UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da temperatura, de enzimas degradantes de DNA e do
sobrenadante de cultura de estafilococos na formação de biofilme
por *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica**

Eliane Pereira da Silva

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência da temperatura, de enzimas degradantes de DNA e do sobrenadante de cultura de estafilococos na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Eliane Pereira da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Eliane Pereira

Influência da temperatura, de enzimas degradantes de DNA e do sobrenadante de cultura de estafilococos na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica.
Ribeirão Preto, 2012. 110p. : il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: De Martinis, Elaine Cristina Pereira

1. Biofilme 2. *Listeria monocytogenes*
3. DNA extracelular 4. DNAses

*A ilustração da capa é de minha autoria. Consiste em fotografia de biofilme de *Listeria monocytogenes* observado por microscopia confocal a laser, em superfície de borosilicato.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Eliane Pereira da Silva

Título do trabalho: Influência da temperatura, de enzimas degradantes de DNA e do sobrenadante de cultura de estafilococos na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder a inteligência e a sabedoria para o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, irmã, familiares e amigos que rezaram por mim e me apoiaram nessa etapa de minha vida.

Aos amigos de laboratório Lizziane, Fernanda, Fabrício, Juliana, Lilian, Carine, Paula, e as técnicas Vanessa e Aline por todo auxílio, apoio e partilha. Agradeço também à Maria Aparecida, Therezinha e Solange pelo carinho e agradável convivência.

À Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis pela orientação, confiança, incentivo, conhecimentos científicos e oportunidades concedidas.

À Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes, à técnica Regislaine Valéria Burim e ao Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP pela colaboração com o microscópio de fluorescência.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da FMRP-USP (Proc. 2004/08868-0), em especial às técnicas Elizabete, Tatiana e Roberta pelo auxílio e instrução quanto ao uso do microscópio confocal a laser.

A todos os funcionários do serviço de Pós-graduação da FCFRP-USP pelo trabalho e disposição em ajudar, e aos professores do programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia pelos conselhos e ensinamentos passados durante o curso.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP pela disponibilização de suas instalações para a realização desse trabalho.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos no início do curso, e à Fundação de Amparo à

Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão de bolsa de estudos (Proc. 2010/12236-0) e auxílio regular à pesquisa (Proc. 2011/07062-6).

“Adiante, sempre adiante. Deus proverá”.
(Beata Carmen Sallés)

RESUMO

SILVA, E. P. **Influência da temperatura, de enzimas degradantes de DNA e do sobrenadante de cultura de estafilococos na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica.** 2012. 110f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A listeriose é uma infecção rara e grave, transmitida principalmente por alimentos. É causada pela bactéria *Listeria monocytogenes* e acomete principalmente mulheres grávidas e pessoas comprometidas imunologicamente. Este patógeno é reconhecido como um problema para as indústrias de alimentos devido à sua capacidade em formar biofilmes. Os biofilmes são comunidades microbianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares produzidos pelas próprias células. Estas estruturas são resistentes a procedimentos de higienização e desinfecção, contribuindo para a persistência de *L. monocytogenes* em ambientes processadores de alimentos. Desta forma, há grande interesse em estratégias para prevenir a formação de biofilmes por *L. monocytogenes*. No presente trabalho foi investigada a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em superfície abiótica, sob diferentes temperaturas, na presença de enzimas degradantes de DNA (DNAses) e na presença de sobrenadante de cultura de estafilococos com e sem atividade de DNase termoestável (termonuclease). Foram utilizadas técnicas de cultivo e de microscopia e os resultados demonstraram que *L. monocytogenes* aderiu à superfície de aço inoxidável, em média 10^5 - 10^6 UFC/cm². A temperatura de incubação influenciou na adesão de *L. monocytogenes* à superfície de aço inoxidável, mas outros fatores em conjunto, como a cepa bacteriana e o tipo de sistema de cultivo utilizado, também podem ter contribuído para os resultados observados. Por microscopia de fluorescência foi constatada a formação de biofilmes maduros por *L. monocytogenes*, contendo canais provavelmente envolvidos em fluxo de nutrientes e também, cavidades características de dispersão celular. A mesma técnica permitiu constatar um predomínio de células metabolicamente ativas envoltas por matriz extracelular polimérica contendo DNA extracelular (DNAe), coradas por laranja de acridina. Por microscopia confocal a laser, foram observadas microcolônias contendo DNAe e foram visualizadas também camadas homogêneas pouco espessas de células viáveis, coradas por SYTO9 e DDAO. O DNAe foi observado ainda em locais sem células, característicos de dispersão celular. O sobrenadante de cultura de *S. aureus* com atividade de termonuclease inibiu *L. monocytogenes* livre no meio de cultura e interferiu na formação de biofilme por este patógeno por até 24h a 37°C. As DNases comerciais não interferiram na formação de biofilme por *L. monocytogenes*, indicando ser improvável a ação da termonuclease de *S. aureus* na inibição da forma planctônica ou sésil de *L. monocytogenes*. Foi constatada a produção de uma proteína termoestável por *S. aureus*, capaz de inibir *L. monocytogenes* em teste de antagonismo em ágar, mas estudos posteriores são necessários para a completa caracterização de tal substância inibitória.

Palavras-chave: biofilme, *Listeria monocytogenes*, DNA extracelular, DNAses.

