formação de biofilme por *L. monocytogenes* ATCC 19115 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no maior (5000x) e menor aumento (1000x) 59
- Figura 28:** Adesão de *L. monocytogenes* 23 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x 60
- Figura 29:** Adesão de *L. monocytogenes* 26 A em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x 60

Figura 30:	Adesão de <i>L. monocytogenes</i> 26 C em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x	61
Figura 31:	Adesão de <i>L. mesenteroides</i> A13 (Bac-) em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x	61
Figura 32:	Formação de biofilme por <i>L. mesenteroides</i> produtor de bacteriocina (Bac+) e <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no maior (5000x) e menor aumento (1000x)	61
Figura 33:	Formação de biofilme por <i>L. mesenteroides</i> não produtor de bacteriocina (Bac-) e <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no maior (5000x) e menor aumento (1000x)	62
Figura 34:	Adesão de <i>L. mesenteroides</i> produtor de bacteriocina (Bac+) e <i>L. monocytogenes</i> 23 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x	63
Figura 35:	Adesão de <i>L. mesenteroides</i> não produtor de bacteriocina (Bac-) e <i>L. monocytogenes</i> 23 em lâmina de aço inoxidável, após 24h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x	63
Figura 36:	Adesão de <i>L. mesenteroides</i> produtor de bacteriocina (Bac+) e <i>L. monocytogenes</i> 23 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x	64

e *L. monocytogenes* 26 A em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x

- Figura 37:** Adesão de *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* 26 A em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x 64
- Figura 38:** Adesão de *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* 26 C em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x 64
- Figura 39:** Adesão de *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* 26 C em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x 64
- Figura 40:** Formação de biofilme por *L. mesenteroides* Bac+ e *L. monocytogenes* ATCC 19115 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI modificado acrescido de 2% de sacarose, observados em MEV no maior (5000x) e menor aumento (1000x) 65
- Figura 41:** Formação de biofilme por *L. mesenteroides* Bac- e *L. monocytogenes* ATCC 19115 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI modificado acrescido de 2% de sacarose, observados em MEV no maior (5000x) e menor aumento (1000x) 66

Anexo 1: Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), segundo Graves e Swaminathan (2001)

Anexo 2: Dados utilizados para preparar os gráficos das figuras 13 A a 24. Valores estimados estão indicados por “est” e o limite de detecção do método foi de 2,3 log de UFC/cm². Quando não houve crescimento de nenhuma colônia nas placas, o resultado foi < 0,82 log de UFC/ cm²

RESUMO

RATTI, R. P. ***Listeria monocytogenes* em alimentos fatiados e equipamentos: ocorrência, formação de biofilme e controle.** 2006. 96f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Listeria monocytogenes é o agente causal da listeriose, uma doença que pode atingir mulheres grávidas (e seus fetos), crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico comprometido. A listeriose representa a maioria dos casos de morte decorrentes de toxinfecções alimentares.

Os alimentos são reconhecidos como fontes primárias da transmissão desta bactéria para o homem e *L. monocytogenes* já foi isolada de uma grande variedade de alimentos. Superfícies de equipamentos utilizados na produção de alimentos também podem estar contaminadas com este patógeno.

Falhas em procedimentos de higienização podem deixar resíduos nos equipamentos de processamento de alimentos e *L. monocytogenes* pode se aderir a superfícies abióticas e iniciar sua multiplicação, dando origem a biofilmes. A interação com bactérias de outras espécies pode influenciar na formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, constituindo um aspecto importante de estudo para auxiliar no controle da contaminação de alimentos por esta bactéria. *Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria láctica normalmente encontrada em alimentos e algumas cepas podem interferir na multiplicação de *L. monocytogenes* pela produção de bacteriocinas com atividade antilisterial.

Os biofilmes representam uma preocupação para indústria de alimentos, pois geralmente os microrganismos aderidos apresentam maior capacidade de resistir a tratamentos antimicrobianos.

Neste trabalho, foram coletadas 30 amostras de presunto cozido fatiado, 30 de mussarela fatiada e 30 de superfícies de equipamentos de fatiar alimentos, em estabelecimentos do comércio varejista de Ribeirão Preto – SP. As amostras foram avaliadas quanto à presença ou ausência de *L. monocytogenes* e também foi estudada a capacidade dos isolados em formar biofilme em cultura pura e em testes de co-cultura. O sanitizante ácido peracético e a bacteriocina nisina foram testados para controlar a formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

Os resultados obtidos mostraram que os isolados de *L. monocytogenes* formaram biofilme em superfície de aço inoxidável quando cultivados isoladamente ou em testes de co-cultura com *L. mesenteroides*. O tratamento da lâmina com ácido peracético inativou todas as células presentes no biofilme.

Nas condições utilizadas, nisina não apresentou atividade contra *L. monocytogenes* em biofilmes.

Palavras-chave: biofilmes, co-culturas, *L. monocytogenes*, nisina, ácido peracético, alimentos.

SUMMARY

RATTI, R. P. ***Listeria monocytogenes* in sliced foods and equipments: occurrence, biofilm formation and control.** 2006. 96 f. Dissertation (master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Listeria monocytogenes is the causal agent of listeriosis, an infection that targets mainly pregnant women (and their fetuses), children, the elderly and immunocompromised individuals. Listeriosis represents the majority of fatal cases of foodborne diseases.

Foods are recognized as primary sources of transmission of this bacterium to man and *L. monocytogenes* has been isolated from a great variety of foods. Surfaces of equipments used in the production of foods can harbour *L. monocytogenes*.

Failures in sanitization procedures can leave food residues adhered to equipments of food processing and *L. monocytogenes* can attach to abiotic surfaces, multiply and form biofilms. Interactions among bacteria of diverse species may influence biofilm formation by *L. monocytogenes* and this is an important issue to be studied to improve food safety. *Leuconostoc mesenteroides* is a lactic bacterium usually found in foods and some strains can interfere with the multiplication of *L. monocytogenes* by production of bacteriocins with antilisterial activity.

Biofilms represent a special concern to the food industry, because adhered microorganism are generally more resistant to antimicrobial treatments.

In this work, we collected 30 samples of sliced cooked ham, 30 of sliced mozzarella cheese and 30 of surfaces of food processing equipments, in the retail market of the city of Ribeirão Preto - SP. The samples were studied for presence or absence of *L. monocytogenes*. The ability of the isolates to form biofilms was also studied, in pure and in co-culture tests. The sanitizer peracetic acid and the bacteriocin nisin were tested to control biofilm formation by *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes formed biofilm on stainless steel coupons when cultivated alone or in co-culture with *L. mesenteroides*. The treatment of

stainless steel coupons with peracetic acid inactivated the cells of the biofilm. Under the experimental conditions tested nisin did not present activity against *L. monocytogenes* in biofilms.

Word-key: biofilms, co-culture, *L. monocytogenes*, nisin, peracetic acid, foods.

1. INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia vem observando que os consumidores estão à procura de alimentos naturais, que sejam submetidos a processamento mínimo, livres de conservadores e saudáveis (ZINK, 1997).

No entanto, há crescente preocupação com a inocuidade destes alimentos, devido à possibilidade de veiculação de patógenos bacterianos psicrotróficos como cepas não proteolíticas de *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes* (CRANDALL et al., 1994; HUGAS, 1998).

1.1. *Listeria monocytogenes* e listeriose

L. monocytogenes é uma bactéria com células na forma de bastonetes curtos, Gram-positiva, não formadora de esporos, catalase positiva, β -hemolítica e anaeróbia facultativa (LeMARC et al., 2002). Está amplamente distribuída na natureza e se multiplica em temperaturas que variam entre -1,5° C a 45° C. Além disso, *L. monocytogenes* é capaz de se proliferar em concentrações elevadas de cloreto de sódio e pH baixo (ROCOURT et al., 2000).

O gênero *Listeria* abrange as espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi* e *L. denitrificans* (BILLE et al., 2000). Apenas *L. monocytogenes* é reconhecidamente patogênica para o

homem, mas recentemente foi relatado um caso de bacteremia fatal causada por *L. innocua* em um paciente de 62 anos (PERRIN et al., 2003). Há 13 diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*, mas somente três (1/2a, 1/2b, e 4b) têm sido freqüentes em doenças humanas (NADON et al., 2001; GRAY et al., 2004).

Wiedmann et al. (1997) sugeriram a classificação de *L. monocytogenes* em três grupos distintos, com base em modelos de ribotipagem e alelos dos genes de virulência listeriolisina O (*hly*), ActA (*actA*) e internalina A (*inlA*). Segundo estes autores, o grupo I englobaria a maior parte das cepas isoladas de casos de listeriose humana; o grupo II as cepas isoladas tanto de humanos quanto de animais; e o grupo III seria formado por cepas que raramente estão envolvidas em casos de listeriose em humanos (WIEDMANN et al., 1997). As cepas dos grupos I e II são de ocorrência ampla em plantas processadoras de alimentos, e as cepas do grupo III não são comuns no ambiente de processamento (NORTON et al., 2001).

As cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos 1/2b, 3b, 3c e 4b, são classificadas dentro do grupo I, enquanto os sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a são classificados dentro do grupo II. O grupo III engloba as cepas pertencentes aos sorotipos 4a e 4c (NADON et al., 2001; GRAY et al., 2004).

Os alimentos são reconhecidos como fontes primárias de transmissão de *L. monocytogenes*, havendo relatos de surtos associados ao consumo de leite, queijos, carne bovina, suína, aves e peixes (VITAS et al., 2004; HANDA et al., 2005).

A maioria dos isolados de *L. monocytogenes* de alimentos pertencem ao sorogrupo 1. Entretanto, cepas pertencentes ao sorotipo 4b são responsáveis

por mais de 50% dos casos de listeriose. *L. monocytogenes* sorotipo 4b causou a maioria dos surtos relatados e os sorotipos 1/2a e 1/2b estão freqüentemente associados a casos esporádicos (BUNCIC et al., 2001, WALLACE et al., 2003, GILBRETH et al., 2005). Esta aparente controvérsia pode ser decorrente da diversidade de resposta de linhagens de *L. monocytogenes* a fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos: diferentes sensibilidades a fatores antilisteriais e/ou modificação do padrão de multiplicação e de virulência do patógeno ocasionada pela sobrevivência no alimento (BUNCIC et al., 2001; AUTIO et al., 2002).

Recentemente, em estudo realizado com produtos comerciais na Bélgica, foi pesquisada a presença de *L. monocytogenes* em 252 amostras de alimentos prontos para o consumo, sendo que a bactéria foi isolada de peixes (23,9%), carnes (14,3%) e queijos (40,5%) (COILLIE et al., 2004).

Dados do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) mostraram que em 3547 amostras de alimentos prontos para o consumo analisadas no ano de 1998, a prevalência de *L. monocytogenes* foi de 2,5%. Em 1999, a prevalência de *L. monocytogenes* em presunto fatiado e carne de porco foi de 4,6%, em carne assada fatiada e carne enlatada a mesma foi de 2,7% (http://www.fsis.usda.gov/oa/topics/lm_action.htm).

O FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos - EUA) e o USDA estimaram que 5% dos alimentos prontos para o consumo comercializados nos EUA estejam contaminados por *L. monocytogenes*. Acredita-se que os consumidores sejam expostos bilhões de vezes a cada ano a níveis indetectáveis de *L. monocytogenes* (GOMBAS et al., 2003). Entretanto, não há definição inequívoca da dose infecciosa desta bactéria (SAKATE et al., 2003).

A Comissão Internacional de Especificações em Microbiologia de Alimentos (ICMSF) considera alimentos aceitáveis para o consumo aqueles que apresentam *L. monocytogenes* em um número inferior a 100 UFC/g (SZABO et al., 2003).

A doença causada por *L. monocytogenes*, denominada listeriose, acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos e gestantes, podendo ocasionar meningite, encefalite, septicemia e aborto (SKOGBERG et al., 1992). Em indivíduos saudáveis, a manifestação se apresenta como um quadro de gripe precedido por febre persistente ou de disfunção gastrointestinal (www.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html). Alguns estudos sugerem que até 21% dos humanos sejam portadores desta bactéria no trato intestinal (RYSER e MARTH, 1999).

A listeriose é uma doença rara, mas pode causar uma infecção invasiva em indivíduos imunocomprometidos, com taxa de mortalidade de 20% a 30% entre pacientes hospitalizados, segundo os dados obtidos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004).

Condições subjacentes que predisõem à listeriose incluem cardiopatias, diabetes melito, doenças renais, alterações hepáticas, hemodiálise freqüente e transplante de órgãos. Mesmo assim, é importante ressaltar que 15% dos casos de listeriose, revistos por Skogberg et al., 1992, referiam-se a pacientes previamente sadios, sem registro de doença de base.

A listeriose ocorre tanto em surtos, como em casos esporádicos (SCHUCHAT et al., 1991). A incidência anual de listeriose varia entre 0,1 a 11,3 casos por milhão de habitantes (NOTERMANS et al., 1998).

Na Dinamarca a incidência anual de listeriose variou de 0,42 a 0,73 casos por milhão de habitantes entre 1994 e 2003 (GERNER-SMIDT et al., 2005). Nos Estados Unidos, a incidência entre 1987 e 1997 foi de 9,4 casos por milhão de habitantes sendo que este número representava um total estimado de 1850 casos de listeriose por ano (MEAD et al., 1999). Para o ano de 2005, nos EUA, foram notificados 135 casos de listeriose, o que corresponde a 0,30 casos por 100,000 habitantes (www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5514a2.htm). Na França, a incidência em 2003 foi de 3,2 casos por milhão de habitantes (JACQUET et al., 2004). No Brasil, não é de nosso conhecimento o relato de caso de listeriose comprovadamente ocasionado pelo consumo de alimento contaminado.

A ocorrência de listeriose em diferentes países varia provavelmente devido a diferentes taxas de ocorrência de *L. monocytogenes* nos alimentos, diversidade de hábitos alimentares e diferenças na investigação de surtos de toxinfecções alimentares (ROCOURT et al., 2000).

No ano de 2001, foi relatado o primeiro surto de listeriose no Japão e este foi associado ao consumo de queijo caseiro. Os autores analisaram 186 amostras fecais de pacientes que apresentaram sintomas de gastroenterite após o consumo do alimento incriminado, apresentando 10,2% de amostras positivas para a presença de *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* 1/2b foi detectada em 15 amostras de queijo e 19 amostras fecais, mostrando que esta bactéria foi responsável pelo surto de listeriose (MAKINO et al., 2005).

Entre 01 de julho e 30 de novembro de 2002, ocorreu um surto de listeriose em nove estados dos EUA, infectando 188 pessoas. O surto foi relacionado ao consumo de carne de peru e a cepa causadora era pertencente

ao sorotipo 4b. Dentre as pessoas infectadas, haviam gestantes, neonatos, indivíduos imunocomprometidos e idosos (GOTTLIEB et al., 2006).

Em casos de gastroenterite causados por *L. monocytogenes*, os alimentos incriminados apresentavam um alto número de células (aproximadamente 10^8 UFC/g). A capacidade de *L. monocytogenes* causar doença depende do número de células de microrganismos no alimento consumido, da susceptibilidade do hospedeiro e da virulência da cepa (WAGNER e ALLERBERGER, 2003).

A infecção perinatal por *L. monocytogenes* ocorre por transmissão transplacentária ou pode resultar da contaminação do recém-nascido durante o parto (ROCOURT et al., 2000). Quando *L. monocytogenes* atinge o feto via placenta, a taxa de aborto é de 35% a 55% (SOUTHWICK e PURICH, 1996).

Mylonakis et al. (2002), em consultas a base de dados informatizadas, revisaram 222 casos de listeriose em quatro hospitais dos EUA, entre os anos de 1990 e 2000. Os autores identificaram 11 casos de mulheres com listeriose perinatal, e entre estas, duas apresentavam histórico de ter consumido alimentos envolvidos em surtos de listeriose (salada de repolho e cachorro quente), desenvolvendo os sintomas poucos dias após o consumo do alimento. Estes autores também observaram que dentre as 11 gestantes infectadas com a bactéria, duas abortaram, três tiveram recém-nascidos saudáveis e seis crianças nasceram infectadas.