ABSTRACT

SILVA, E. P. **Influence of temperature, DNA degrading enzymes and staphylococcal culture supernatant on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on abiotic surface**. 2012. 110f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Listeriosis is a rare and serious mainly food-borne infection. It is caused by the bacterium *Listeria monocytogenes* that primarily affects pregnant women and immunologically compromised individuals. This pathogen is recognized as a problem for the food industry due to its ability to form biofilms. Biofilms are microbial communities adhered to biotic or abiotic surfaces embebed by self produced extracellular polymers. These structures are resistant to cleaning and disinfection procedures, allowing the survival and persistence of *L. monocytogenes* in food processing environments. Thus, several strategies have been adopted to prevent and control the formation of biofilms on food contact surfaces. The present study investigated biofilm formation by *L. monocytogenes* on abiotic surface at different temperatures, in the presence of DNA degrading enzymes (DNAses) and in the presence of culture supernatant with and without staphylococcal thermonuclease activity. For this purpose, we used culture techniques and microscopy. The results showed that *L. monocytogenes* was able to adhere on stainless steel surface on average 10^5 - 10^6 CFU per cm^2 . The different incubation temperatures affected the adhesion of *L. monocytogenes* on stainless steel surface, although other factors in combination were also involved, such as the bacterial strain and the type of system used for assay. By fluorescence microscopy, we noticed the formation of mature biofilms by *L. monocytogenes*, with channels likely involved in flow of nutrients and holes typical of cell dispersion. Furthermore, we found a predominance of metabolically active cells surrounded by extracellular matrix polymer containing extracellular DNA (eDNA) stained with acridin orange. By laser confocal microscopy, we observed the formation of microcolonies containing eDNA and homogeneous thin layer of viable cells stained with SYTO 9 and DDAO. The eDNA was also observed in locations with absence of cells characteristics of cell dispersion. The culture supernatant of *S. aureus* with thermonuclease activity was able to inhibit *L. monocytogenes* free on culture medium and interfered with the formation of biofilm by the pathogen for up to 24h at 37°C. The commercial DNAses did not affect biofilm formation by *L. monocytogenes*, possibly excluding the action of thermonuclease of *S. aureus* on the inhibition of planktonic or sessile forms of *L. monocytogenes*. It has been found a production of a thermostable protein by *S. aureus* and it was able to inhibit *L. monocytogenes* in agar antagonism assays but further studies are needed to characterize such inhibitory substance.

Keywords: biofilm, *Listeria monocytogenes*, DNA extracellular, DNAses.

RESUMEN

SILVA, E. P. **Influencia de la temperatura, de las enzimas degradantes de DNA y de sobrenadante del cultivo de estafilococos en la formación de biopelícula por *Listeria monocytogenes* en superficie abiótica**. 2012. 110f. Disertación (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

La listeriosis es una infección poco frecuente, grave y transmitida principalmente por los alimentos. Es causada por la bacteria *Listeria monocytogenes*, afecta principalmente a las mujeres embarazadas y personas con problemas de inmunidad. Este patógeno es reconocido como un problema para la industria de los alimentos debido a su capacidad para formar biopelículas. Biopelículas son comunidades microbianas adheridas en superficie biótica o abiótica embebidas en una matriz polimérica extracelular. Estas estructuras son resistentes a los procedimientos de limpieza y desinfección, permitiendo la supervivencia y la persistencia de *L. monocytogenes* en los entornos de procesamiento de alimentos. Varias estrategias se han adoptado para prevenir y controlar la formación de biopelículas por *L. monocytogenes* en las superficies de contacto con los alimentos. En este estudio se investigó la formación de biopelículas por *L. monocytogenes* en superficie abiótica a diferentes temperaturas, en la presencia de enzimas degradantes de DNA (DNAses) y en presencia de sobrenadante del cultivo de estafilococos con y sin actividad de termonucleasa. Por lo tanto, hemos utilizado las técnicas de cultivo y microscopía. Los resultados demostraron que *L. monocytogenes* fue capaz de adherirse a la superficie de acero inoxidable, en promedio 10^5 - 10^6 UFC por cm^2 . Las temperaturas de incubación diferentes afectaron la adherencia de *L. monocytogenes* en la superficie de acero inoxidable, aunque otros factores juntos, como la cepa bacteriana y el tipo de sistema utilizado, también puede haber contribuido a los resultados observados. Para microscopía de fluorescencia, se observó la formación de biopelículas maduras de *L. monocytogenes* que contienen canales para el flujo de nutrientes y las cavidades características de la dispersión. La misma técnica reveló un predominio de las células metabólicamente activas rodeadas por polímero de matriz extracelular que contiene el DNA extracelular (DNAe), que se ha tiño con naranja de acridina. Para la microscopía láser confocal, se observó la formación de micro colonias que contienen el DNAe y capas poco espesor de células viables, que se ha tiño con SYTO9 y DDAO. El DNAe también se observó en sitios con ausencia celular, característica de dispersado celular. El sobrenadante del cultivo de *S. aureus* con actividad de termonucleasa fue capaz de inhibir *L. monocytogenes* libre en medio de cultivo y interferir con la formación de biopelícula por ese patógeno durante 24h a 37°C. Las DNAses comerciales no afectaron la formación de biopelícula por *L. monocytogenes*, que indicó una acción improbable de termonucleasa en la inhibición de la forma sésil o planctónico de *L. monocytogenes*. Se ha encontrado que *S. aureus* produce una proteína termoestable, capaz de inhibir *L. monocytogenes* en antagonismo de ensayo en ágar. Sin embargo, se necesitan más estudios para caracterizar tales sustancias inhibitoras.

Palabras chave: biofilm, *Listeria monocytogenes*, DNA extracelular, DNAses.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas de formação do biofilme: (1) adesão inicial à superfície; (2) multiplicação e produção de matriz extracelular polimérica; (3) início da formação de estrutura complexa; (4) estrutura madura; (5) dispersão celular (modificado de LASA, 2006) 5
- Figura 2.** Representação esquemática do sistema em frasco cilíndrico com suporte de aço inoxidável para lâminas, montado para estudo de biofilme..... 18
- Figura 3.** Representação esquemática das etapas para quantificação da população de *L. monocytogenes* aderida à superfície de aço inoxidável, cultivada em frasco cilíndrico contendo caldo BHI e suporte de aço inoxidável para lâminas 19
- Figura 4.** Representação esquemática das etapas para quantificação da população de *L. monocytogenes* aderida à superfície de aço inoxidável em sistema sob agitação em microplaca 20
- Figura 5.** Representação esquemática de câmara plástica montada sobre lamínula de borosilicato adquirida para observação com CLSM (<<http://www.bioexpress.com/divinity-cart/item/312100/NALGE-NU-NC-Lab-Tek-II-Chambered-Coverglass/1.html>>) 25
- Figura 6.** Representação esquemática de imagem tridimensional adquirida por CLSM de um biofilme. Os eixos x e y determinam a área de visualização, enquanto o eixo z representa a profundidade. A multiplicação da área pela profundidade permite a análise de fatias (*z-stack*) do biofilme, bem como do volume total por ele ocupado (modificado de ARNOLD; GROBMANN; BAUMANN, 2010)..... 26

Figura 7.	Representação esquemática do teste de antagonismo direto em ágar para avaliação da atividade inibitória de <i>S. aureus</i> sobre <i>L. monocytogenes</i>	27
Figura 8.	Representação esquemática do teste para verificação da presença de bacteriófagos líticos	28
Figura 9.	Representação esquemática da técnica utilizada para avaliação do efeito da enzima proteolítica sobre a atividade inibitória de <i>S. aureus</i>	29
Figura 10.	Representação esquemática do ensaio para quantificação da atividade inibitória de <i>S. aureus</i> frente a <i>L. monocytogenes</i> pelo método de diluição crítica	30
Figura 11.	Populações de <i>L. monocytogenes</i> IAL 633 (sorotipo 1/2a) e <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 (sorotipo 4b) aderidas às lâminas de aço inoxidável a 25°C e 37°C durante 72h de incubação (log UFC/cm ²), quando na presença de caldo BHI. Lm= <i>L. monocytogenes</i>	32
Figura 12.	Fotografias de <i>L. monocytogenes</i> aderida à lâmina de aço inoxidável corada com laranja de acridina após cultivo em caldo BHI a 37°C/72h. As setas indicam células alongadas e as barras indicam 10µm. Aumento de 40X, filtro de 450-490nm	33
Figura 13.	Representação esquemática de ágar DNA – azul de toluidina após 24h de incubação em câmara úmida, ilustrando os orifícios correspondentes às diluições de 1/2 a 1/128 e halo cor de rosa brilhante ≥ 1mm até 1:64, que correspondia a 6.400 UA/mL	34

- Figura 14.** Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) cultivadas a 37°C/72h: (A) aderidas às lâminas de aço inoxidável; (B) livres no caldo de cultura. Lm= *L. monocytogenes*; Se= *S. epidermidis*; Sa= *S. aureus*..... 35
- Figura 15.** Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) cultivadas em caldo BHI: (A) aderidas às lâminas de aço inoxidável; (B) livres no caldo de cultura, a 25°C e 37°C durante 72h de incubação. Lm= *L. monocytogenes*..... 36
- Figura 16.** Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) cultivadas em caldo BHI: (A) aderidas às lâminas de aço inoxidável; (B) livres no caldo de cultura, a 25°C e 37°C durante 72h de incubação. Lm= *L. monocytogenes*..... 37
- Figura 17.** Fotografia de biofilme de *L. monocytogenes* IAL 633 após 24h a 37°C (A) e a 25°C (B) sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina. A marcação em verde representa o DNAe da matriz formada por uma rede extracelular polimérica e a marcação laranja representa as células metabolicamente ativas (ricas em RNA) isoladas ou formando pequenos grupamentos celulares. A barra indica 10µm. Aumento de 40X, filtro de 510-560nm..... 38
- Figura 18.** Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C. As barras indicam 10µm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm..... 39

- Figura 19.** Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 25°C. As barras indicam 10µm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm 40
- Figura 20.** Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) aderidas às lâminas de aço inoxidável em log UFC/cm² (A), e presente no efluente em log UFC/mL (B) a 37°C durante 72h de incubação, quando na presença de caldo BHI; caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* ou *S. epidermidis*. Lm= *L. monocytogenes*; Se= *S. epidermidis*; Sa= *S. aureus* 41
- Figura 21.** Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C, quando na presença de sobrenadante de cultura de *S. aureus*. As barras indicam 10µm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm 42
- Figura 22.** Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C, quando na presença de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis*. As barras indicam 10µm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm 43
- Figura 23.** Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) cultivadas a 37°C/72h: (A) aderidas às lâminas de aço inoxidável; (B) livres no caldo de cultura. Lm= *L. monocytogenes*; NUC= nuclease micrococcal de *S. aureus* 44

- Figura 24.** Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C, quando na presença de caldo BHI acrescido de nuclease micrococcal de *S. aureus*. As barras indicam 10µm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm..... 45
- Figura 25.** Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C, quando na presença de caldo BHI acrescido de DNase I bovina. As barras indicam 10µm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm 46
- Figura 26.** Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 observados sob CLSM, em superfície de borosilicato após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C, quando na presença de caldo BHI ou caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus*. As células viáveis foram coradas em verde pelo SYTO 9; as não viáveis e o DNAe da EPS em vermelho pelo DDAO. A sobreposição dos corantes permite a visualização do DNAe circundando as células viáveis (amarelo). As linhas em vermelho indicam o corte da imagem nos eixos x e y, possibilitando à visualização ortogonal correspondente à profundidade (z). (A) z = 5,79µm; (B) z = 2,9µm; (C) z = 4,28µm; (D) z = 1,93µm; (E) z = 2,9µm e (F) z = 3,02µm. As barras indicam 20µm. Aumento de 63X com óleo de imersão..... 48
- Figura 27.** Biomassa (UF/µm³) de biofilme de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a), quando na presença de caldo BHI ou caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* após 72h/37°C. Lm = *L. monocytogenes*; SA = sobrenadante de cultura de *S. aureus*..... 49