De acordo com os dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) – EUA, entre 1998 e 1999, ocorreu um surto com 79 casos de listeriose em 17 estados, onde salsichas foram incriminadas como fontes de contaminação por *L. monocytogenes*. Em 2002, outro surto ocorreu no

nordeste dos EUA após o consumo de carne de peru fatiada, com o registro 10 mortes (FOONG e DICKSON, 2004).

Segundo dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças – EUA (CDC), a taxa de mortalidade anual causada por *L. monocytogenes* é oito vezes maior que aquela da doença causada por *Escherichia coli* 0157:H7 (MEAD et al., 1999).

1.2. Biofilmes

É possível que *L. monocytogenes* e outras espécies de *Listeria* possam contaminar alimentos processados por meio de equipamentos usados na produção, pois há relatos de persistência desta bactéria na indústria de alimentos (LUNDÉN et al., 2002; LIN et al., 2006).

L. monocytogenes é freqüente em plantas processadoras de alimentos, prevalecendo especialmente em lugares inacessíveis durante os procedimentos de limpeza (HOOD e ZOTTOLA, 1995). Este microrganismo já foi isolado de canais de escoamento, reservatórios de água, superfícies e fundos de contato com o alimento (WONG, 1998; LUNDÉN et al., 2000).

Sob determinadas condições, *L. monocytogenes* pode se aderir a superfícies abióticas e multiplicar-se, dando origem a uma massa celular, que pode agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos. Estruturas assim formadas pela multiplicação bacteriana são denominadas biofilmes (ZOTTOLA, 1994; COSTERTON et al., 1995).

Para caracterizar a formação de biofilme, segundo Andrade et al. (1998) é necessário haver um número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 ,

enquanto que Wirtanen et al. (1996) consideraram como biofilme um número de células aderidas de 10^3 por cm^2 .

L. monocytogenes tem capacidade de aderir-se a superfícies de contato com alimentos durante o processamento, incluindo plástico, polipropileno, borracha, aço inoxidável e vidro (HERALD e ZOTTOLA, 1988b; MAFU et al., 1990; WONG, 1998; LUNDÉN et al., 2000).

A adesão da bactéria a superfícies abióticas depende de fatores microbiológicos, físicos, químicos e do tipo de superfície (HILBERT et al., 2003). A topografia da superfície é considerada um parâmetro importante para adesão bacteriana. Flint et al. (1997a) afirmaram que superfícies abióticas podem ser modificadas química ou fisicamente, com o objetivo de reduzir a fixação e limitar a adesão de microrganismos.

A adesão bacteriana é influenciada pelo pH, temperatura, força iônica, características físicas e químicas da superfície e estado fisiológico da cultura (GUERRA et al., 2005).

A formação de biofilmes em instalações industriais pode levar ao aumento dos custos na produção e reduzir a vida de prateleira dos alimentos. Entretanto, o maior problema da formação de biofilme é a contaminação dos alimentos que pode trazer riscos a saúde dos consumidores (GUERRA et al., 2005).

Na natureza, os biofilmes podem ser formados por uma única espécie ou representar uma associação entre numerosas espécies (KALMOKOFF et al., 2001). A formação de biofilmes ocorre em duas fases distintas: na primeira, ocorre adsorção das células à superfície; na segunda fase, as células produzem polissacarídeos extracelulares, que formam uma estrutura multicelular complexa.

Na primeira fase, as células aderidas podem ser removidas da superfície mediante lavagem (KUMAR

e ANAND, 1998). Entretanto, após a formação definitiva do biofilme, a remoção dos microrganismos torna-se mais difícil (CHAE e SCHRAFT, 2000).

Os equipamentos utilizados na manipulação de produtos prontos para o consumo, como máquinas de fatiar, são locais onde *L. monocytogenes* pode aderir-se e tornar-se membro da microbiota local por um longo período de tempo (VOGEL et al., 2001; LUNDÉN et al., 2002; TOMPKIN, 2002).

Norwood e Gilmour (1999) e Lundén et al. (2000) estudaram a capacidade de adesão de diversas cepas de *L. monocytogenes* em aço inoxidável. Estes autores observaram que as cepas pertencentes ao sorotipo 1/2c apresentaram maior capacidade de adesão do que as pertencentes ao sorotipo 1/2b.

A formação de biofilmes por cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao grupo I é alta e foi demonstrada a ocorrência de diferenças estatísticas significativas quando se comparou com a formação de biofilme pelas cepas dos grupos II e III (DJORDJEVIC et al., 2002). Segundo Djordjevic et al. (2002) a capacidade das cepas do grupo I formarem biofilmes, pode ser um fator contribuinte para a prevalência de listeriose entre humanos. As cepas do grupo I podem representar uma evolução de *L. monocytogenes*, e o aumento da formação de biofilmes por estas cepas pode ser devido à presença ou à ausência de genes específicos ou por variações alélicas (DJORDJEVIC et al., 2002).

Pouco se sabe sobre a base genética da fixação e formação de biofilme por *L. monocytogenes*, mas a capacidade de sobrevivência em condições variadas pode estar relacionada com mecanismos moleculares. O fator sigma é um fator de transcrição que se associa a RNA polimerase, estando envolvido

no reconhecimento dos sítios de iniciação de transcrição (SCHAIK e ABEE, 2005). Estudos revelaram que este fator poderia estar envolvido na regulação da aderência e formação de biofilme por *L. monocytogenes* (SCHWAB et al., 2005).

Schwab et al. (2005), analisaram três cepas de *L. monocytogenes* (10403s, as cepas da linhagem II e o sorotipo 1/2a) quanto à capacidade de formarem biofilme em aço inoxidável na presença do fator sigma. Resultados deste estudo mostraram que as cepas testadas não formaram biofilme, mas fixaram-se rapidamente à superfície independentemente da presença do fator sigma, indicando, que o fator sigma não influenciou a aderência da bactéria na superfície.

Há relatos de cepas de *L. monocytogenes* persistentes, ou seja, dominantes em um determinado ambiente e repetidamente isoladas em um período de vários meses ou anos, possuindo habilidade para aderir à superfície após um rápido contato (MIETTINEN et al., 1999; LUNDÉN et al., 2000; BERRANG et al., 2005). Em contraste, cepas de *L. monocytogenes* não-persistentes são raramente isoladas do ambiente e somente se aderem a superfícies após um longo contato (LUNDÉN et al., 2000).

Lundén et al. (2003) investigaram a contaminação por cepas de *L. monocytogenes* persistentes e não-persistentes em quatro plantas processadoras de carnes: A, B, C e D. Estes autores mostraram que os perfis moleculares de *L. monocytogenes* obtidos por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para as cepas isoladas das plantas A, B e C eram idênticos aos encontrados na planta D, sendo que 19 tipos de PFGE foram classificados como persistentes e outros 28 tipos como não-persistentes. Dados do trabalho

de Lundén et al. (2003) revelaram ainda que a proporção de cepas persistentes e não-persistentes diferiram entre alimentos crus e cozidos, sendo a presença de cepas persistentes, oito vezes mais alta em produtos cozidos do que em alimentos crus.

Mafu et al. (1990) e Sasahara e Zottola (1993) demonstraram a capacidade de *L. monocytogenes* em aderir a várias superfícies, incluindo aço inoxidável, polipropileno e vidro. *L. monocytogenes* 7148 apresentou uma multiplicação lenta durante os dois primeiros dias de formação do biofilme e continuou aumentando a população até o quarto dia. Segundo os mesmos autores, os biofilmes de outras quatro cepas de *L. monocytogenes* decresceram lentamente após dois dias.

Blackman e Frank (1996) também analisaram a formação de biofilme por *L. monocytogenes* em materiais utilizados na indústria alimentícia (aço inoxidável, nylon, teflon e poliestireno), demonstrando a capacidade de *L. monocytogenes* se fixar e formar biofilme.

Foong e Dickson (2004) analisaram a capacidade de adesão de cinco cepas de *L. monocytogenes* (1/2a H7764, 4b H7969, 4b H7962, 4b OB90393 e Scott A) em superfícies de salsicha, presunto, mortadela e carne assada. Foi demonstrado que não havia diferenças de fixação na superfície entre os sorotipos testados, indicando que *L. monocytogenes* pode fixar-se rapidamente em superfícies de alimentos prontos para o consumo.

Moltz e Martin (2005) analisaram a capacidade de oito cepas de *L. monocytogenes* (7644, 19112, 15313, Scott A, LCDC, 10403s, SLCC e 1370) e uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* formarem biofilme em superfície de aço inoxidável, utilizando dois meios de cultura diferentes (caldo soja tripticase

- TSB e caldo Welshimer's modificado - MWB). A cepa de *P. aeruginosa* foi utilizada como controle positivo neste teste. Para a remoção de biofilmes aderidos à lâmina de aço inoxidável foram utilizados dois métodos: a remoção de biofilme com zaragatoa esterilizada ou vórtex. Os autores mostraram que os dois métodos foram eficazes na remoção do biofilme. Os resultados obtidos por estes autores, revelaram que as cepas de *L. monocytogenes* Scott A e LCDC formaram biofilme em superfície de aço inoxidável após 24 h e 48 h de incubação a 37° C, quando cultivadas em caldo TSB, e não formaram biofilme quando cultivados em caldo MWB. Ao contrário, as seis cepas restantes (7644, 19112, 15313, 10403s, SLCC e 1370) formaram biofilme em superfície de aço inoxidável quando cultivadas em caldo MWB após 24 h e 48 h, apresentando uma população de 10^6 UFC/cm².

Stepanovic et al. (2004) analisaram a formação de biofilme por *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* em superfície plástica em três meios de cultura diferentes (caldo Infusão Cérebro-Coração - BHI, caldo Soja Trypticase - TSB e caldo de Carne - MB), mostrando que *Salmonella* sp. apresentou maior capacidade de formar biofilme quando cultivada em caldo TSB, enquanto que caldo BHI foi mais eficiente para formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

1.2.1. Formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em culturas mistas

No ambiente de processamento, a presença de outras espécies bacterianas pode influenciar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* (BREMER et al., 2001). Estudos com co-culturas, indicam que o número de células de *L. monocytogenes* fixadas à superfície pode aumentar

significativamente quando comparado com culturas puras (SASAHARA e ZOTTOLA, 1993; BREMER et al., 2001; CARPENTIER e CHASSAING, 2004).

Leuconostoc mesenteroides é uma bactéria láctica normalmente encontrada em alimentos e pode interferir na multiplicação de *L. monocytogenes* pela produção de bacteriocinas com atividade antilisterial (STILES, 1994; MORISSET et al., 2004).

L. mesenteroides apresenta como uma de suas principais características fisiológicas, a capacidade de realizar fermentação heterolática com produção de ácido láctico, etanol e gás carbônico (CHAMPAGNE e GARDNER, 2002). Este microrganismo é capaz de sintetizar dextrana a partir da sacarose, utilizando a enzima dextranasacarase, sendo que o polímero formado se acumula ao redor das células na forma de uma cápsula ou camada espessa (CHAMPAGNE e GARDNER, 2002; TODOROV e DICKS, 2004).

Sasahara e Zottola (1993) observaram uma grande população de células de *L. monocytogenes* Scott A em biofilmes quando co-cultivada com *Pseudomonas fragi*. Os autores sugeriram que *L. monocytogenes* poderia usar aminoácidos fornecidos por outras bactérias presentes no ambiente, para obtenção dos sete aminoácidos essenciais para a sua multiplicação.

Schwab et al. (2005), observaram um aumento na população de *L. monocytogenes* quando co-cultivada com *Pseudomonas fluorescens*, sugerindo que este aumento poderia ser resultado de interações metabólicas. Observações similares foram feitas por Bremer et al. (2001), mostrando que a população de células de *L. monocytogenes* aderidas à lâmina de aço inoxidável quando co-cultivadas com *Flavobacterium* sp., aumentou significativamente quando comparada com cultura pura. Segundo estes mesmos autores, após a

morte de *Flavobacterium* sp., houve aumento da sobrevivência de *L. monocytogenes* no biofilme. Os autores postularam que esses efeitos seriam devido a matriz exopolissacarídica produzida por *Flavobacterium* sp., que favoreceria a adesão de *L. monocytogenes* por envolver as células bacterianas.

Carpentier e Chassaing (2004) analisaram a capacidade de algumas bactérias influenciarem na formação de biofilme por *L. monocytogenes*. Quatro cepas (*Kocuria varians* CCL 73, *Staphylococcus capitis* CCL 54, *Stenotrophomonas maltophilia* CCL 47 e *Comamonas testosteroni* CCL 24) exerceram efeito positivo na formação de biofilme por *L. monocytogenes*. No estudo de Carpentier e Chassaing (2004) as bactérias utilizadas para estudos de co-cultura foram isoladas de plantas processadoras de alimentos após a sanitização, mostrando que a microbiota residente no ambiente poderia influenciar a formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

1.2.2. Técnicas para o estudo de biofilmes

Para o estudo laboratorial de biofilmes, podem ser utilizadas técnicas de microscopia e outros métodos como reação da polimerase em cadeia (PCR), bioimpedância, hibridização *in situ*, enumeração em placas e ensaios de biofilme em placas de microtitulação utilizando o corante cristal violeta (GUILBAUD et al., 2005; MOLTZ e MARTIN, 2005). Dentre os métodos microscópicos podemos citar a microscopia de contraste de fase, de epifluorescência, de transmissão e a microscopia eletrônica de varredura. A microscopia eletrônica de varredura permite a visualização de substâncias poliméricas extracelulares e das células bacterianas fixadas, permitindo o

estudo estrutural de biofilmes que são formados em superfícies de aço inoxidável, alumínio, vidro, borracha, teflon e nylon (HERALD e ZOTTOLA, 1988 a; HERALD e ZOTTOLA, 1988 b; MAFU et al., 1990; NOTERMANS et al., 1991; ZOTTOLA, 1991; LINDSAY e Von HOLY, 1997).

Marsh et al., 2003, utilizaram a microscopia eletrônica de varredura para o estudo de formação de biofilmes por *L. monocytogenes*. Para tanto, *L. monocytogenes* Scott A foi cultivada em caldo TSB e incubada a 35°C por 24h de incubação. Foi relatado que *L. monocytogenes* Scott A primeiramente formou microcolônias na superfície de aço inoxidável, e em seguida as células mostraram-se circundadas por substâncias poliméricas extracelulares, formando um biofilme com estrutura tridimensional.

Moltz e Martin (2005) também observaram a formação de biofilmes em superfície de aço inoxidável por *L. monocytogenes* Scott A através de microscopia eletrônica de varredura, a cepa foi cultivada em caldo TSB e incubada por 4 dias a 20° C. *L. monocytogenes* Scott A formou biofilme em superfície de aço inoxidável apresentando microcolônias e um denso agregado celular quando observados no aumento de 25000 vezes.

1.2.3. Controle da formação de biofilme

A formação de biofilme pode proteger as células bacterianas aderidas frente à ação de produtos sanitizantes como cloro e iodo (NICKEL e COSTERTON, 1992; REID et al., 1993). A estrutura multicelular complexa e a forma tridimensional desempenham um papel importante na resistência dos biofilmes à sanitização (COSTERTON et al., 1995).

Estudos mostraram que alguns desinfetantes apresentam a capacidade de despolimerizar substâncias poliméricas extracelulares (EPS), facilitando a remoção de biofilmes (CHAVANT et al. 2004). Pertencem a este grupo os compostos oxidantes como o ácido peracético, cloro, iodo e peróxido de hidrogênio (JUVEN e PIERSON, 1996). A utilização do ácido peracético é considerada atualmente, uma alternativa interessante para a indústria de alimentos, pois é biodegradável e não oferece riscos à saúde por inalação de vapores e irritação ocular (MÜLLER et al., 2001).

O ácido peracético é constituído por uma mistura equilibrada de ácido peracético ($C_2H_4O_3$) (3,0%), ácido acético (CH_3COOH) (8,0%) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (12,0%). É um forte oxidante e vem sendo utilizado na indústria de alimentos para a sanitização de equipamentos (MÜLLER et al., 2001).

Somers e Wong (2004) analisaram a capacidade de alguns sanitizantes como o hipoclorito, ácido peracético e compostos derivados de amônio quaternário em inativar biofilmes. Resultados daquele estudo mostraram que o hipoclorito reduziu a população de *L. monocytogenes* no biofilme, e os outros sanitizantes testados (ácido peracético, compostos de amônio quaternário) não foram efetivos. Contudo Gilbert et al. (2001), mostraram que o ácido peracético foi mais efetivo em remover o biofilme formado por *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* em placas de microtitulação do que o cloro (GILBERT et al., 2001).

Robbins et al. (2005) analisaram a capacidade do ozônio, cloro e peróxido de hidrogênio em inativar os biofilmes formados por duas cepas de *L. monocytogenes* (Scott A e 10403S) em fragmentos de aço inoxidável,

mostrando que os três sanitizantes testados foram capazes de inativar tanto as células planctônicas quanto as presentes em biofilme.

Oh et al. (2005) testaram a eficiência do sanitizante ácido peracético em superfícies de alface inoculadas com *Escherichia coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *Salmonella* por 10, 30 e 60 minutos. Após 10 minutos, houve uma redução de 0,8 log para *E. coli*, 0,3 log para *Salmonella* e 2,5 log para *L. monocytogenes*. Após 30 minutos, as populações dos três microrganismos foram reduzidas para 2,2, 3,3, e 2,7 log, e após 60 minutos as reduções foram de 3,4, 4,5, e 3,8 log, respectivamente. Os resultados obtidos naquela pesquisa mostraram que quanto maior era o tempo de exposição ao sanitizante, maior era a redução do número de microrganismos.

Outras estratégias potenciais para o controle de biofilmes em superfícies de contato com alimentos envolvem o uso de compostos bioativos como bacteriocinas, as quais podem inibir a adesão celular (BOWER et al. 1995). As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos, produzidos por bactérias e que exercem ação antibacteriana, sendo a nisina a única bacteriocina aprovada atualmente para uso em alimentos (SCHILLINGER et al., 1998; DE MARTINIS et al., 2002). Pesquisas também demonstraram que sua utilização em superfícies de contato com alimentos pode reduzir a colonização bacteriana no alimento (BOWER et al., 1995).

A nisina é um peptídeo produzido por algumas cepas de *Lactococcus lactis* subespécie *lactis*, sendo um agente antimicrobiano importante para a indústria de alimentos (DELVES-BROUGHTON, 1990). Esta bacteriocina é aprovada pela Organização Mundial de Saúde como conservador para alimentos, e tem sido utilizada em cerca de cinquenta países em produtos

derivados de leite, carnes e vegetais (DELVES-BROUGHTON, 1990; THOMAS et al., 2002).

A bacteriocina nisina é estável ao calor, atóxica e sensível à ação de proteases digestivas. Nisina em combinação com outros fatores inibitórios, pode representar um obstáculo e diminuir a colonização bacteriana na indústria de alimentos (GUERRA et al., 2005).

Guerra et al. (2005), testaram a atividade de nisina contra *L. monocytogenes* em três superfícies de contato com o alimento (aço inoxidável, polietileno e borracha). Os resultados encontrados mostraram que a adsorção de nisina à superfície foi capaz de reduzir a fixação de *L. monocytogenes*.

Entretanto, a susceptibilidade das cepas de *L. monocytogenes* à nisina e a outras bacteriocinas é dependente da cepa analisada (RASCH e KNOCHEL, 1998). Pode ocorrer o desenvolvimento de resistência à nisina, limitando o seu uso por longos períodos. A frequência de resistência relatada para cepas de *L. monocytogenes* à nisina tem sido de 10^{-2} a 10^{-7} (GRAVESEN et al., 2002).

O mecanismo de resistência à nisina desenvolvido por *L. monocytogenes* não é bem explicado, mas parece ser resultante de múltiplos fatores. A nisina exerce sua atividade antibacteriana por meio da formação de poros na membrana da célula alvo. O mecanismo mais comum de resistência a nisina entre *Listeria* sp. e outras bactérias é impedir a formação de poros na membrana (MARTÍNEZ et al., 2005). A produção exopolissacarídea, a rigidez da parede celular e modificações na membrana celular têm sido observadas em cepas de *L. monocytogenes* resistentes à nisina (CRANDALL e MONTVILLE, 1998; GARDE et al., 2004).

Martínez et al. (2005) analisaram a susceptibilidade de *Listeria* sp. isoladas de queijos frente à nisina e à pediocina PA-1. Resultados daquela pesquisa, mostraram que as cepas testadas foram resistentes à nisina e a resistência variou de 10^{-3} a 10^{-6} . A pediocina PA-1 foi mais efetiva contra *L. monocytogenes* do que a nisina.

Devido à freqüente contaminação de alimentos prontos para o consumo por *L. monocytogenes* e considerando-se a capacidade desta bactéria formar biofilmes em superfícies de contato no processamento de alimentos, é de interesse conhecer sua ocorrência em alimentos fatiados e equipamentos usados no fatiamento, bem como avaliar a possível formação e controle de biofilmes por esta bactéria.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar a ocorrência de *Listeria* sp. em amostras de alimentos e de equipamentos de fatiar provenientes do comércio varejista de Ribeirão Preto – SP, bem como caracterizar os isolados, avaliar a capacidade de formação de biofilmes e estudar possíveis medidas de controle.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência de *Listeria* sp. em 30 amostras de presunto cozido fatiado, 30 amostras de mussarela fatiada e 30 amostras de equipamentos comerciais de fatiar alimentos;
- Classificar os isolados de *L. monocytogenes* em sorogrupos e por meio de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE);
- Avaliar a capacidade de *L. monocytogenes* formar biofilme em aço inoxidável em caldo de cultura (sistema estático e com agitação).
- Comparar a capacidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável, sozinha ou na presença de *L. mesenteroides* produtor e não produtor de bacteriorina;
- Avaliar a estrutura dos biofilmes formados por *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* A11 e A13, empregando-se o método de microscopia eletrônica de varredura.
- Testar a eficiência de nisina e de ácido peracético no controle da formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foram coletadas 30 amostras de presunto cozido fatiado, 30 amostras de mussarela fatiada e 30 amostras de superfícies de equipamentos de fatiar. Estas amostras foram obtidas no comércio varejista de Ribeirão Preto – SP, entre os dias 17/05/2004 e 29/11/2004.

As amostras provenientes de superfícies de equipamentos de fatiar (100cm²) foram coletadas com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada e inoculadas imediatamente em tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo de enriquecimento para listérias – caldo LEB (Oxoid) adicionado do suplemento UVM1 (Oxoid). Os alimentos e as zaragatoas foram transportados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, para o laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e analisados no mesmo dia.

3.2. Isolamento e identificação de *Listeria* sp.

Para o isolamento e identificação de *Listeria* sp. foi usada a metodologia descrita por Pagotto et al. (2002), conforme esquematizado na Figura 1.

Foram pesados 25 g de cada amostra (presunto ou mussarela fatiados), as quais foram homogeneizadas individualmente com 225 mL de caldo LEB (Oxoid) adicionado do suplemento UVM1 (Oxoid). Os caldos LEB inoculados com as amostras de alimentos e superfície de equipamentos de fatiar foram incubados a 30° C por 24 horas. Após a incubação, 0,1 mL de cada caldo de enriquecimento primário (LEB) foi transferido para tubos de ensaio contendo

caldo Fraser (enriquecimento secundário) e incubados a 35° C por 24-48 horas. As amostras positivas presuntivas para *Listeria* sp. (tubos com coloração negra no caldo Fraser, devido à hidrólise de esculina), foram semeadas em superfície de placas de ágar Oxford (Oxoid) adicionado do suplemento seletivo SR140 (Oxoid) e ágar PALCAM (Oxoid) adicionado do suplemento seletivo SR150 (Oxoid), e incubadas a 35° C por 24-48 horas.

Foi pesquisado crescimento típico de *Listeria* sp. em ágar Oxford e ágar PALCAM. No ágar Oxford, que possui como agentes seletivos cloreto de lítio, acriflavina, sulfato de colistina, cefotetan, cicloheximida e fosfomicina, as colônias de *Listeria* sp. aparecem negras com halos escuros ao redor, devido à hidrólise da esculina, visualizada por meios de íons ferro. Já o ágar PALCAM é altamente seletivo devido à presença de cloreto de lítio, ceftazidime, polimixina B e acriflavina. Ele permite a fácil identificação de *Listeria* sp., utilizando um sistema indicador duplo: (i) Esculina/ferro: *Listeria* sp. forma colônia com halo negro. (ii) manitol/vermelho de fenol: *Listeria* sp. não fermenta manitol e muda a cor do indicador de pH vermelho de fenol de vermelho para amarelo (Difco Laboratories, 1975; Maciel, 2003).

As colônias suspeitas foram purificadas em placas de ágar soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSAYE). Após incubação a 35° C por 24 horas, as colônias foram observadas sob luz transmitida e aquelas com coloração azul-esverdeada eram consideradas típicas do gênero *Listeria*.

As colônias selecionadas foram identificadas bioquimicamente de acordo com Pagotto et al. (2002) por meio de teste de catalase, coloração de Gram, teste de motilidade, prova de fermentação de carboidratos em tubos (D-glicose,

D-xilose, L-ramnose, manitol e α -metil-D-manosídeo), prova de Vermelho de Metila/ Voges Proskauer e API Listeria (bioMeriéux) (Figura 2).

Figura 1: Representação esquemática do método utilizado para o isolamento de *Listeria* sp., de acordo com Pagotto et al. (2002).

Figura 2: Representação esquemática das provas utilizadas para a identificação das espécies de *Listeria*, de acordo com Pagotto et al. (2002). X: Xilose; G: Glicose; R: Ramnose; M: Manitol; α: α-metil-D-manosídeo.

3.3. Classificação sorológica

As cepas de *L. monocytogenes* confirmadas pelo API Listeria foram submetidas à sorologia com antisoros para antígenos somáticos de *L. monocytogenes* dos grupos 1 e 4 (Difco). Para tanto, as cepas identificadas foram reativadas em 4 mL de caldo BHI (Caldo Infusão Cérebro-Coração, Oxoid) por 24 horas a 37° C. Em seguida, os tubos contendo as culturas foram colocados em banho-maria a 80° C por 1 hora. Foram retirados do banho-maria e centrifugados a 2500 rpm por 3 minutos (Centrífuga marca FANEM, Mod. 208 N). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi homogeneizado. Em seguida, foram testados os antisoros 1 e 4, sendo que a observação de aglutinação deveria indicar o grupo sorológico da cepa testada. Foi também

preparado um controle negativo, no qual uma porção do crescimento bacteriano foi colocado em lâmina com uma gota de solução salina para observar se ocorria a auto-aglutinação (Figura 3) (Difco Laboratories, 1975).

Figura 3: Representação esquemática do teste de sorologia de *L. monocytogenes*, de acordo com Difco Laboratories, 1975.

3.4. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) dos isolados de *L. monocytogenes*

Após a classificação das cepas de *L. monocytogenes* em sorogrupos, foi feita a análise do DNA das bactérias isoladas, através de PFGE. Este teste foi gentilmente realizado pela equipe da Profa. Dra. Maria Teresa Destro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, no laboratório de Microbiologia de Alimentos, em São Paulo.

As cepas foram tipadas empregando-se a técnica de PFGE seguindo o protocolo preconizado pelo CDC (GRAVES e SWAMINATHAN, 2001), apresentado no anexo 1.

3.5. Avaliação da formação de biofilmes

3.5.1. Formação de biofilmes por culturas puras de *L. monocytogenes*

3.5.1.1. Sistema estático

Para iniciar a padronização do método para avaliação da capacidade de *L. monocytogenes* formar biofilmes, foram utilizadas duas cepas de *L. monocytogenes* isoladas por Maciel (2003), a partir de presunto cozido e mussarela fatiados congelados. As cepas de *L. monocytogenes* testadas pertenciam aos sorogrupos 1 e 4, e eram denominadas *L. monocytogenes* VA1 e *L. monocytogenes* VA2.

Para avaliação da capacidade de formação de biofilme em lâminas de aço inoxidável por *L. monocytogenes* foi utilizada a metodologia descrita por Marsh et al. (2003), com modificações. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

As lâminas de aço inoxidável (AISI 302, com dimensão de 7,5 x 2,5 x 0,2 cm) foram imersas em solução aquosa de dodecil sulfato de sódio a 1% e mantidas em ebulição por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram enxaguadas em isopropanol a 100% por 5 minutos para a remoção de resíduos de detergente, enxaguadas em água destilada e esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121° C.

As lâminas pré-tratadas foram imersas em caldo BHI e neste caldo foram adicionadas aproximadamente 10^5 UFC/mL de *L. monocytogenes* previamente reativada em caldo BHI e incubado a 37° C. Foi feita a enumeração de *L. monocytogenes* aderida à superfície abiótica (15 cm²), de acordo com a técnica descrita por CHAE e SCHRAFT (2000). Para isso, fragmentos de aço inoxidável foram amostrados em 3 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após a inoculação. As bactérias aderidas à superfície dos fragmentos de aço inoxidável foram removidas por fricção manual (100 vezes) com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada. A amostra assim obtida foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina fosfatada tamponada pH 7,0 (PBS), constituída por cloreto de sódio (0,8%), cloreto de potássio (0,020%), fosfato de sódio dibásico (0,115%), fosfato de potássio monobásico (0,020%). O tubo foi agitado vigorosamente para que as bactérias ficassem suspensas na solução tamponante. Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas em PBS e o número de células foi determinado através de semeadura de 0,1 mL de cada diluição em superfície de ágar TSAYE (Figura 4).

Figura 4: Representação esquemática do método utilizado para a enumeração de *L. monocytogenes* no corpo de prova de aço inoxidável.

3.5.1.2. Sistema com agitação

Em uma etapa seguinte do trabalho, foi utilizado outro método para avaliar a formação de biofilme por *L. monocytogenes*, conforme esquematizado na figura 5. As lâminas de aço inoxidável foram mantidas na posição vertical em caldo BHI sob agitação com a utilização de uma barra magnética (agitador marca Fisatom, 15 rpm). Para isso, foi utilizado um suporte circular de aço inoxidável, com diâmetro de 4,5 cm e capacidade para acomodar seis lâminas. Foram realizadas amostragens após 3 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de incubação para a enumeração de *L. monocytogenes* aderida às lâminas.

Figura 5: Representação esquemática do método utilizado para a enumeração de *L. monocytogenes* no corpo de prova de aço inoxidável, mantida em caldo BHI sob agitação, na posição vertical.

Para detectar se as populações máximas de *L. monocytogenes* aderidas às lâminas de aço inoxidável no sistema com agitação (n=9) e sem agitação (n=9) diferiam se entre si, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (SIEGEL, 1959), bicaudal ao nível de significância de 5%.

3.5.2. Formação de biofilmes em culturas puras de *L. mesenteroides*

Para avaliar a formação de biofilme por *L. mesenteroides*, foi utilizada a cepa *L. mesenteroides* A11 produtora de bacteriocina, proveniente de nossa coleção de culturas, previamente isolada no laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP, de uma amostra de peito de frango (DE MARTINIS et al., 2001). Foi utilizada também a cepa *L. mesenteroides* A13, não produtora de bacteriocina, isolada de amostra cárnea e gentilmente cedida pela Profa. Dra. Mariza Landgraf, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

L. mesenteroides foi reativado em caldo MRS (de Man, Rogosa Sharpe - Oxoid) e incubado por 24 h a 25° C. Em seguida, 100 µL da cultura foram transferidos para caldo BHI e novamente incubado por 24 h a 25° C. A partir desta cultura, 500µL foram adicionados em um erlenmeyer contendo 100mL de caldo BHI e um fragmento de aço inoxidável (15 cm²). A incubação foi realizada a 30°C por 3 h, 24 h e 48 h.