Figura 28. Fotografias do teste de antagonismo direto. (A) Halo límpido de inibição em volta da colônia de *S. aureus*, quando utilizada *L. monocytogenes* ATCC 19115 como indicador; (B) halo opaco de inibição em volta da colônia de *S. aureus*, quando utilizada *L. monocytogenes* IAL 633 como indicador; e (C) Avaliação da natureza proteica, mostrando degradação do halo de inibição pelas enzimas protease de *Streptomyces griseus* e α -quimiotripsina 50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultados de quantificação de biomassa ($\text{UF}/\mu\text{m}^3 \times 10^{-3}$) de biofilme de *L. monocytogenes*, obtidos a partir de CLSM. Sistema estático, com caldo BHI, 72h/37°C 47
- Tabela 2.** Resultados da quantificação da biomassa ($\text{UF}/\mu\text{m}^3 \times 10^{-3}$) de biofilme de *L. monocytogenes* formado em sistema estático, quando na presença de caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* após 72h/37°C 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI-2	Autoindutor-2
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Caldo Infusão Cérebro Coração, do inglês <i>“Brain Heart Infusion”</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças – EUA, do inglês <i>“Centers for Disease Control and Prevention”</i>
CLSM	Microscopia cofocal a laser, do inglês <i>“Confocal Laser Scanning Microscopy”</i>
CPS	Peptídeos extracelulares, do inglês <i>“Competence-stimulating peptides”</i>
DDAO	7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAe	DNA extracelular
DNases	Enzimas degradantes de DNA
EPS	Matriz extracelular polimérica, do inglês <i>“Extracellular Polymeric Substance”</i>
EUA	Estados Unidos da América
IAL	Instituto Adolfo Lutz
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	Solução Salina Fosfatada Tamponada, do inglês <i>“Phosphate Buffered Saline”</i>
PIA	Polissacarídeo Intercelular Adesina
PNAG	Poli-N-acetilglicosamina
RNA	Ácido ribonucleico
TSA-ye	Triptose de soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura
TSB	Caldo Trypticase de Soja, do inglês <i>“Tryptone Soya Broth”</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>“World Health Organization”</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
UFC/cm ²	Unidades formadoras de colônia por centímetro quadrado
% v/v	Porcentagem volume por volume
mL	Mililitro
Cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
h	Horas
®	Marca registrada
%	Porcentagem
log UFC/cm ²	Logarítimo de unidades formadoras de colônia por centímetro quadrado
log UFC/mL	Logarítimo de unidades formadoras de colônia por mililitro
rpm	Rotações por minuto
kHz	Kilo-hertz
xg	Força centrífuga
µm	Micrômetro
UA/mL	Unidades arbitrárias por mililitro
U/mL	Unidades por mililitro
g	Gramma
mm	Milímetro
µL	Micro litro
µg/mL	Micrograma por mililitro
nm	Nanômetro
mM	Milimolar
µM	Micromolar

Ar-Kr	Argônio-Criptônio
He-Ne	Hélio-Neônio
UF/ μm^3	Unidade de fluorescência por micrômetro cúbico
% (p/v)	Porcentagem peso por volume
kDa	Quilodalton

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Resumen	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
Lista de Símbolos.....	xii
1. Introdução	1
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> e listeriose	3
1.2 Biofilmes e o DNA extracelular	4
1.3 Formação de biofilme por <i>L. monocytogenes</i>	7
1.4 Técnicas para estudo de biofilmes	9
1.5 Prevenção e controle da formação de biofilmes.....	10
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. Materiais e Métodos	16
3.1 Manutenção das linhagens bacterianas	17
3.2 Estudos de formação de biofilmes por <i>L. monocytogenes</i>	17
3.2.1 Tratamento dos materiais de aço inoxidável	17
3.2.2 Sistema com agitação em frasco cilíndrico	17
3.2.3 Sistema com agitação em microplaca	19
3.2.4 Preparo do sobrenadante de cultura de estafilococos	21
3.2.4.1 Estudo de formação de biofilme por <i>L. monocytogenes</i> na presença de sobrenadante de cultura de estafilococos	21
3.2.4.2 Quantificação da atividade de termonuclease pelo ensaio de diluição crítica.....	21
3.2.5 Estudo de formação de biofilme por <i>L. monocytogenes</i> na presença de DNAses comerciais	22
3.2.6 Análise estatística	23

3.2.7 Estudos de microscopia de fluorescência	23
3.2.7.1 Lâminas retangulares de aço inoxidável	23
3.2.7.2 Lâminas circulares de aço inoxidável	24
3.2.8 Estudos de microscopia confocal a laser	25
3.3 Avaliação da atividade inibitória de <i>S. aureus</i> sobre <i>L. monocytogenes</i> em ágar	27
3.3.1 Avaliação da presença de bacteriófagos líticos.....	27
3.3.2 Avaliação da natureza proteica	28
 4. Resultados	31
4.1 Avaliação da formação de biofilme por meio de técnicas de cultivo e microscopia de fluorescência	32
4.1.1 Sistema com agitação em frasco cilíndrico	32
4.1.2 Sistema com agitação em microplaca	36
4.2 Avaliação da formação de biofilme por microscopia confocal a laser	46
4.3 Avaliação da atividade inibitória de <i>S. aureus</i> frente a <i>L. monocytogenes</i> em ágar	49
 5. Discussão.....	51
 6. Conclusões	61
 7. Referências	63

Apêndices

As bactérias apresentam uma grande capacidade de adaptação e sobrevivência em diversos ambientes devido à habilidade de formar agregados celulares em superfícies bióticas ou abióticas através da produção de polímeros extracelulares, sendo assim denominados biofilmes (COSTERTON et al., 1995).

Estas comunidades microbianas têm sido amplamente estudadas, principalmente quanto à formação, composição e interação com outros organismos e com o meio ambiente, de acordo com o nicho em que se estabelecem (MOONS; MICHIELS; AERTSEN, 2009; ANDREWS et al., 2010).

Os biofilmes podem ser benéficos como componentes normais da microbiota de plantas, animais e humanos servindo como comensais e auxiliando em processos metabólicos e na defesa contra micro-organismos patogênicos (HARRISON et al., 2005; BOLLINGER et al., 2007). Na indústria, biofilmes microbianos têm contribuído para processos de biorremediação, de tratamento de efluentes e para produção de biocombustíveis, aditivos químicos, biológicos e alimentícios (WOOD; HONG; MA, 2011).

No entanto, biofilmes podem também ser formados por micro-organismos patogênicos, o que representa um problema para a saúde pública. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Candida albicans* são exemplos típicos de micro-organismos formadores de biofilme, que ocasionam doenças infecciosas nosocomiais relacionadas ou não com o uso de dispositivos médicos, como catéteres, lentes de contato, válvulas cardíacas e implantes ortopédicos (DONLAN; COSTERTON, 2002; FUX et al., 2005).

Em ambientes de processamento de alimentos, a formação de biofilmes em superfícies inertes por *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Cronobacter sakazakii*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* e *S. aureus*, também é preocupante, pois representa uma fonte potencial de contaminação e deterioração de produtos processados (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; BROOKS; FLINT, 2008; SHI; ZHU, 2009).

Portanto, é importante compreender os processos de formação e dispersão de biofilmes microbianos, visando ao desenvolvimento de estratégias para o seu controle.

Neste trabalho foi avaliada a formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica sob diferentes condições de incubação, bem como na

presença de sobrenadante de cultura de estafilococos e de enzimas degradantes de DNA, empregando técnicas de cultivo e de microscopia.

1.1 *Listeria monocytogenes* e listeriose

L. monocytogenes é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel devido a flagelos peritríquios, não formador de esporos e capaz de sobreviver e se multiplicar em condições ambientais adversas (baixas temperaturas, altas concentrações de sódio e baixo pH). Além disso, *L. monocytogenes* possui mecanismos de adaptação e sobrevivência como formação de biofilmes, *quorum sensing* e resistência a antibióticos (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

O gênero *Listeria* abrange as espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. rocourtiae* e *L. marthii*. Apenas as três primeiras são consideradas patógenos de mamíferos, sendo que *L. monocytogenes* é a espécie mais comumente associada a doenças em animais e humanos (GRAVES et al., 2010; LECLERCQ et al., 2010).

Considerada uma bactéria ubíqua, *L. monocytogenes* tem sido isolada de alimentos *in natura* ou processados, de água, esgoto, solo, vegetação em decomposição, silagem, animais (selvagens e domésticos) e de humanos (IVANEK; GRÖHN; WIEDMANN, 2006). Quando ingerida, *L. monocytogenes* pode causar a listeriose, uma doença geralmente autolimitante em indivíduos saudáveis, semelhante à gripe, caracterizada mais recentemente por uma leve gastroenterite acompanhada de febrícula. Porém, a doença pode ser severa em indivíduos imunocomprometidos, crianças, idosos e mulheres grávidas, sendo capaz de causar septicemia, meningite e aborto (FREITAG; PORT; MINEV, 2009).

L. monocytogenes tem quatro linhagens evolutivas (I, II, III e IV) com nichos coincidentes. A maioria dos isolados desta bactéria pertencem às linhagens I e II, que compreende os sorotipos mais comumente associados com casos clínicos humanos: o sorotipo 1/2a (linhagem II) e os sorotipos 1/2b e 4b (linhagem I). Cepas da linhagem II são comumente isoladas de alimentos e de animais com listeriose, enquanto que as da linhagem I estão mais associadas a surtos de listeriose em humanos. As demais, linhagens III e IV, são mais raras e predominantemente isoladas de fonte animal (ORSI; DEN BAKKER; WIEDMANN, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, *L. monocytogenes* apresenta grande importância para a saúde pública, sendo atualmente considerada

um dos principais patógenos emergentes associados a doenças transmitidas por alimentos (WHO, 2012).

Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se a ocorrência de 1.600 casos de listeriose a cada ano, com 1.400 hospitalizações e 250 mortes. Depois de *Salmonella* spp. não tifóide, *L. monocytogenes* é o patógeno de origem alimentar responsável pelo maior número de mortes nos EUA. Embora a listeriose seja uma doença severa, que demanda atendimento médico, é provável que alguns casos desta infecção, especialmente aqueles que envolvem abortos e natimortos, não sejam diagnosticados corretamente (SCALLAN et al., 2011).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, o surto mais recente de listeriose atingiu 146 indivíduos no segundo semestre de 2011 pela ingestão de melões frescos do tipo Cantaloupe produzidos em uma fazenda no estado do Colorado, EUA (CDC, 2012).

No Brasil, os surtos por *L. monocytogenes* e os casos de listeriose são subdiagnosticados e/ou subnotificados (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008). Martins et al. (2010a) relataram pela primeira vez um surto de listeriose no país, mas sem esclarecimento da fonte de infecção. Seis pacientes de um hospital da cidade do Rio de Janeiro – RJ, Brasil, com idade média de 80 anos e imunocomprometidos, apresentaram septicemia e/ou peritonite por *L. monocytogenes* sorotipos 1/2b ou 3b, causado pelo provável consumo de alimentos contaminados preparados pela própria cozinha do hospital. Cinco pacientes foram a óbito, confirmando a alta letalidade da listeriose.

1.2 Biofilmes e o DNA extracelular

Os biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas aderidas a uma superfície biótica ou abiótica hidratada e envolvidas por uma matriz extracelular polimérica produzida pelas próprias células (COSTERTON et al., 1995). Além das comunidades microbianas aderidas à superfície, podem ser consideradas como biofilmes também aquelas que se encontram suspensas em fluidos na forma de flocos, ou ainda em interfaces ar-líquido na forma de películas (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005).

A formação destas estruturas multicelulares em associação a superfícies compreende basicamente cinco etapas (Figura 1): (i) células bacterianas, na forma planctônica, em meio aquoso aderem a uma determinada superfície sólida por meio

de forças de van der Waals, força eletrostática e interações hidrofóbicas; (ii) multiplicação celular e produção de matriz extracelular polimérica (EPS, “*Extracellular Polymeric Substance*”); (iii) estruturas mais complexas passam a ser arquitetadas; (iv) um biofilme maduro contendo canais para fluxo de nutrientes e excretas é formado; (v) dispersão celular e consequente colonização de outras superfícies (LASA, 2006).