A enumeração das células de *L. mesenteroides* aderidas à superfície de aço inoxidável, foi realizada de acordo com a técnica descrita por Chae e Schraft (2000), com modificações. O número de células de *L. mesenteroides* aderidas a lâmina de aço inoxidável foi determinado através da semeadura de 0,1 mL de diluições decimais seriadas em PBS das amostras obtidas de superfície de aço inoxidável em placas contendo ágar MRS (Figura 6).

Figura 6: Representação esquemática da técnica utilizada para enumeração de *L. mesenteroides* produtor (Bac⁺) e não produtor de bacteriocina (Bac⁻) aderidas aos corpos de prova de aço inoxidável.

3.5.3. Co-cultura de *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides*

Para iniciar a padronização dos testes de co-cultura, utilizou-se a cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b). Foram também utilizadas as cepas de *L. mesenteroides* A11 (produtor de bacteriocina) e A13 (não produtora de bacteriocina).

Para avaliar a capacidade das cepas de *L. mesenteroides* e *L. monocytogenes* formarem biofilme em testes de co-cultura, foi utilizada a metodologia descrita no item 3.5.1, com modificações. Para tanto, *L. mesenteroides* foi reativado em caldo MRS a 25° C e *L. monocytogenes* em caldo BHI a 37° C por 18-24 horas. *L. mesenteroides* foi novamente reativado em caldo BHI e incubado a 25° C por 24 horas. 500 µL da cultura de cada microrganismo foram adicionados em um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo BHI e um fragmento de aço inoxidável (15 cm²). Em seguida, foi feita a incubação a 25° C por 3 h, 24 h e 48 h.

A enumeração de *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* aderidos à superfície de aço inoxidável, foi feita de acordo com a técnica descrita no item 3.5.1, com modificações. O número de células foi determinado através da semeadura de 0,1 mL de diluições decimais seriadas (em PBS) em superfície nos meios seletivos: ágar MRS (Oxoid) para *L. mesenteroides* e ágar Oxford (Oxoid) para *L. monocytogenes* (Figura 7).

Os testes de co-cultura também foram realizados em caldo BHI modificado adicionado de 2% de sacarose, para avaliar se *L. mesenteroides* poderia interferir na formação de biofilme devido à sua capacidade de sintetizar dextranas a partir deste substrato.

Figura 7: Representação esquemática dos testes de co-cultura *L. mesenteroides* e *L. monocytogenes*, para enumeração destas bactérias aderidas aos corpos de prova de aço inoxidável..

Para detectar se as populações de *L. monocytogenes* nos biofilmes obtidos a partir de *L. monocytogenes* (n=12), *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac+ (n=12), *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac- (n=12), diferiam entre si, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1959), ao nível de significância de 5%. No caso do mesmo ser significativo, para detectar quais grupos diferiam entre si, foi empregado o teste de Mann-Whitney (SIEGEL, 1959), bicaudal, ao nível de significância global de 6%, o que levou a um nível de significância individual ajustado por Bonferroni de 2%.

3.5.4. Estudos com preparações de bacteriocinas semi-purificadas

L. mesenteroides A11 foi cultivado em 400 mL de caldo BHI, incubado a 25° C por 24 h. 100 mL da cultura foram centrifugados a 6720g (Centrífuga marca: Sorvall RC Plus, Du Pont, EUA) por 20 minutos a 4° C. O sobrenadante foi filtrado para obtenção da bacteriocina semi-purificada. Neste filtrado foram adicionados 500µL de cultura de *L. monocytogenes* previamente incubada em caldo BHI por 24 h a 30° C. Em seguida foi feita incubação a 30° C por 3 h, 24 h e 48 h. A determinação de UFC de *L. monocytogenes* aderidas ao fragmento de aço inoxidável foi realizada conforme descrito no item 3.5.1. (Figura 8).

Figura 8: Representação esquemática do cultivo de *L. monocytogenes* em culturas brutas de bacteriocina, para a enumeração das bactérias aderidas aos corpos de prova de aço inoxidável.

3.6. Avaliação da formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura

Para amostras selecionadas, a formação de biofilme, também foi avaliada de acordo com Marsh et al. (2003), empregando-se microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM5200) pertencente ao laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Para estas análises, lâminas de aço inoxidável circulares (diâmetro de 1,2 cm) foram preparadas de acordo com a técnica descrita no item 3.5.1.1. As lâminas contendo os biofilmes foram fixadas com solução de glutaraldeído a 2,5% (Electron Microscopy Sciences – EMS), enxagüadas em tampão cacodilato 0,1M (EMS), fixadas com tetróxido de ósmio (EMS) e enxagüadas. Em seguida, foi realizada a desidratação com etanol a 100% e hexametildisilazane (Sigma) nas proporções, 3:1, 1:1, 1:3 por 15 minutos e em seguida, 100% de hexametildisilazane por 24 h. As amostras desidratadas foram metalizadas com ouro ionizado utilizando o aparelho BAL-TEC, SCD 050 Sputter Coater (Alemanha) em atmosfera de argônio e observadas ao microscópio eletrônico de varredura.

Foi também avaliado um método para o preparo da amostra para observação por MEV, sem o emprego de hexametildisilazane, a fim de simplificar a técnica. Foi utilizada a metodologia descrita por Dufour et al. (2004), com modificações.

A desidratação foi realizada com etanol e água nas proporções de 50%, 70%, 90%, 95% e finalmente 100% de etanol por 10 minutos em cada etapa. Os fragmentos de aço inox contendo os biofilmes foram colocados em aparelho para desidratar a amostra – “Critical Point Dryer” (BAL-TEC, CPD030, EUA).

Após a desidratação, as amostras foram metalizadas com ouro ionizado, utilizando o aparelho BAL-TEC, SCD 050 Sputter Coater (Alemanha) em atmosfera de argônio. Após a metalização, as amostras foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura, para avaliação da formação de microcolônias e de possível estrutura tridimensional do biofilme, nos aumentos de 1000 e 5000 vezes (Figura 9).

Os resultados foram documentados por meio de fotografias, utilizando-se filme preto e branco (T-Max 100, Kodak, Rochestr, NY, EUA).

Figura 9: Representação esquemática da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), para a visualização de células de *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* aderidas às lâminas de aço inoxidável circulares (diâmetro de 1,2 cm).

As populações bacterianas aderidas às lâminas de aço inoxidável (diâmetro de 1,2 cm) foram estimadas pela contagem das células presentes nos campos visualizados sob MEV, utilizando-se as indicações de escala apresentadas em cada figura.

3.7. Controle da formação de biofilmes

3.7.1. Ácido peracético

Para avaliação da atividade do sanitizante ácido peracético frente às células de *L. monocytogenes* fixadas à superfície de aço inoxidável, foi utilizada a metodologia descrita por Andrade et al. (1998), com modificações.

Para tanto, foram obtidos biofilmes de *L. monocytogenes* segundo descrito no item 3.5, após 24 horas de incubação. A solução de ácido peracético (Proxitane 1512, Curitiba – PR) foi preparada de acordo com as instruções do fabricante (1 parte da solução para 40 partes de água).

Lâminas de aço inoxidável contendo biofilme foram tratadas com 30 mL da solução de ácido peracético por 30 segundos e por 3 minutos (ANDRADE et al., 1998). Após o tratamento, as lâminas foram neutralizadas com uma solução de tiosulfato de sódio a 1%, por 3 minutos e a determinação do número de UFC/cm² de *L. monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável, foi feita de acordo com a técnica descrita no item 3.5.1 (Figura 10).

Figura 10: Representação esquemática do tratamento com ácido peracético do biofilme de *L. monocytogenes* aderidas aos corpos de prova de aço inoxidável.

3.7.2. Nisina

Para avaliar o controle da formação de biofilme por *L. monocytogenes* foi utilizada uma solução de 10³ UI/mL de nisina (Sigma – N5764). Para o preparo da solução estoque, nisina foi dissolvida em solução de HCl 0,02N e cloreto de sódio 0,75%. A solução estoque foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121° C e após, o pH ajustado para 6,5 com solução esterilizada de NaOH, empregando-se fitas de medição de pH (Merck).

As lâminas contendo o biofilme, foram imersas em 30 mL da solução de nisina por 3 minutos, enxagüadas em 30 mL de PBS por 3 minutos e a determinação do número de UFC/cm² de *L. monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável, foi feita de acordo com a técnica descrita no item 3.5.1 (Figura 11).

Figura 11: Representação esquemática do tratamento com nisina do biofilme de *L. monocytogenes* aderidas aos corpos de prova de aço inoxidável.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e identificação de *Listeria* sp.

Na tabela 1, estão descritas as amostras de alimentos e os resultados para a presença ou ausência de *Listeria* sp., bem como a classificação sorológica de *L. monocytogenes*.

Os isolados de *L. monocytogenes* foram designados como 23 (proveniente da amostra número 23 de presunto cozido fatiado), 26 A (proveniente da amostra número 26 de presunto cozido fatiado) e 26 C (proveniente da amostra número 26 de superfície de equipamento de fatiar).

Tabela 1: *Listeria* sp. em alimentos fatiados e superfície de equipamentos de fatiar obtidas a partir de coletas realizadas entre o dias 17/05/2004 e 29/11/2004, no comércio varejista de Ribeirão Preto - SP

Número da amostra	<i>Tipo de amostra</i>	Presença (+) ou Ausência (-)	Identificação Sorogrupo
1	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
2	Presunto	+	<i>Listeria innocua</i>
	Mussarela	+	<i>Listeria innocua</i>
	Equipamento	+	<i>Listeria innocua</i>
3	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
4	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
5	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
6	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
7	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Presunto	-	NR
8	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
9	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Presunto	-	NR
10	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
11	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
12	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
13	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
14	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
15	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR

(NR): etapa não realizada; (+): presença; (-): ausência

Número da amostra	Tipo de amostra	Presença (+) ou Ausência (-)	Identificação Sorogrupo
16	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
17	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
18	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
19	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
20	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
21	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
22	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
23	Presunto	+	<i>L. monocytogenes</i> sorogrupo 4
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
24	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
25	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
26	Presunto	+	<i>L. monocytogenes</i> sorogrupo 1
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	+	<i>L. monocytogenes</i> sorogrupo 1
27	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
28	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
29	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR
30	Presunto	-	NR
	Mussarela	-	NR
	Equipamento	-	NR

(NR): etapa não realizada; (+): presença; (-): ausência

4.2. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As cepas de *L. monocytogenes* VA1, VA2, 23, 26 A e 26 C tipadas pela técnica de PFGE forneceram os perfis mostrados na figura 12.

Figura 12: Perfis de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado dos isolados de *L. monocytogenes* estudados neste trabalho. 1: 23; 2: 26 A; 3: 26 C; 4: VA1; 5: VA2, (dados obtidos por Destro e colaboradores, 2005, vide item 3.4).

4.3. Avaliação da formação de biofilme

Foi considerada formação de biofilme, a presença de um número maior ou igual a 10^3 UFC aderidas por cm^2 (3,0 log de UFC por cm^2) na lâmina de aço inoxidável, de acordo com o trabalho citado por Wirtanen et al., 1996.

4.3.1. Formação de biofilmes por culturas puras de *L. monocytogenes*

4.3.1.1. Sistema estático

Os resultados obtidos nos estudos para avaliar a formação de biofilme pelas cepas isoladas por Maciel (2003), mostraram que nas primeiras três horas de incubação, *L. monocytogenes* VA1, foi capaz de formar biofilme na lâmina de aço inoxidável apresentando uma população de 3,5 log de UFC/ cm^2 , e após 24 h de incubação, apresentou um número de 5,4 log de UFC aderidas por cm^2 . A cepa de *L. monocytogenes* VA2 formou biofilme nas primeiras três horas de incubação (4,0 log de UFC/ cm^2), apresentando um número máximo de células aderidas após 24 h de incubação (5,5 log de UFC/ cm^2). Após 72 h de incubação ocorreu uma redução do número de células viáveis de *L. monocytogenes* aderidas à lâmina, tanto pela cepa de *L. monocytogenes* VA1 quanto pela cepa de *L. monocytogenes* VA2, apresentando populações de 4,8 log de UFC/ cm^2 e 5,0 log de UFC/ cm^2 , respectivamente (Figura 13 A e 13B).

L. monocytogenes 23, 26 A e 26 C também foram avaliadas quanto à capacidade de formarem biofilme. Os resultados obtidos mostraram que os três isolados (dois de presunto cozido fatiado e um de equipamento de fatiar), foram capazes de formar biofilme após 3 h de incubação, apresentando uma

população inicial de 4,2 log de UFC/cm², 5,1 log de UFC/cm² e 5,6 log de UFC/cm² para *L. monocytogenes* 23, 26 A e 26 C, respectivamente. Estas bactérias apresentaram um número máximo de células aderidas à lâmina de aço inoxidável após 24 h de incubação, apresentando populações de 6,6 log de UFC/cm² (*L. monocytogenes* 23), 7,1 log de UFC/cm² (*L. monocytogenes* 26 A) e 7,1 log de UFC/cm² (*L. monocytogenes* 26 C). Para estas cepas também foi observado um decréscimo do número de células viáveis após 48 h de incubação (Figura 14 A, 14 B e 14 C).

A formação de biofilme por *L. monocytogenes* ATCC 19115, ocorreu após 3h de incubação (5,4 log de UFC/cm²), com um aumento significativo da população aderida após 24 h, atingindo 6,6 log de UFC/cm². Após 48 h de incubação houve um decréscimo das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas à lâmina (5,8 log UFC/cm²) (Figura 15).

Figura 13 A: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA1, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 13 B: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA2, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 14 A: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 23, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 14 B: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 26 A, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE, apresentando as respectivas médias e desvios padrões. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 14 C: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 26 C, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 15: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* ATCC 19115, inoculadas em caldo BHI, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

4.3.1.2. Sistema com agitação

As cepas de *L. monocytogenes* 23, 26 A e 26 C também foram avaliadas quanto à capacidade de formarem biofilme em lâmina de aço inoxidável sob agitação constante. Os resultados obtidos mostraram que os três isolados (23, 26 A e 26 C) foram capazes de formar biofilme, sendo observada a maior população após 24 h de incubação. O número de células viáveis aderidas foi de 5,2 log de UFC/cm² para *L. monocytogenes* 23, 5,5 log de UFC/cm² para *L. monocytogenes* 26 A e 5,4 log de UFC/cm² para *L. monocytogenes* 26 C. Após 72 h de incubação ocorreu uma redução do número de bactérias presentes no biofilme (Figura 16 A, 16 B e 16 C).

Figura 16 A: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 23 no sistema sob agitação constante, em caldo BHI, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 16 B: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 26 A no sistema sob agitação constante, em caldo BHI, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 16 C: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* 26 C no sistema sob agitação constante, em caldo BHI, incubados a 30^o C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

A Tabela 2 apresenta as médias, medianas e desvios-padrão do número máximo de células aderidas relativos à *L. monocytogenes* nos sistemas estático e com agitação.

Tabela 2: Comparação das populações máximas aderidas de *L. monocytogenes*, em sistema estático e com agitação, em estudos com lâminas de aço inoxidável em caldo BHI. *

Isolados	n	média	mediana	DP
<i>L. monocytogenes</i> (sistema estático)	9	6,88	6,90	0,2906
<i>L. monocytogenes</i> (com agitação)	9	5,40	5,50	0,3808

(n): número de isolados; (DP): desvio padrão

*Para esta análise estatística foram utilizados os resultados do testes em sistema estático e com agitação das culturas 23, 26 A e 26 C.

Na comparação dos grupos referentes à *L. monocytogenes* com e sem agitação, o teste de Mann-Whitney resultou em 0, menor que o valor tabelado de 7 (tabela K - SIEGEL, 1959) o que levou à conclusão que os dois grupos

diferiam entre si e o exame das médias sugeriu que o número máximo de células aderidas à lâmina de aço inoxidável relativo à *L. monocytogenes* sem agitação foi maior que o relativo à *L. monocytogenes* com agitação.

Estes resultados mostraram que a posição vertical da lâmina e a agitação dificultaram a adesão das bactérias, mas não impediram a formação de biofilme.

4.3.2. Formação de biofilmes em culturas puras de *L. mesenteroides*

A cepa de *L. mesenteroides* A11 - produtora de bacteriocina, não foi capaz de aderir-se à lâmina de aço inoxidável nos tempos de incubação testados. Já *L. mesenteroides* A13 - não produtor de bacteriocina, foi capaz de aderir-se à lâmina de aço inox após 3 h de incubação (2,4 log de UFC/cm²), formando biofilme após 24 h e apresentando um número máximo de células aderidas após 48 h de incubação (5,9 log de UFC/cm²) (Figura 17).

Figura 17: Formação de biofilme por *L. mesenteroides* Bac⁺ e *L. mesenteroides* Bac⁻ inoculados isoladamente, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em ágar MRS. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

4.3.3. Co-cultura de *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides*

Nos testes de co-cultura, com *L. mesenteroides* A11 e *L. monocytogenes* ATCC 19115, ocorreu adesão de *Leuconostoc* à lâmina de aço inoxidável após 24 h de incubação (2,7 log de UFC/cm²), ocorrendo a formação de biofilme a partir de 48 h de incubação, com um número de células aderidas de 4,3 log de UFC/cm². *L. monocytogenes* ATCC 19115, foi capaz de se aderir à lâmina de aço após 3 h (2,1 log de UFC/cm²) e formar biofilme após 24 h de incubação, apresentando uma população de células aderidas de 6,1 log de UFC/cm² (Figura 18).

L. mesenteroides A13, não produtor de bacteriocina, quando co-cultivado com *L. monocytogenes* ATCC 19115, foi capaz de aderir-se à lâmina de aço inoxidável após 3 h e formar biofilme após 24 h de incubação, apresentando um número máximo de células aderidas após 48 h (5,8 log de UFC/cm²). *L. monocytogenes* ATCC 19115 formou biofilme após 3 h de incubação (4,5 log de UFC/cm²), havendo um aumento significativo da população entre 24 h e 48 h (5,8 log de UFC/cm²) (Figura 19).

Figura 18: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* ATCC 19115, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 19: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

L. monocytogenes 23 foi capaz de formar biofilme após 24 h de incubação apresentando uma população de 5,0 log de UFC/cm² aderidas à lâmina de aço inoxidável, quando co-cultivada com *L. mesenteroides* A11, que também formou biofilme a partir de 24 h de incubação (4,6 log de UFC/cm²). Tanto a cepa de *L. monocytogenes* 23 quanto *L. mesenteroides*, produtor de bacteriocina, não foram capazes de se aderir à lâmina de aço inoxidável nas primeiras 3 h de incubação. Após 48 h de incubação, não foi notado a presença de *L. mesenteroides* Bac+ (Figura 20 A).

L. mesenteroides A13 quando co-cultivado com *L. monocytogenes* 23, foi capaz de aderir-se à lâmina de aço inoxidável nas primeiras 3 h e formar biofilme a partir de 24 h de incubação (3,6 log de UFC/cm²). Já a cepa de *L. monocytogenes* 23, formou biofilme na lâmina de aço inoxidável nas primeiras horas de incubação (3,8 log de UFC/cm²), aumentando a população a partir de 24 h (4,7 log de UFC/cm²) (Figura 20 B).

Figura 20 A: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* 23, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 20B: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* 23, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

L. monocytogenes 26 A aderiu-se à lâmina de aço inoxidável nas primeiras horas de incubação (2,5 log de UFC/cm²), formando biofilme a partir de 24 h (4,7 log de UFC/cm²) quando cultivada com *L. mesenteroides* A11. *L. mesenteroides* A11 foi capaz de se aderir à lâmina de aço inoxidável e formar biofilme após 24 horas de incubação apresentando uma população de 3,9 log de UFC/cm² (Figura 21 A).

L. mesenteroides A13, não produtor de bacteriocina, aderiu-se à lâmina de aço inoxidável nas primeiras horas de incubação apresentando 2,9 log de UFC/cm², formando biofilme após 24 h (4,0 log de UFC/cm²), quando co-cultivado com *L. monocytogenes* 26 A. Já *L. monocytogenes* 26 A formou biofilme nas primeiras horas de incubação apresentando uma massa celular de 3,8 log de UFC/cm² aderidas à lâmina de aço inox (Figura 21 B).

Figura 21 A: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* 26 A, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 21 B: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* 26 A, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

L. monocytogenes 26 C e *L. mesenteroides* A11 quando co-cultivados apresentaram perfis parecidos na formação de biofilmes: estas cepas não se aderiram à lâmina nas primeiras horas de incubação e formaram biofilme a partir de 24 h. Ocorreu um aumento da população (1,0 log de UFC/cm²) após 48 h de incubação, como mostrado na figura 22 A.

As cepas de *L. mesenteroides* A13 e *L. monocytogenes* 26 C se aderiram e formaram biofilme na lâmina de aço inoxidável nas primeiras horas de incubação. *L. mesenteroides*, não produtor de bacteriocina, apresentou uma população de 3,0 log de UFC/cm² nas primeiras horas de incubação e após 24 h, apresentou um número máximo de células aderidas de 4,5 log de UFC/cm². Já *L. monocytogenes* 26 C apresentou uma população de 4,3 log de UFC/cm² a partir de 24 h de incubação (Figura 22 B).

Figura 22A: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* 26 C, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 22B: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* 26 C, em caldos BHI, incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Os resultados obtidos nos testes de co-cultura realizados em caldo BHI modificado acrescido de 2% de sacarose foram similares em relação aos realizados em caldo BHI. *L. mesenteroides* A11 foi capaz de aderir-se à lâmina de aço inoxidável após 24 h de incubação (2,4 log de UFC/cm²), mas não formou biofilme. *L. monocytogenes* ATCC 19115 foi capaz de aderir-se após 3 h de incubação, apresentando uma baixa população de bactérias aderidas à lâmina (1,3 log de UFC/cm²). Esta cepa de *L. monocytogenes* foi capaz de formar biofilme após 24 h (6,2 log de UFC/cm²) (Figura 23 A).

L. mesenteroides A13 aderiu-se à lâmina após 3 h de incubação (2,3 log de UFC/cm²) e formou biofilme após 24 h (4,5 log de UFC/cm²). *L. monocytogenes* ATCC 19115 quando cultivada na presença de *L. mesenteroides* A13 formou biofilme após 3 h de incubação (4,4 log de UFC/cm²), aumentando gradativamente a população a partir de 24 h (5,3 log de UFC/cm²) (Figura 23 B).

Figura 23A: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* (Bac+) e *L. monocytogenes* ATCC 19115, em caldos BHI, acrescidos de 2% de sacarose, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

Figura 23B: Formação de biofilme nos testes de co-cultura contendo, *L. mesenteroides* (Bac-) e *L. monocytogenes* ATCC 19115, em caldos BHI, acrescidos de 2% de sacarose, incubados a 30° C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em meios seletivos MRS e Oxford. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

A Tabela 3 apresenta as médias, medianas e desvios-padrão do número máximo de células aderidas relativos à *L. monocytogenes*, *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac+ e *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac-.

Tabela 3: Comparação entre *L. monocytogenes*, *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac+ e *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac-. *

Isolados	n	média	mediana	DP
<i>L. monocytogenes</i>	12	6,81	6,75	0,2811
<i>L. monocytogenes</i> X <i>L. mesenteroides</i> Bac+	12	5,20	5,00	0,6836
<i>L. monocytogenes</i> X <i>L. mesenteroides</i> Bac-	12	4,73	4,60	0,5379

(n): número de isolados; (DP): desvio padrão

*Para esta análise estatística foram utilizados os resultados do testes em sistema estático das culturas 23, 26 A, 26 C e ATCC 19115.

Na comparação dos três grupos, o valor do teste de Kruskal-Wallis resultou em 24,75, maior que o valor tabelado de 5,99 (tabela C - SIEGEL, 1959) o que leva a conclusão que pelo menos um dos grupos difere dos demais. Para os testes de Mann-Whitney, o valor tabelado foi de 21 (tabela K - SIEGEL, 1959) e os valores calculados foram: 0 para os grupos *L. monocytogenes* x *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac+, 0 para os grupos *L. monocytogenes* x *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac- e 42 para os grupos *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac+ x *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac-. Isto levou a conclusão que existem diferenças entre os grupos *L. monocytogenes* x *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac+ e *L. monocytogenes* x *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac-. No entanto o teste não detectou diferenças entre os grupos *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac+ x *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides* Bac-.

4.3.4. Estudos com preparações de bacteriocinas semi-purificadas

L. monocytogenes ATCC 19115 quando cultivada nas preparações de bacteriocina semi-purificadas de *L. mesenteroides* A11, foi capaz de aderir-se à lâmina de aço inoxidável após 3 h de incubação (2,7 log de UFC/cm²) e formar biofilme somente após 24 h, apresentando 3,8 log de UFC/cm². Quando cultivada em caldo controle obtido a partir de *L. mesenteroides* A13 (não produtor de bacteriocina), *L. monocytogenes* ATCC 19115 formou biofilme após 3 h (4,1 log de UFC/cm²), apresentando um número máximo de células aderidas à lâmina de aço inoxidável após 24 h de incubação (5,6 log de UFC/cm²) (Figura 24).

Figura 24: Formação de biofilme nos testes de inoculação de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (1%) nas preparações brutas de bacteriocina de *L. mesenteroides* Bac+ e *L. mesenteroides* Bac- em caldos BHI incubados a 30°C e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em ágar TSA-YE. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrões.

4.4. Avaliação da formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura

Foram visualizadas colônias de *L. monocytogenes* VA1 e VA2 aderidas na superfície de aço inoxidável, após 3 h e 24 h de incubação. Quando avaliadas por esta técnica, após 24 h de incubação, estimou-se que o número de bactérias de *L. monocytogenes* VA1 aderidas à lâmina foi de 7,4 log de células aderidas por cm², enquanto que a população de células de *L. monocytogenes* VA2 foi de 7,1 log de células/cm².

Nas Figuras 25 e 26 estão reproduzidas imagens de microscopia eletrônica de varredura, mostrando o aspecto do biofilme formado por *L. monocytogenes* VA1 e VA2 após 3 h e 24 h de incubação.

O biofilme formado por *L. monocytogenes* ATCC 19115 em caldo BHI após 24 h de incubação, também foi visualizado por MEV. Foi estimada a presença de uma população de 6,6 log de células/cm² aderida à lâmina de aço inoxidável. Na figura 27 estão reproduzidas imagens obtidas através da MEV para esta cultura.

25A

25B

25C

25D

Figura 25: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA1 visualizada através da MEV. 25A e 25B mostra as células de *L. monocytogenes* VA1 aderidas à superfície de aço inoxidável após 3 h de incubação no menor (1000X) e maior (5000X) aumento, respectivamente. 25C e 25D mostra a formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA1 após 24 h de incubação no menor e maior aumento.

26A

26B

26C

26D

Figura 26: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA2 visualizada através da MEV. 26A e 26B mostra as células de *L. monocytogenes* VA2 aderidas à superfície de aço inoxidável após 3 h de incubação no menor (1000x) e maior (5000x) aumento, respectivamente. 26C e 26D mostra a formação de biofilme por *L. monocytogenes* VA2 após 24 h de incubação no menor e maior aumento.

Figura 27: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* ATCC 19115 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no maior (5000x) e menor aumento (1000x).

A formação de biofilmes por *L. monocytogenes* 23, 26 A e 26 C também foi avaliada por meio de MEV, e os resultados estão mostrados nas figuras 28, 29 e 30. Estes isolados aderiram-se e formaram biofilme após 24 h de incubação, sendo os números de bactérias aderidas à lâmina de aço inoxidável iguais a 7,2 log de células/cm² para *L. monocytogenes* 23, 7,6 log de células/cm² para *L. monocytogenes* 26 A e 7,6 log de células/cm² para *L. monocytogenes* 26 C.

L. mesenteroides A13, foi capaz de formar biofilme a partir de 24 h de incubação, apresentando uma população de 6,1 log de células/cm². Na figura 31 estão reproduzidas imagens obtidas através da MEV para esta bactéria. *L. mesenteroides* A11, não foi capaz de se aderir à lâmina de aço inoxidável no tempo de incubação testado.

Figura 28: Adesão de *L. monocytogenes* 23 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x.

Figura 29: Adesão de *L. monocytogenes* 26 A em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x.

Figura 30: Adesão de *L. monocytogenes* 26 C em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x.

Figura 31: Adesão de *L. mesenteroides* A13 (Bac-) em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x.

A MEV também foi realizada com amostras dos testes de co-cultura após 24 h de incubação, mostrando que as células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 foram capazes de aderir-se à lâmina de aço inoxidável quando co-cultivadas com *L. mesenteroides* A11, apresentando uma população de 6,2 log de células/cm². Neste ensaio não foi notada a presença de células de *L. mesenteroides* A11 aderidas à lâmina de aço inoxidável (Figura 32).

Figura 32: Formação de biofilme por *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no maior (5000x) e menor aumento (1000x).

L. monocytogenes ATCC 19115 também foi analisada por MEV quando cultivada com *L. mesenteroides* A13 em caldo BHI. Tanto *L. monocytogenes* ATCC 19115 quanto *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina, foram capazes de aderir-se e formar biofilme na lâmina de aço inoxidável, apresentando um número de 5,5 log de células/cm² para *L. monocytogenes* e 6,0 log de células/cm² para *L. mesenteroides* A13. Na figura 33 estão reproduzidas imagens da microscopia, onde pode-se notar que as células de *L. mesenteroides* aderiram-se formando um encadeamento.

Figura 33: Formação de biofilme por *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no maior (5000x) e menor aumento (1000x).

Na figura 34, podemos observar que tanto a cepa de *L. monocytogenes* 23, quanto a de *L. mesenteroides* A11, foram capazes de aderir-se e formar biofilme após 24 h de incubação quando co-cultivadas. Nesta figura, pode ser observado uma maior população de *L. mesenteroides* A11 (6,9 log de células/cm²) em relação a *L. monocytogenes* 23 (6,0 log de células/cm²).

L. monocytogenes 23 e *L. mesenteroides* A13 também foram observados através da MEV. Em co-cultivo, os dois microrganismos foram

capazes de aderir e formar biofilme após 24 h de incubação, apresentando uma população de 6,9 log de células/cm² para *L. monocytogenes* 23 e 6,3 log de células/cm² para *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Figura 35).

Figura 34: Adesão de *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* 23 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x.

Figura 35: Adesão de *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* 23 em lâmina de aço inoxidável, após 24h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x.

A figura 36 mostra que tanto a cepa de *L. monocytogenes* 26 A quanto *L. mesenteroides* A11, foram capazes de formar biofilme na lâmina de aço inoxidável no tempo de incubação testado. O número de bactérias aderidas à lâmina de aço inoxidável foi de 6,1 log de células/cm² para *L. monocytogenes* 26 A e 6,5 log de células/cm² para *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina. *L. mesenteroides* A11 aderiu-se a lâmina formando um encadeamento.

Em cultura mista, *L. monocytogenes* 26 A e *L. mesenteroides* A13, foram capazes de formar biofilme após 24 h de incubação, apresentando um número de 6,6 log de células/cm² e 6,2 log de células/cm² para *L. monocytogenes* 26 A e *L. mesenteroides*, respectivamente quando observados por MEV (Figura 37).

Figura 36: Adesão de *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* 26 A em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x.

Figura 37: Adesão de *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* 26 A em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x.

O crescimento de *L. monocytogenes* 26 C (6,8 log de células/cm²) quando co-cultivada com *L. mesenteroides* A11 (5,7 log de células/cm²) foi analisado por meio da MEV, os dois microrganismos testados foram capazes de aderir-se e formar biofilme, conforme podemos observar na figura 38.