Figura 1. Etapas de formação do biofilme: (1) adesão inicial a superfície; (2) multiplicação e produção de matriz extracelular polimérica; (3) início da formação de estrutura complexa; (4) estrutura madura; (5) dispersão celular (modificado de LASA, 2006).

A EPS dos biofilmes é composta por uma mistura complexa de substâncias de alto peso molecular, como polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, glicolípídeos e DNA extracelular (DNAe). Esta matriz media a adesão à superfície, proporciona estabilidade mecânica ao biofilme, protege as células contra agressões externas e forma uma rede polimérica tridimensional que interconecta e imobiliza as células no biofilme. Além disso, funciona como um sistema digestivo externo por manter enzimas extracelulares próximas das células, para que ocorra a metabolização de biopolímeros (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A composição e a quantidade de EPS podem variar de acordo com o gênero e a espécie bacteriana formadora de biofilme. Dentre as bactérias Gram-positivas, os estafilococos, são excelentes produtores de EPS, formando um gel viscoso (do inglês, “*slime*”), composto por uma mistura de Polissacarídeo Intercelular Adesina (PIA), denominado poli-N-acetilglicosamina (PNAG); ácido teicóico e pequenas quantidades de proteínas, que facilitam a adesão celular inicial à superfície e auxiliam na formação de biofilmes estruturalmente maduros (OTTO, 2008).

A formação de biofilme pode conferir proteção contra uma grande variedade de fatores ambientais, tais como exposição a raios ultravioleta, metais tóxicos e ácidos, agentes antimicrobianos, desidratação, salinidade e fagocitose (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

O DNAe nos biofilmes foi inicialmente descrito como um dos principais componentes estruturais da EPS de biofilmes de *P. aeruginosa* (WHITCHURCH et al., 2002). Para esta bactéria, foi observado por meio de estudos moleculares, que o DNAe era semelhante ao DNA genômico, evidenciando que a presença deste ácido nucleico na EPS poderia estar relacionada com a lise celular modulada por autoindutores (ALLESEN-HOLM et al., 2006).

Atualmente, os autoindutores são reconhecidos por regular a formação e dispersão celular em biofilmes de diversos gêneros bacterianos. Estas moléculas se acumulam extracelularmente e a sua concentração se correlaciona com a densidade da população bacteriana presente em um determinado nicho. Em altas concentrações, autoindutores iniciam uma cascata de transdução de sinais que levam a uma resposta multicelular na população bacteriana, como a lise celular. Este mecanismo de comunicação célula-célula é chamado de *quorum sensing* (DICKSCHAT, 2010).

Bactérias Gram-positivas, por exemplo, utilizam peptídeos sinais para se comunicarem (SPOERING; GILMORE, 2006). Por exemplo, em *Streptococcus mutans*, a produção de grandes quantidades de peptídeos extracelulares (CPS, “*competence-stimulating peptides*”) no meio de cultura, induz a autólise de uma subpopulação bacteriana pelo acúmulo intracelular de uma bacteriocina denominada CipB. Há evidências de que a liberação de DNA por estas células lisadas possa estar envolvida na transferência horizontal de genes, promovendo mutações benéficas à população remanescente e também promovendo a formação de biofilme, já que o DNA é um dos constituintes da EPS (PERRY; CVITKOVITCH; LÈVESQUE, 2009).

Em *Enterococcus faecalis* foi proposto que o processo de autólise ocorre de modo fratricida, em um processo semelhante à necrose em células eucarióticas. Quando as células de *E. faecalis* aderem a uma determinada superfície e atingem uma população crítica, ocorre a ativação de uma via de sinalização por meio de moléculas de *quorum sensing*, resultando na produção de fatores autolíticos, os quais causam a morte celular e a liberação de DNA por uma subpopulação celular

culminando na produção e maturação do biofilme (GUITON et al., 2009). No entanto, em *S. aureus* a autólise ocorre por um processo de suicídio, semelhante à apoptose em células eucarióticas, mediado pela mureína hidrolase, uma autolisina que degrada peptidoglicano (RICE et al., 2007).

A autólise parece ser o mecanismo pelo qual o DNA é liberado para o meio extracelular, mas há evidências de que ele também possa ser transportado para fora da célula por mecanismos ainda desconhecidos e que não envolvem a lise celular (GRANDE et al., 2010).

A presença e a persistência do DNAe em diversos ambientes naturais (água e solo) está relacionada ao seu caráter polianiónico dependente do pH, o que permite interações com substâncias húmicas e minerais dispersos, contribuindo para a adaptação, resistência e variabilidade genotípica em comunidades microbianas (NIELSEN et al., 2007; STEWARD; FRANKLIN, 2008; SCHOOLING, HUBLEY; BEVERIDGE, 2009).

1.3 Formação de biofilme por *L. monocytogenes*

A capacidade de *L. monocytogenes* de persistir por longos períodos em equipamentos e ambientes da indústria de alimentos, particularmente em condições adversas, intriga a comunidade científica (TOMPKIN, 2002). Em biofilme, *L. monocytogenes* está protegida da dessecação, de antimicrobianos e tolera altas concentrações de agentes desinfetantes e sanitizantes, o que dificulta a descontaminação de superfícies (CARPENTIER; CERF, 2011).

Silva et al. (2008) observaram através de imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) que *L. monocytogenes* foi capaz de aderir a uma variedade de superfícies de contato com os alimentos, incluindo poliestireno, polipropileno, vidro, aço inoxidável, quartzo, mármore e granito. No entanto, *L. monocytogenes* não é capaz de formar biofilmes com multicamadas espessas de 10^9 a 10^{12} unidades formadoras de colônia por cm^2 (UFC/ cm^2) como ocorre com outras bactérias comumente encontradas em biofilmes, mas adere a superfícies com populações de 10^4 a 10^7 UFC/ cm^2 (GRAM et al., 2007).