Na figura 39, podemos observar uma maior população de *L. monocytogenes* 26 C (7,4 log de células/cm²) em relação ao crescimento de *L. mesenteroides* A13 (6,0 log de células/cm²) através da MEV.

Figura 38: Adesão de *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina (Bac+) e *L. monocytogenes* 26 C em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x.

Figura 39: Adesão de *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina (Bac-) e *L. monocytogenes* 26 C em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI, observados em MEV no aumento de 5000x.

Quando *L. mesenteroides* A11 e *L. monocytogenes* ATCC 19115 foram cultivados em caldo BHI modificado acrescido de 2% de sacarose, as células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 apresentaram uma morfologia alterada. Na presença de sacarose as células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 mostraram-se alongadas e *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina não foi capaz de aderir-se à lâmina de aço inoxidável. O número de bactérias aderidas foi de 6,4 log de células/cm² (Figura 40).

Figura 40: Formação de biofilme por *L. mesenteroides* Bac+ e *L. monocytogenes* ATCC 19115 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30° C em caldo BHI modificado acrescido de 2% de sacarose, observados em MEV no maior (5000x) e menor aumento (1000x).

L. mesenteroides A13 e *L. monocytogenes* ATCC 19115 quando cultivados em caldo BHI modificado contendo 2% de sacarose, formaram biofilme e não houve diferenças morfológicas nas células. A população estimada a partir das células visualizadas por MEV na lâmina de aço inoxidável foi de 6,5 log de células/cm² para *L. mesenteroides* e 5,9 log de células/cm² para *L. monocytogenes* (Figura 41).

Figura 41: Formação de biofilme por *L. mesenteroides* Bac⁺ e *L. monocytogenes* ATCC 19115 em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação a 30^o C em caldo BHI modificado acrescido de 2% de sacarose, observados em MEV no maior (5000x) e menor aumento (1000x).

4.5. Controle da formação de biofilme

4.5.1. Ácido peracético

Os biofilmes formado pelas cepas de *L. monocytogenes* 23, 26 A e 26 C em lâmina de aço inoxidável, após 24 h de incubação, foram submetidos a tratamento com o sanitizante ácido peracético por 30 segundos e 3 minutos, a fim de eliminar ou reduzir o biofilme.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados encontrados foram satisfatórios. Após um rápido contato (30 segundos), o ácido peracético foi capaz de eliminar todo o biofilme presente na lâmina de aço inoxidável formado pelas cepas de *L. monocytogenes* 23, 26 A e 26 C, mostrando ser um sanitizante com eficiente atividade bactericida.

Tabela 4: Avaliação da efetividade do ácido peracético para o controle de *L. monocytogenes* aderidas à lâmina de aço inoxidável após 24 h de incubação em caldo BHI, contendo a solução de ácido peracético preparada de acordo com as instruções do fabricante.

Isolados <i>L. monocytogenes</i>	Biofilme 24 h	Ácido peracético (30 segundos)	Ácido peracético (3 minutos)
<i>L. monocytogenes</i> 23	6,6	0	0
<i>L. monocytogenes</i> 26 A	7,1	0	0
<i>L. monocytogenes</i> 26 C	7,0	0	0

4.5.2. Nisina

No presente trabalho, 10^3 UI/ mL de nisina foram testadas com o objetivo de diminuir ou eliminar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* 23, 26 A e 26 C. As lâminas de aço inoxidável contendo os biofilmes foram tratadas com 10^3 UI/ mL de nisina por 3 minutos.

Os testes foram feitos em triplicata e os resultados encontrados mostraram que a nisina não foi efetiva no controle do biofilme. O biofilme formado pelas cepas de *L. monocytogenes* 23, 26 A e 26 C foram resistentes a nisina, não havendo redução da população dos microrganismos após o tratamento com a bacteriocina.

Tabela 5: Avaliação da efetividade da bacteriocina nisina para o controle de *L. monocytogenes* aderidas à lâmina de aço inoxidável após 24 h de incubação em caldo BHI, contendo a solução de 10^3 UI/mL de nisina.

Isolados <i>L. monocytogenes</i>	Biofilme 24 h	Nisina (3 minutos)
<i>L. monocytogenes</i> 23	6,4	6,2
<i>L. monocytogenes</i> 26 A	6,7	6,4
<i>L. monocytogenes</i> 26 C	6,9	6,5

5. DISCUSSÃO

No Brasil há poucos relatos sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, principalmente nos pontos de venda do comércio varejista. Por suas condições de manipulação e armazenamento, os alimentos prontos para o consumo são potenciais veiculadores deste microrganismo.

Em nosso trabalho, 60 amostras de alimentos foram analisadas, sendo que duas amostras (3,3%) foram positivas para a presença de *L. monocytogenes*. A prevalência de *L. monocytogenes* encontrada em nosso estudo foi menor do que a encontrada na Grécia por Angelidis e Koutsoumanis (2006), que analisaram um total de 209 amostras de carnes fatiadas prontas para o consumo para a presença de *L. monocytogenes*, obtendo 8,1% de amostras positivas.

Neste estudo, *L. monocytogenes* não foi isolada de amostras de mussarela fatiada. Este resultado está de acordo com os relatados por Gombas et al. (2003), que encontrou uma pequena porcentagem de amostras de queijo analisadas positivas para *L. monocytogenes* (0,17%).

Sergelidis et al. (1997) relataram a ocorrência de contaminação por *L. monocytogenes* em superfícies em contato com alimentos e em alimentos fatiados (1,7%). Em nosso trabalho, foi isolada *L. monocytogenes* a partir de uma amostra de presunto cozido fatiado (amostra número 26 A) e equipamento de fatiar (amostra número 26 C).

Assis et al. (2000) pesquisaram *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em 121 amostras de carnes provenientes de abatedouros no Brasil, obtendo 22

amostras positivas para *Listeria* sp. (18,2%), sendo 7,4% positivas para a presença de *L. monocytogenes*.

Também no Brasil, no trabalho realizado por Sakate et al. (2003) foram analisadas 45 amostras de salame fatiados embalados a vácuo para a presença de *L. monocytogenes*. Do total de amostras analisadas, 3 (6,7%) foram positivas para *L. monocytogenes*, sendo dois isolados pertencentes ao sorotipo 1/2a e outro ao 1/2b.

Em nosso trabalho, *L. monocytogenes* foi isolada de equipamento de fatiar e presunto cozido fatiado em um mesmo estabelecimento comercial, indicando que a presença da bactéria nos alimentos pode estar relacionada com o processo de fatiamento. Não é possível afirmar entretanto, se o alimento contaminou a superfície ou se o equipamento contaminou a amostra de presunto. Para esclarecer essas possibilidades, novos estudos deveriam ser implementados. Contudo, há na literatura estudos indicando a possibilidade de contaminação cruzada, Uyttendaele et al. (1999) observaram uma maior ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos cozidos após o fatiamento (6,65%) quando comparados com amostras de presunto cozido não fatiados (1,56%).

Lin et al. (2006) analisaram a possibilidade de contaminação cruzada por *L. monocytogenes* entre equipamentos de fatiar e amostras de carnes prontas para o consumo (carne de peru assada, salame e salsicha ("Bologna")). Os autores concluíram que *L. monocytogenes* poderia ser transferida da superfície contaminada de máquinas de fatiar produtos cárneos, sobrevivendo melhor em carne não curada do que em carnes curadas.

No presente trabalho, *L. innocua* também foi isolada de presunto cozido fatiado, mussarela fatiada e equipamento de fatiar de um mesmo estabelecimento comercial (amostra de número 2), sugerindo que a presença de listérias em superfícies de contato com o alimento pode favorecer a contaminação cruzada. Segundo Kathariou (2002), o isolamento de *L. innocua* pode indicar a contaminação por *L. monocytogenes*, pois *L. innocua* pode apresentar vantagem competitiva sobre *L. monocytogenes* em meios de cultura seletivos.

Coillie et al. (2004) encontraram uma alta prevalência de *Listeria* sp. em carnes fatiadas. Foram analisadas 70 amostras de carnes prontas para o consumo e a prevalência de *L. innocua* foi de 15,8% e 36,8% para *L. welshimeri*. Em nosso estudo, a porcentagem de amostras positivas para *L. innocua* foi de 3,3% e não houve o isolamento de *L. welshimeri*.

As cepas de *L. monocytogenes* isoladas foram classificadas em sorogrupos, sendo duas pertencentes ao sorogrupo 1 (amostras número 26 A e 26 C) e a outra pertencente ao sorogrupo 4 (amostra número 23). Os resultados estão de acordo com os encontrados por Maciel (2003), que isolaram duas cepas de *L. monocytogenes* (4,2%) provenientes de presunto e mussarela fatiados congelados, sendo um isolado pertencente ao sorogrupo 1 e outro ao sorogrupo 4.

É importante ressaltar que a maioria dos casos esporádicos de listeriose são causados pelas cepas pertencentes aos sorotipos 1/2a e 1/2b, enquanto muitos surtos de listeriose são causados pelas cepas pertencentes ao sorotipo 4b (WIEDMANN et al., 1997). Em nosso estudo foi obtido um isolado de *L.*

monocytogenes pertencente ao sorogrupo 4, o mais prevalente em doença humana.

L. monocytogenes 26 A e 26 C apresentaram perfis idênticos quando tipadas por PFGE. A capacidade de formação de biofilmes destes isolados, também foi avaliada. Nas observações realizadas com a técnica da MEV, foi observado que os números de células aderidas à lâmina de aço inoxidável foram iguais para os dois isolados (7,6 log de células aderidas/cm²). *L. monocytogenes* 26 A e 26 C foram provenientes de um mesmo estabelecimento comercial, indicando a possibilidade de contaminação cruzada e de persistência da bactéria no ambiente de processamento.

Os nossos resultados das análises realizadas por microscopia eletrônica de varredura, mostraram que após 3 h de incubação, as células de *L. monocytogenes* formaram biofilme, sendo observado um número máximo de células aderidas após 24 h. Esta técnica também foi utilizada por Marsh et al. (2003), para verificar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável, mostrando que *L. monocytogenes* Scott A aderiu-se à superfície e formou biofilme após 24 h de incubação a 35-37° C em caldo BHI. Entretanto, Kalmokoff et al. (2001) relataram que a maior parte das cepas de *L. monocytogenes* cultivadas em monocultura em caldo BHI, não formaram biofilme em lâminas de aço inoxidável (10⁶ - 10⁷ células aderidas por cm²).

Em um estudo conduzido por Moltz e Martin (2005) foi analisada a formação de biofilme por *L. monocytogenes* Scott A através da microscopia eletrônica de varredura em lâmina de aço inoxidável. Para esta análise foi depositado caldo TSB contendo a cultura previamente reativada sobre uma lâmina e em seguida foi realizada a incubação a 20° C por quatro dias. As

células de *L. monocytogenes* se aderiram à lâmina de aço inox formando uma estrutura tridimensional com denso agregado celular. Em nosso estudo, não houve formação de estrutura tridimensional semelhante à observada por Moltz e Martin (2005) provavelmente porque a lâmina de aço inoxidável estava imersa em caldo BHI.

Chae e Schraft (2000), também observaram a maior população de *L. monocytogenes* (10^5 UFC/cm²) em superfície de vidro após 24 h de incubação quando cultivada em caldo TSB, com um decréscimo do número de UFC aderidas por cm² após 72 h (10^3 UFC/cm²).

Não encontramos na literatura relatos de outros estudos sobre formação de biofilme em co-cultura de *L. mesenteroides* e *L. monocytogenes*. Entretanto há trabalhos indicando que a associação de *L. monocytogenes* com outros microrganismos pode favorecer a formação de biofilme (SASAHARA e ZOTTOLA, 1993; BREMER et al. 2001). Resultados de nossa pesquisa mostraram que *L. mesenteroides*, alterou a capacidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes*

Neste trabalho, na presença de *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina, as cepas de *L. monocytogenes* formaram biofilme após 24 h de incubação. Quando *L. monocytogenes* foi cultivada com *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina, ocorreu formação de biofilme logo nas primeiras horas de incubação. A presença da bacteriocina desfavoreceu a adesão de *L. monocytogenes* nas primeiras horas, mas não interferiu na formação de biofilme após 24 h de incubação.

Leriche et al. (1999) investigaram a formação de biofilme por *L. monocytogenes* quando co-cultivada com *Lactococcus lactis* CNRZ159

(produtor de nisina). Os resultados encontrados mostraram que *L. lactis* apresentou atividade antilisteriana dependente do nível de inoculação, com lenta inibição inicial, seguida pela estabilização da população. Os resultados encontrados por estes autores são similares aos obtidos em nossa pesquisa, onde a cepa de *L. mesenteroides* produtor de bacteriocina impediu a formação de biofilme por *L. monocytogenes* nas primeiras horas de incubação.

Bremer et al. (2001) analisaram a formação de biofilme em testes de co-cultura de *Flavobacterium* sp. e *L. monocytogenes*, mostrando que o número de células de *L. monocytogenes* fixadas à superfície de aço inoxidável aumentou significativamente quando comparado com a cultura pura. Resultados daquele estudo indicaram que a presença de colonizadores primários, como *Flavobacterium* sp. poderia aumentar o número de células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície, devido à sua incorporação na matriz exopolissacarídica. Este resultado discorda dos encontrados neste trabalho, em que o número de células aderidas às lâminas de aço inoxidável em cultura pura foi aproximadamente 1,0 log maior do que na presença de bactérias lácticas.

Em um estudo realizado por Carpentier e Chassaing (2004), a cepa de *Staphylococcus sciuri* CCL 101 diminuiu a população de *L. monocytogenes* em testes de co-cultura quando cultivados em fragmentos de aço inoxidável, mostrando que a microbiota acompanhante poderia aumentar ou diminuir a colonização por *L. monocytogenes* no ambiente de processamento. Em nossa pesquisa, a cepa de *L. mesenteroides* produtora de bacteriocina apresentou atividade antilisteriana nas primeiras horas de incubação, mas não impediu a formação de biofilme pelos isolados de *L. monocytogenes*.

Em nossos estudos com preparações livres de células contendo bacteriocina de *L. mesenteroides* A11, *L. monocytogenes* ATCC 19115 formou biofilme somente após 24 h de incubação, indicando que possivelmente a presença do peptídeo antimicrobiano foi capaz de reduzir o número de células viáveis nas primeiras horas de incubação.

Os resultados obtidos neste estudo, com a utilização do ácido peracético mostraram que após um rápido contato (30 segundos) o sanitizante foi capaz de remover e/ou inativar as células aderidas à lâmina de aço inoxidável. Os nossos resultados foram diferentes dos encontrados no trabalho de Somers e Wong (2004), no qual o perácido duplo (ácido peroxiacético e ácido peroxioctanóico) foi um sanitizante pouco efetivo frente aos biofilmes formados por *L. monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável.

Bagge-Ravn et al. (2003) analisaram a eficiência do ácido peracético na sanitização de equipamentos utilizados em uma casa defumadora de salmão. Foi utilizada uma solução de ácido peracético a 10%, a qual diminuiu o número de células de *L. monocytogenes* aderidas aos equipamentos após 30 minutos de tratamento.

No presente trabalho, a utilização de bacteriocina nisina foi avaliada para reduzir a população de *L. monocytogenes* em biofilmes, com um tratamento por 3 minutos. Os resultados obtidos mostraram que a solução de nisina utilizada (10^3 UI/mL) não alterou a população de *L. monocytogenes* aderida às lâminas de aço inoxidável, em comparação com controles. Os resultados obtidos em nossa pesquisa, discordam dos encontrados por Chi-Zhang et al. (2004), que utilizaram uma solução de nisina 10^5 UI/mL, observando uma redução de 2,0 - 3,0 log na população de *L. monocytogenes* quando cultivada em caldo BHI a

30° C. No estudo realizado por Chi-Zhang et al. (2004), a redução na população de *L. monocytogenes* pode ter sido devido, à inoculação da solução de nisina diretamente no caldo de cultura, diferente de nosso estudo, em que foi testada a eficiência da nisina frente as células de *L. monocytogenes* que já estavam em biofilme na lâmina de aço inoxidável.

Os nossos resultados, em superfície de aço inox, foram diferentes dos encontrados por Lungu e Johnson (2005), que mostraram que o tratamento com nisina reduziu 6,6 log da população de *L. monocytogenes* em superfície de salsichas.

Em muitos trabalhos, superfícies de aço inoxidável foram tratadas com nisina para impedir a adesão de microrganismos (CHI-ZHANG et al., 2004; GUERRA et al., 2005). Na literatura não encontramos relatos do tratamento de lâmina de aço inoxidável com nisina, após a formação de biofilme por *L. monocytogenes*. Os resultados obtidos no presente trabalho, mostraram que o tratamento com nisina após a formação de biofilme, não foi capaz de reduzir a população de *L. monocytogenes*.

6. CONCLUSÕES

- *Listeria* sp. foi detectada em alimentos fatiados (3,3%) prontos para o consumo e em superfícies de equipamentos de fatiar (3,3%), sugerindo a possibilidade de contaminação cruzada em estabelecimentos comerciais.
- Os isolados de *L. monocytogenes* de nosso trabalho apresentaram capacidade de formar biofilme em superfície de aço inoxidável, ocorrendo máxima adesão após 24 h de incubação.
- *L. monocytogenes* foi capaz de formar biofilme quando cultivada sozinha ou co-cultivada, indicando que a presença de *L. mesenteroides* produtor ou não produtor de bacteriocina, reduziram a população de *L. monocytogenes* aderidas à lâmina de aço inoxidável.
- A posição vertical da lâmina de aço inoxidável e a agitação dificultaram a adesão de *L. monocytogenes* à lâmina em caldo de cultura, mas não impediram a formação de biofilme por esta bactéria.
- A sanitização das superfícies de aço inox com ácido peracético foi eficiente para eliminar o biofilme formado por *L. monocytogenes*.
- A utilização de nisina (10^3 UI/mL) não foi eficiente para eliminação das células de *L. monocytogenes* aderidas em biofilme formados em superfícies de aço inoxidável.

7. REFERÊNCIAS

ANDRADE, N. J., BRIDGEMAN, T. A., ZOTTOLA, E. A. Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 833-838, 1998.

ANGELIDIS, A. S. e KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of *Listeria monocytogenes* in sliced ready-to-eat meat products in the Hellenic retail market. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 938-948, 2006.

ASSIS, M. A., DESTRO, M. T., FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. Incidence of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. In horsemeat for human consumption. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 161-164, 2000.

AUTIO, T., LUNDÉN, J., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., BJÖRKROTH, J., SJÖBERG, A. M., KORKEALA, H. Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 83-90, 2002.

BAGGE-RAVN, D., GARDSHODN, K., GRAM, L., VOGEL, B. F. Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: Survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 592-598, 2003.

BERRANG, M. E., MEINERSMANN, R. J., FRANK, J. F., SMITH, D. P., GENZLINGER, L. L. Distribution of *Listeria monocytogenes* subtypes within a poultry further processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 980-985, 2005.

BILLE, J., ROCOURT, J., SWAMINATHAN, B. *Listeria*, *Erysipelotrix*, and *Kurthia*. In: MURRAY, P., BARON, E. J., PAFLER, M. A., TENOVER, f. C., YOLKEN, R. H. (eds). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington. D. C.,: ASM, p. 346-352, 2000.

BLACKMAN, I. C. e FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 827-831, 1996.

BOWER, C. K., McGUIRE, J., DAESCHEL, M. A. Supression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 992-997, 1995.

BREMER, P. J., MONK, I., OSBORNE, C. M. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1369-1376, 2001.

BUNCIC, C., AVERY, S. M., ROCOURT, J., DIMITRIJEVIC, M. Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b

and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*?. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 201-212, 2001.

CARPENTIER, B. e CHASSAING, D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from industry premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 111-122, 2004.

CHAE, M. S. e SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 103 –111, 2000.

CHAMPAGNE, C. P. e GARDNER, N. J. Effect of process parameters on the production and drying of *Leuconostoc mesenteroides* cultures. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 291-296, 2002.

CHAVANT, P., GAILLARD-MARTINIE, B., HÉBRAUD, M. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 241-248, 2004.

CHI-ZHANG, Y., YAM, K. L., CHIKINDAS, M .L Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 15-22, 2004.

COILLIE, E. V., WERBROUCK, H., HEYNDRICKX, M., HERMAN, L., RIJPENS, N. Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food products on the Belgian market. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2480-2487, 2004.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R., LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

CRANDALL, A.D., WINKOWSKI, K., MONTVILLE, T.J. Inability of *Pediococcus pentosaceus* to inhibit *Clostridium botulinum* in sous vide beef gravy at 4 and 10° C. **Journal of Food Protection**, v. 57, p.104-107, 1994.

CRANDALL, A. D. e MONTVILLE, T. J. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 231-237, 1998.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. **Food of Technology**, v. 44, p. 100-117, 1990.

DE MARTINIS, E. C. P., PÚBLIO, M. R. P., SANTAROSA, P. R., FREITAS, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p. 32-37, 2001.

DE MARTINIS, E. C. P., ALVES, V. F., FRANCO, B. D. G. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v. 18, p. 191-208, 2002.

DIFCO Laboratories. **Serological Identification of *Listeria***, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra, p. 1471, 1975.

DJORDJEVIC, D., WIEDMANN, M.; McLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2950-2958, 2002.

DUFOUR, M., SIMMONDS, R. S., BREMER, P. J. Development of a laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of “natura”antimicrobials against biofilms. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1438-1443, 2004.

FLINT, S. H., BREMER, P. J., BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, v. 11, p. 81-97, 1997a.

FOONG, S. C. e DICKSON, J. S. Attachment of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 456-462, 2004.

GARDE, S., AVILA, M., MEDINA, M., NUNEZ, M. Fast induction of nisin resistance in *Streptococcus thermophilus* INIA 463 during growth in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 165-172, 2004.

GERNER-SMIDT, P., ETHELBERG, S., SCHIELLERUP, P., CHRISTENSEN, J. J., ENGBERG, J., FUSSING, V., JENSEN, A., JENSEN, C., PETERSEN, A. M., BRUUN, B. G. Invasive listeriosis in Denmark 1994-2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors for mortality. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 11, p. 618-624, 2005.

GILBERT, P., DAS, J. R., JONES, M. V., ALLISON, D. G. Assessment of resistance towards biocides following the attachment of microorganisms to and growth on surfaces. **Journal Applied of Microbiology**, v. 91, p. 248-254, 2001.

GILBRETH, S. E., CALL, J. E., WALLACE, F. M., SCOTT, V. N., CHEN, Y., LUCHANSKY, J. B. Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready-to-eat foods and listeriosis patients in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, 8115-8122, 2005.

GOMBAS, D. E., CHEN, Y., CLAVERO, R. S., SCOTT, V. N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 559-569, 2003.

GOTTLIEB, S. L., NEWBERN, E. C., GRIFFIN, P. M., GRAVES, L. M., HOEKSTRA, R. M., BAKER, N. L., HUNTER, S. B., HOLT, K. G., RAMSEY, F., HEAD, M., LEVINE, P., JOHNSON, G., SCHOONMAKER-BOPP, D., REDDY, V., KORNSTEIN, L., GERWEL, M., NSUBUGA, J., EDWARDS, L., STONECIPHER, S., HURD, S., AUSTIN, D., JEFFERSON, M. A., YOUNG, S. D., HISE, K., CHERNAK, E. D., SOBEL, J. Multistate outbreak of listeriosis

linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy.

Clinical Infectious Diseases, v. 42, p. 29-36, 2006.

GRAVES, L. M. e SWAMINATHAN, B. PulseNET standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 55-62, 2001.

GRAVESEN, A., AXELSEN, A. M. J., DA SILVA, J. M., HANSEN, T. B., KNOCHEL, S. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 756-764, 2002.

GRAY, M. J., ZADOKS, R. N., FORTES, E. D., DOGAN, B., CAI, S., CHEN, Y., SCOTT, V. N., GOMBAS, D. E., BOOR, K. J., WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5833-5841, 2004.

GUERRA, N. P., ARAUJO, A. B., BARRERA, A. M., AGRASAR, A. T., MACÍAS, C. L., CARBALLO, J., PASTRANA, L. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to surfaces commonly used in the food industry. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1012-1019, 2005.

GUILBAUD, M., COPPET, P., BOURION, F., RACHMAN, C., PRÉVOST, H., DOUSSET, X. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2190-2194, 2005.

HANDA, S., KIMURA, B., TAKAHASHI, H., KODA, T., HISA, K., FUJI, T. Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw seafood products in Japanese retail stores. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 411-415, 2005.

HERALD, P. J. e ZOTTOLA, E. A. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. **Journal of Food Protection**, v. 51, p. 445-448, 1988a.

HERALD, P. J. e ZOTTOLA, E. A. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1549-1552, 1988b.

HILBERT, L. R., BAGGE-RAVN, D., KOLD, J., GRAM, L. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 175-185, 2003.

HOOD, S. K. e ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, p. 9-18, 1995.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, p. S139-S150, 1998.

JACQUET, C. H. e MARTIN, P. Human listeriosis in France in 2003: data from national reference centre for *Listeria*. **Abstracts of the International Symposium on Problems of Listeriosis (ISOPOL XV)**. Uppsala, Suécia, 12 a 15 de setembro de 2004. p. 48.

JUVEN, B. J. e PIERSON, M. D. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantification. **Journal of Food Protection**. v.59, p. 1233-1241, 1996.

KALMOKOFF, M. L., AUSTIN, J. W., WAN, X. D., SANDERS, G., BANERJEE, S., FARBER, J. M. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 725-734, 2001.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1811-1829, 2002.

KUMAR, C. G. e ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.

LeMARC, Y., HUCHET, V., BOURGEOIS, C. M., GUYONNET, J. P., MAFART, P. Modeling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. **International Journal Food Microbiology**, v. 73, p. 219-237, 2002.

LERICHE, V., CHASSAING, D., CARPENTIER, B. Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-preoducing strain of *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 169-182, 1999.

LIN, C. M., TAKEUCHI, K., ZHANG, L., DOHM, C. B., MEYER, J. D., HALL, P. A., DOYLE, M. P. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 71-79, 2006.

LINDSAY, D. e Von HOLY, A. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiology**, v. 14, p. 383-390, 1997.

LUNDÉN, J. M., MIETTINEN, M. K., AUTIO, T. J., KORKEALA, H. J. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1204-1207, 2000.

LUNDÉN, J. M., AUTIO, T. J., KORKEALA, H. J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. **Journal of Food Protection**, v. 65, p.1129-1133, 2002.

LUNDÉN, J., AUTIO, T., SJOBERG, A. M., KORKEALA, H. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 2062-2069, 2003.

LUNGU, B., e JOHSON, M. G. Fate of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of model Turkey frankfurter pieces treated with zein coatings containing nisin, sodium diacetate, and sodium lactate at 4 degrees C. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 855-859, 2005.

MACIEL, V., *Listeria monocytogenes* em amostras cérvico-vaginais de pacientes, amostras de alimentos e refrigeradores domésticos na região de Ribeirão Preto, Brasil: ocorrência, caracterização de marcadores fenotípicos, virulência e determinação da resistência a antibióticos. Ribeirão Preto, SP: FCFRP, 2003, 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2003.

MAFU, A. A., ROY, D., GOULET, J. and HAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surface after short contact times. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 742-746, 1990.

MAKINO, S. I., KAWAMOTO, K., TAKESHI, K., OKADA, Y., YAMASAKI, M., YAMAMOTO, S., IGIMI, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 189-196, 2005.

MARSH, E. J., LUO, H., WANG, H. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 203-210, 2003.

MARTÍNEZ, B., BRAVO, D., RODRÍGUEZ, A. Consequences of the development of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* in fermented dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2383-2388, 2005.

MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., McCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 607-625, 1999.

MIETTINEN, M. K., BJORKROTH, K. J., KORKEALA, H. J. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 187-192, 1999.

MOLTZ, A. G. e MARTIN, S. E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 92-97, 2005.

MORISSET, D., BERJEAUD, J. M., MARION, D., LACOME, C., FRÈRE, J. Mutational analysis of mesentericin Y105, an anti-listeria bacteriocin, for determination of impact on bactericidal activity, *in vitro* secondary structure, and membrane interaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4672-4680, 2004.

MÜLLER, S., GRUBER, A. C., HOEFEL, H. H. K., BARROS, S. G. S. Manometria Esofágica: limpeza e desinfecção do equipamento com glutaraldeído. **Técnicas/ Techniques**, v. 38, p.276-280, 2001.

MYLONAKIS, E., PALIOU, M., HOHMANN, E., CALDERWOOD, S., WING, E. J. Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 22 cases. **Medicine (Baltimore)**, v. 81, p. 260-269, 2002.

NADON, C. A., WOODWARD, D. L., YOUNG, C., RODGERS, F. G., WIDMANN, M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2704-2707, 2001.

NICKEL, J. C. e COSTERTON, J. W. Bacterial biofilms and catheters: a key to understanding bacterial strategies in catheter-associated urinary tract infections. **The Canadian Journal of Infectious Diseases**, v. 3, p. 619-624, 1992.

NORTON, M. D., SCARLETT, J. M., HORTON, K., SUE, D., THIMOTHE, J., BOOR, K. J., WIEDMANN, M. Characterization and pathogenic potential of

Listeria monocytogenes isolates from the smoked fish industry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 646-653, 2001.

NORWOOD, D. E. e GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 576-582, 1999.

NOTERMANS, S., DORMANS, J. A. M. A., MEAD, G. C. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: a review. **Biofouling**, v. 5, p. 1-16, 1991.

NOTERMANS, S., DUFRENNE, J., TEUNIS, P., CHACKRABORTY, T. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 244-248, 1998.

OH, S. W., DANCER, G. I., KANG, D. H. Efficacy of aerosolized peroxyacetic acid as a sanitizer of lettuce leaves. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1743-1747, 2005.

PAGOTTO, F., DALEY, E. and FARBER, J. M. 2002. Enumeration of *Listeria monocytogenes* in food. In: Canada. Health products and food branch. Compendium of analytical methods, MFLP-74. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>. Acesso em 14 março 2003.

PERRIN, M., BEMER, M., DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 5308-5309, 2003.

RASCH, M. e KNOCH, S. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 275-278, 1998.

REID, G., TIESZER, C., FOERCH, R., BUSSCHER, H. J., KHOURY, A. H., BRUCE, A. W. Adsorption of ciprofloxacin to urinary catheters and effect on subsequent bacterial adhesion and survival. **Colloids and Surfaces Biointerfaces**, v. 1, p. 9-16, 1993.

ROBBINS, J. B., FISHER, C. W., MOLTZ, A. G., MARTIN, S. E. Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 494-498, 2005.

ROCOURT, J., JACQUET, C. H., REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p. 197-209, 2000.

RYSER, E. T. e MARTIN, E. H. *Listeria*, **Listeriosis and Food Safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc: 1999.

SAKATE, R. I., ARAGON, L. C., RAGHIANTE, F., LANDGRAF, M., FRANCO, B. D. G. M., DESTRO, M. T. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em

salames fatiados embalados a vácuo. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, p. 184-187, 2003.

SASAHARA, K. e ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 1022-1028, 1993.

SCHAIK, W . V. e ABEE, T. The role σ^B in the stress response of gram-positive bacteria – targets for food preservation and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 218-224, 2005.

SCHILLINGER, U., CHUNG, H.-S., KEPPLER, K., HOLZAPFEL, W.H. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 657-663, 1998.

SCHUCHAT, A., SWAMINATHAN, B., BROME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 169-183, 1991.

SCHWAB, U., YUEWEI, H. U., WIEDMANN, M., BOOR, K. J. Alternative sigma factor δ^B is not essential for *Listeria monocytogenes* surface attachment. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 311-317, 2005.