L. monocytogenes já foi isolada de diversos locais na indústria de alimentos: salas de corte e resfriamento, drenos, correias transportadoras, esteiras, freezers, defumadouros, máquinas de fatiar e empacotar, pisos e paredes, pedilúvios, salmouras e dutos de ar (MORETRO; LANGSRUD, 2004; SOFOS, 2009a).

Em estudos experimentais, as propriedades físico-químicas da superfície de contato (hidrofobicidade e carga eletrostática), a diversidade de sorotipos e as condições ambientais, como pH, meio de cultura e temperatura são os principais fatores que influenciam a capacidade de *L. monocytogenes* de aderir e formar biofilme (BORUCKI et al., 2003; MAI; CONNER, 2007; ADRIÃO et al., 2008; Di BONAVENTURA et al., 2008).

Moléculas autoindutoras produzidas por *L. monocytogenes* também parecem contribuir para sua capacidade de formação de biofilme. A s-ribosil-homocisteína, precursora do autoindutor-2 (AI-2), uma molécula universal, que participa do *quorum sensing* de inúmeras bactérias, estimulou a formação de densos biofilmes por *L. monocytogenes* (BELVAL et al., 2006). De forma semelhante, o sistema *agr* de *quorum sensing*, também encontrado em *S. aureus*, parece modular a adesão e os estágios iniciais de formação de biofilme por *L. monocytogenes* (RIEU et al., 2007).

A produção de flagelos, conferindo motilidade a 25°C, e outras propriedades da membrana celular, também têm sido discutidas como possíveis moduladores da adesão inicial e da formação de biofilmes maduros por *L. monocytogenes* (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007).

Tresse et al. (2007) demonstraram que cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras alimentícias e da indústria processadora de alimentos possuíam maior capacidade de aderir e formar biofilme em superfícies abióticas (aço inoxidável e poliestireno) do que as cepas isoladas de pacientes com listeriose. Esta maior capacidade de adesão das cepas ambientais pode estar intimamente relacionada com a variabilidade genética de *L. monocytogenes* e com sua associação a biofilmes de outras bactérias residentes (CARPENTIER; CHASSAING, 2004).

Carpentier e Chassaing (2004) isolaram 29 cepas de diversos gêneros bacterianos de indústrias processadoras de alimentos e as cultivaram juntamente com *L. monocytogenes*. Os resultados apontaram decréscimo na formação de biofilme em superfície de aço inoxidável por *L. monocytogenes* co-cultivada com *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. e *Staphylococcus* sp., em comparação com cultura pura. Por outro lado, um efeito positivo (aumento de 0,5 a 1,0 UFC/cm²) foi observado na presença de culturas ou sobrenadantes de culturas de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Comamonas testosteroni*, *Kocuria varians* e *Staphylococcus capitis*. Esta modulação da formação de biofilme por *L.*

monocytogenes na presença de outras bactérias, pode estar relacionada à síntese de várias substâncias extracelulares.

De acordo com Carpentier e Cerf (2011), a capacidade de cepas de *L. monocytogenes* de persistir na indústria de alimentos esta intimamente relacionada à inabilidade de desalojamento e eliminação desta bactéria de seus nichos, bem como pela sua habilidade de sobreviver e multiplicar em baixas temperaturas. Na opinião destes autores, não há estirpes de *L. monocytogenes* com propriedades únicas que levam à persistência, mas nichos de refúgio em instalações e equipamentos da indústria onde a bactéria pode persistir.

1.4 Técnicas para estudo de biofilmes

O estudo laboratorial de biofilmes pode ser realizado através de técnicas de cultivo para enumeração da população bacteriana aderida à superfície, bem como por técnicas moleculares e de microscopia (RENIER; HÉBRAUD; DESVAUX, 2011). Para isso, os microrganismos podem ser cultivados em sistemas estáticos, sob agitação ou em células de fluxo contínuo (BRANDA et al., 2005; GRAM et al., 2007).

A remoção da população bacteriana aderida à superfície pode ser realizada com o auxílio de *swab*, tratamento enzimático, banho de ultrassom ou pérolas de vidro, seguida da enumeração de células viáveis em placa (LINDSAY; HOLY, 1997; MOTT et al., 1998; GAMBLE; MURIANA, 2007). Além disso, a quantificação da biomassa microbiana tem sido feita pelo uso de sonda não específica (como, o cristal violeta) seguida da medida de absorbância, quando utilizado o sistema de cultivo em microplaca (BRANDA et al., 2005).

Segundo Renier, Hébraud e Desvaux (2011), a arquitetura do biofilme de *L. monocytogenes* tem sido investigada, principalmente, por estudos de MEV, microscopia de fluorescência e microscopia confocal a laser (CLSM, “*Confocal Laser Scanning Microscopy*”). A MEV possibilita a observação da organização celular, bem como da presença de EPS (ZAMEER et al., 2010), enquanto que as microscopias de fluorescência e CLSM por meio de uma combinação de corantes fluorogênicos, possibilitam estudos de viabilidade celular, observação de biofilmes mistos ou de componentes específicos da EPS (BORUCKI et al., 2003; HARMSSEN et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011, BERK et al., 2012). A CLSM também possibilita a observação da estrutura tridimensional dos biofilmes, ou seja, da sua organização em camadas (CHAE et al., 2000; RIEU et al., 2008a; BERK et al., 2012).

Rodriguez, Autio e McLandsborough (2008) investigaram os efeitos do tempo de contato, pressão, umidade relativa e do tipo de material sobre a força adesiva de *L. monocytogenes* a superfície abiótica usando microscopia de força atômica (MFA). A MFA permitiu a visualização em terceira dimensão do biofilme de *L. monocytogenes* formado em superfície de aço inoxidável e organizado em microcônias envoltas por EPS. Os resultados apontaram que o tempo de contato, a pressão e a umidade relativa não interferiram na adesão de *L. monocytogenes* a diferentes superfícies. No entanto, foi constatada uma melhor adesão a superfícies hidrofóbicas do que a superfícies hidrofílicas.