SERGELIDIS, D., ABRAHIM, A., SARIMVEI, A., PANOULIS, C., KARAIOANNOGLOU, PR., GENIGEORGIS, C. Temperature distribution and

prevalence of *Listeria* spp. In domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p. 171-177, 1997.

SIEGEL, S. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. International student edition. Kogakusha, Japan. MacGraw-Hill, 1959, 312 p.

SKOGBERG, K., SYRJANEN, J., JAHKOLA, M. Clinical presentation and outcome of listeriosis in patients with and without immunosuppressive therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, p. 815-821, 1992.

SOMERS, E. B. e WONG, A. C. L. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2218-2229, 2004.

SOUTHWICK, F. S. e PURICJ, D. Intracellular pathogenesis of listeriosis. **New England Journal of Medicine**, v. 12, p. 770-776, 1996.

STEPANOVIC, S., CIRKOVIC, I., RANIN, L., SVABIC-VIAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428-432, 2004.

STILES, M. E. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2718-2724, 1994.

SZABO, E. A., SIMONS, L., CONVENTRY, M. J., COLE, M. B. Assessment of control measures to achieve a food safety objective of less than 100 CFU of *Listeria monocytogenes* per gram at the point of consumption for fresh precut iceberg lettuce. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 256-264, 2003.

THOMAS, L. V., INGRAM, R. E., BEVIS, H. E., DAVIES, E. A., MILNE, C. F., DELVES-BROUGHTON, J. E. Effective use of nisin to control *Bacillus* and *Clostridium* spoilage for pasteurized mashed potato product. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1580-1585, 2002.

TODOROV, S. D. e DICKS, L. M. T. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p. 323-329, 2004.

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 709-725, 2002.

UYTTENDAELE, M., DE TROY, P., DEBEVERE, J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 75-80, 1999.

VITAS, A. I., AGUADO, V., GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p.349-356, 2004.

VOGEL, F. B., JORGENSEN, L. V., OJENIYI, B., HUSS, H. H., GRAM, L. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates found in cold-smoked Salmon from different smoke houses assessed by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.65, p. 83-92, 2001.

WAGNER, M. e ALLERBERGER, F. Characterization of *Listeria monocytogenes* recovered from 41 cases of sporadic listeriosis in Austria by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 3, p.227-234, 2003.

WALLACE, F. M., CALL, J. E., PORTO, A. C. S., COCOMA, G. J., LUCHANSKY, J. B. Recovery rate of *Listeria monocytogenes* from commercially prepared frankfurters during extended refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 584-591, 2003.

WIEDMANN, M., BRUCE, J. L., KEATING, C., JOHNSON, A. E., McDONOUGH, P. L., BATT, C. A. Ribotypes and virulence gene polymorphism suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in their pathogenic potential. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 2707-2716, 1997.

WIRTANEN, G., HUSMARK, U., MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 727-733, 1996.

WONG, A. C. L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2765-2770, 1998.

World Health Organization and Food and Agriculture Organization WHO and FAO. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. MRA series No. 4-5. Publishing Management Service, Rome, Italy, 2004.

ZINK, D. L. The impact of consumer demands and trends on food processing. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p. 467-469, 1997.

ZOTTOLA, E. A. Characterization of the attachment matrix of *Pseudomonas fragi* attached to non-porous surfaces. **Biofouling**, v.5, p. 37-55, 1991.

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry. **Food Technology**, v. 48, p. 107-114, 1994.

http://www.fsis.usda.gov/oa/topics/lm_action.htm. Acesso em 14 de março 2003.

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5514a2.htm>. Acesso em 11 de maio de 2005.

<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html>. Acesso em 11 de maio de 2005.

ANEXOS

Anexo 1: Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), segundo Graves e Swaminathan (2001)

Inocular a cepa de *L. monocytogenes* em superfícies de ágar BHI e incubar por 24 h a 37° C. Transferir uma porção do crescimento para 3 mL de tampão TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Pharmacia), pH 8,0]. Medir a absorbância desta suspensão a 610nm (Ultrospec 2000 - Pharmacia) e ajustar a densidade ótica para 1,25-1,35. Transferir uma alíquota de 240 µl desta suspensão para tubo de Eppendorf (Axygen) contendo 60µl de solução de lisozima 10 mg/mL (Pharmacia) e incubar os tubos em banho-maria a 37°C por 10 minutos.

Para preparar os blocos de agarose, adicionar ao tubo contendo a suspensão de células, 300µl da solução de SSP [1,2% SeaKem Gold Agarose (FMC Bioproducts), 1% Dodecil Sulfato de Sódio (Sigma), 0,2 mg/mL proteinase K (Pharmacia)]. Homogeneizar a suspensão e distribuir volumes da mesma, em moldes (BioRad) para formação dos blocos de agarose.

Transferir os blocos de agarose solidificados para tubos cônicos tipo Falcon contendo 50 mL e 4 mL de solução de lise [50mM Tris-HCl, 50mM EDTA pH 8,0, 1% Sarcosina (Sigma) e 0,15mg/mL de proteinase k]. Incubar os tubos sob agitação a 175 rpm por 2 horas a 54°C.

Submeter os blocos de agarose a duas lavagens consecutivas por 10 minutos cada com água estéril aquecida a 50°C e quatro lavagens de 15 minutos cada com tampão TE estéril aquecido a 50°C. Cortar os blocos de agarose em “fatias” (aproximadamente 1/3 do tamanho original) e submeter à digestão com uma das enzimas de restrição. Para a enzima Apal (Pharmacia)

utilizar a concentração de 160 U/fatia e para Ascl (New England Biolabs) 25 U/fatia. Incubar os tubos a 37°C por 18-20 horas, para ambas as enzimas.

Separar os produtos obtidos a partir da digestão com as enzimas de restrições por eletroforese em gel de agarose [Agarose Seakem Gold 1% em tampão TBE (0,9M Tris base, 0,9M ácido bórico, 0,02M EDTA)] empregando-se o aparelho CHEF-DR III (BioRad) com os seguintes parâmetros: t= 20 h, v= 200, ângulo= 120°, gradiente= 6v/cm, temperatura do tampão= 14°C. Corar o gel com solução de brometo de etídio 5mg/mL (Pharmacia) e examinar sob luz ultra-violeta.

Registrar a imagem com auxílio do Photo Documentation System (Vilber Lourmat). Utilizar uma cepa padrão (*Listeria monocytogenes* H2446) como controle. Utilizar como marcador de peso molecular a Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs).

Anexo 2: Dados utilizados para preparar os gráficos das figuras 13 A a 24.

Valores estimados estão indicados por “est” e o limite de detecção do método foi de 2,3 log de UFC/cm². Quando não houve crescimento de nenhuma colônia nas placas, o resultado foi < 0,82 log de UFC/ cm².

Culturas puras de *L. monocytogenes*

- Sistema estático

Figura 13 A: *L. monocytogenes* VA1

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	4,0	2,6	3,9	3,5	0,781025
24 h	5,3	5,6	5,4	5,4	0,152753
48 h	5,3	5,3	5,2	5,2	0,057735
72 h	4,8	4,9	4,7	4,8	0,1
96 h	4,4	4,3	4,2	4,3	0,1

Figura 13 B: *L. monocytogenes* VA2

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	4,2	3,9	4,0	4,03	0,152753
24 h	5,3	5,7	5,5	5,5	0,2
48 h	5,5	5,2	5,1	5,2	0,208167
72 h	5,1	5,1	5,0	5,0	0,057735
96 h	5,0	4,9	4,8	4,9	0,1

Figura 14 A: *L. monocytogenes* 23

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	4,4	4,2	4,0	4,2	0,2
24 h	6,6	6,4	6,7	6,6	0,152753
48 h	6,0	6,1	6,0	6,0	0,057735
72 h	5,7	5,6	5,4	5,5	0,152753
96 h	5,6	5,3	5,2	5,3	0,208167

Figura 14 B: *L. monocytogenes* 26 A

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	5,6	5,0	4,9	5,1	0,378594
24 h	7,2	6,9	7,3	7,1	0,208167
48 h	6,5	6,4	6,0	6,3	0,264575
72 h	6,1	6,0	5,9	6,0	0,1
96 h	5,8	5,7	6,0	5,8	0,152753

Figura 14 C: *L. monocytogenes* 26 C

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	5,6	5,4	5,8	5,6	0,2
24 h	6,8	6,9	7,1	7,0	0,152753
48 h	6,5	6,0	6,4	6,3	0,264575
72 h	5,8	5,5	5,7	5,6	0,152753
96 h	5,5	5,3	5,0	5,2	0,251661

Figura 15: *L. monocytogenes* ATCC 19115

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	5,1	5,7	5,4	5,4	0,3
24 h	6,5	6,7	6,6	6,6	0,1
48 h	5,7	6,0	5,8	5,8	0,152753
72 h	5,1	5,3	5,5	5,3	0,2
96 h	4,9	5,0	4,8	4,9	0,1

- Sistema com agitação

Figura 16 A: *L. monocytogenes* 23

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	5,0	4,1	4,8	4,6	0,472582
24 h	5,7	4,5	5,5	5,2	0,64291
48 h	5,5	4,6	5,1	5,0	0,450925
72 h	5,1	4,5	5,0	4,8	0,321455
96 h	4,8	4,0	4,7	4,5	0,43589

Figura 16 B: *L. monocytogenes* 26 A

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	4,0	3,1	4,8	4,0	0,85049
24 h	5,5	5,6	5,5	5,5	0,057735
48 h	6,0	6,1	5,3	5,8	0,43589
72 h	5,1	5,8	4,7	5,2	0,556776
96 h	4,9	4,5	4,4	4,6	0,264575

Figura 16 C: *L. monocytogenes* 26 C

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	3,9	3,0	4,0	3,63	0,550757
24 h	5,1	5,7	5,5	5,43	0,305505
48 h	5,5	5,4	5,1	5,33	0,208167
72 h	4,9	5,0	4,8	4,9	0,1
96 h	4,6	4,9	4,4	4,63	0,251661

Culturas puras de *L. mesenteroides*

Figura 17: *L. mesenteroides* Bac+ e *L. mesenteroides* Bac-

- *L. mesenteroides* Bac+

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-
24 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-
48 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-

- *L. mesenteroides* Bac-

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	est. 2,0	2,8	2,4	2,4	0,4
24 h	4,8	5,7	5,5	5,3	0,472582
48 h	5,8	6,2	5,7	5,9	0,264575

Co-Cultura: *L. monocytogenes* e *L. mesenteroides*

Figura 18: *L. monocytogenes* ATCC 19115 e *L. mesenteroides* Bac+

- *L. monocytogenes* ATCC 19115

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	3,1	est. 1,7	est. 1,6	est. 2,13	0,83865
24 h	5,9	6,3	6,3	6,1	0,23094
48 h	6,1	7,3	7,3	6,9	0,69282

- *L. mesenteroides* Bac+

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-
24 h	2,7	2,6	3,0	2,76	0,208167
48 h	4,0	4,6	4,4	4,3	0,305505

Figura 19: *L. monocytogenes* ATCC 19115 e *L. mesenteroides* Bac-

- *L. monocytogenes* ATCC 19115

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	4,5	4,5	4,6	4,5	0,057735
24 h	5,7	5,3	5,5	5,5	0,2
48 h	5,6	6,1	5,7	5,8	0,264575

- *L. mesenteroides* Bac-

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	2,6	2,8	3,0	2,8	0,2
24 h	5,3	4,3	4,8	4,8	0,5
48 h	5,6	5,9	5,9	5,8	0,173205

Figura 20 A: *L. monocytogenes* 23 e *L. mesenteroides* Bac+

- *L. monocytogenes* 23

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-
24 h	4,9	4,8	5,5	5,0	0,378594
48 h	5,6	5,3	5,6	5,5	0,173205

- *L. mesenteroides* Bac+

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-
24 h	4,9	4,8	4,1	4,6	0,43589
48 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-

Figura 20 B: *L. monocytogenes* 23 e *L. mesenteroides* Bac-

- *L. monocytogenes* 23

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	3,8	3,8	3,9	3,83	0,057735
24 h	4,6	4,7	5,0	4,76	0,208167
48 h	4,7	4,8	5,3	4,93	0,321455

- *L. mesenteroides* Bac-

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	2,6	est. 2,0	2,8	2,46	0,416333
24 h	2,9	4,1	3,9	3,63	0,64291
48 h	4,6	3,8	4,7	4,36	0,493288

Figura 21 A: *L. monocytogenes* 26 A e *L. mesenteroides* Bac+

- *L. monocytogenes* 26 A

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	2,8	est. 2,2	2,5	2,5	0,3
24 h	4,9	4,3	5,1	4,76	0,416333
48 h	5,6	5,0	6,0	5,53	0,503322

- *L. mesenteroides* Bac+

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-
24 h	3,7	3,9	4,2	3,93	0,251661
48 h	5,3	5,2	5,0	5,16	0,152753

Figura 21 B: *L. monocytogenes* 26 A e *L. mesenteroides* Bac-

- *L. monocytogenes* 26 A

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	4,3	3,8	3,4	3,83	0,450925
24 h	4,3	4,6	4,0	4,3	0,3
48 h	5,1	4,6	4,3	4,66	0,404145

- *L. mesenteroides* Bac-

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	3,2	2,5	3,2	2,96	0,404145
24 h	3,7	4,8	3,6	4,0	0,665833
48 h	5,6	5,2	4,3	5,0	0,665833

Figura 22 A: *L. monocytogenes* 26 C e *L. mesenteroides* Bac+

- *L. monocytogenes* 26 C

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-
24 h	4,3	4,8	5,3	4,8	0,5
48 h	6,0	5,6	6,0	5,86	0,23094

- *L. mesenteroides* Bac+

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-
24 h	4,4	4,6	4,8	4,6	0,2
48 h	5,5	5,6	5,1	5,4	0,264575

Figura 22 B: *L. monocytogenes* 26 C e *L. mesenteroides* Bac-

- *L. monocytogenes* 26 C

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	4,3	3,8	3,6	3,9	0,360555
24 h	4,2	4,4	4,4	4,3	0,11547
48 h	4,5	4,3	4,1	4,3	0,2

- *L. mesenteroides* Bac-

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	3,2	2,8	3,1	3,0	0,208167
24 h	4,8	4,2	4,7	4,5	0,321455
48 h	4,1	3,8	4,1	4,0	0,173205

Figura 23 A: *L. monocytogenes* ATCC 19115 e *L. mesenteroides* Bac+ (BHI modificado acrescido de 2% de sacarose)

- *L. monocytogenes* ATCC

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	est. 1,3	< 0,82	est. 1,6	est. 1,3	0,3
24 h	6,3	6,5	6,0	6,26	0,251661
48 h	6,7	6,9	6,4	6,66	0,251661

- *L. mesenteroides* Bac+

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	< 0,82	< 0,82	< 0,82	-	-
24 h	2,5	2,6	2,3	2,46	0,152753
48 h	2,6	3,0	2,5	2,7	0,264575

Figura 23 B: *L. monocytogenes* ATCC 19115 e *L. mesenteroides* Bac- (BHI modificado acrescido de 2% de sacarose)

- *L. monocytogenes* ATCC

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	4,4	4,5	4,5	4,4	0,057735
24 h	5,7	4,7	5,7	5,3	0,57735
48 h	5,9	5,0	5,9	5,6	0,519615

- *L. mesenteroides* Bac-

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	2,3	2,4	2,4	2,3	0,057735
24 h	4,0	4,8	4,8	4,5	0,46188
48 h	5,6	5,2	5,5	5,4	0,208167

Figura 24: Filtrado Bacteriocina

- *L. monocytogenes* ATCC (Filtrado Bac+)

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	2,6	3,8	est. 1,9	2,7	0,960902
24 h	3,8	4,9	2,8	3,8	1,050397
48 h	6,0	5,7	6,4	6,0	0,351188

- *L. monocytogenes* ATCC (Filtrado Bac-)

Tempo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
3 h	3,6	4,6	4,1	4,1	0,5
24 h	5,6	5,6	5,6	5,6	0
48 h	4,6	5,5	5,5	5,2	0,519615