O corante fluorogênico laranja de acridina pode ser aplicado em estudos de biofilmes devido à capacidade de corar matéria orgânica e de se ligar diferencialmente aos ácidos nucleicos de fitas simples e dupla. Desta forma, auxilia na enumeração total de bactérias em suspensão ou aderida a superfícies, bem como na determinação da atividade metabólica das mesmas (MAUKONEN et al., 2003).

Allesen-Holm et al. (2006) foram os primeiros a demonstrar a presença do DNAe em biofilme de *P. aeruginosa* expressando proteína fluorescente verde, pelo uso do corante DDAO (7-hidroxi-9H-[1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona]). Este corante foi escolhido devido à sua excelente propriedade fluorescente e semelhança estrutural com o corante laranja de acridina, sendo revelado por CLSM. O corante DDAO (vermelho) se liga tanto ao DNA genômico de células com membrana celular rompida quanto ao DNAe, permitindo a localização de células não viáveis e a observação da distribuição do DNAe em biofilmes. Além disso, o DDAO pode ser utilizado em combinação com o corante SYTO 9 (verde), que se liga ao DNA genômico por atravessar a membrana celular íntegra. Desta forma, a combinação dos corantes SYTO 9 e DDAO permite a diferenciação entre células com membrana viável (verde) e não viável (vermelho), e a sobreposição de imagens obtidas com ambos, permite a localização do DNAe envolvendo células viáveis (amarelo) no biofilme (QIN et al., 2007).

1.5 Prevenção e controle da formação de biofilmes

Várias estratégias têm sido adotadas para prevenir e controlar a formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos e também em equipamentos médicos. De acordo com Francolini e Donelli (2010), as principais estratégias são:

(a) inibição da adesão inicial à superfície e da colonização; (b) interferência com os sinais moleculares que modulam o desenvolvimento de biofilmes; e (c) desagregação da matriz polimérica.

A indústria de alimentos realiza o controle de biofilmes por *L. monocytogenes* principalmente pela higienização e descontaminação de instalações e equipamentos combinando o uso de agentes sanitizantes (tais como, ácido acético, ácido láctico, hipoclorito de sódio, amônio quaternário e peróxido de hidrogênio) com tempos e temperaturas de exposição adequadas, concentrações apropriadas, combinadas com remoção mecânica (SOFOS, 2009b).

No entanto, os métodos de limpeza convencionais são reconhecidamente mais eficientes sobre células bacterianas recentemente depositadas sobre a superfície do que sobre formas sésseis, devido principalmente à proteção conferida pela EPS dos biofilmes (CZACZYK; MYSZKA, 2007). Além disso, alternativas biológicas têm sido propostas em complementação e/ou substituição a procedimentos usuais e incluem a utilização de enzimas, fagos, moléculas antimicrobianas de origem bacteriana e interação inter-espécies (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Devido à variabilidade na composição da EPS dos biofilmes, o uso de enzimas ou de misturas enzimáticas de diversas origens pode ser uma ferramenta importante para sua erradicação. Enzimas produzidas por fungos, com ação sobre pectina, xilana, alginato e goma arábica são auxiliares na remoção de biofilmes bacterianos (ORGAZ et al., 2006). Também a proteinase K, a tripsina, a pancreatina e a dispersina B (de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) estão disponíveis comercialmente e são eficientes catalisadores da hidrólise do polissacarídeo poli-*N*-acetil-glucosamina, um dos constituintes da EPS de várias espécies microbianas (CHAIGNON et al., 2007).

Após a descoberta do DNAe como um dos componente da EPS, vários autores interessaram-se pela aplicação de enzimas degradantes de DNA (DNAses) para prevenir a formação ou romper biofilmes de patógenos, como *C. albicans*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophyllus influenzae* e *Klebsiella pneumoniae* (IZANO et al., 2008; TETZ; ARTEMENKO; TETZ, 2009; HARMSSEN et al., 2010; VILAIN et al., 2009; LAPPANN et al., 2010; MARTINS et al., 2010b). Em grande parte dos estudos foi observado que as DNAses possuíam maior potencial de redução de

biofilmes nos estágios iniciais de formação, provavelmente por que o DNAe favorece interações ácido-base que contribuem para a adesão inicial e a agregação de micro-organismos em superfícies (DAS et al., 2010).

Considerando os estudos com DNAses, Mann et al. (2009) propuseram que a nuclease estafilocócica (ou termonuclease), uma DNase termoestável produzida por cepas de *S. aureus*, poderia apresentar um importante papel na formação e dispersão de biofilmes, possivelmente degradando o DNAe associado à matriz polimérica. Os autores demonstraram que cepas mutantes de *S. aureus*, deficientes na produção de termonuclease, exibiam um aumento significativo na formação de biofilme com relação às cepas selvagens. Mais recentemente, Tang et al. (2011) utilizando uma forma recombinante de termonuclease, comprovaram que não só *S. aureus*, mas *P. aeruginosa*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Haemophilus parasuis* tinham a formação de biofilme inibida na presença da enzima e atribuíram o efeito observado à possível degradação do DNAe.

As DNAses podem ser de origem humana, animal ou microbiana, sendo atualmente produzidas em ampla escala pela indústria farmacêutica na forma recombinante. A DNase I recombinante humana (Pulmozyme®), por exemplo, já têm sido utilizada no tratamento da fibrose cística, uma doença que favorece a infecção pulmonar por *P. aeruginosa*. A enzima auxilia na degradação do DNAe presente na matriz do biofilme diminuindo a viscosidade do muco pulmonar e facilitando a expectoração (FREDERIKSEN et al., 2006).

O pré-tratamento de superfícies abióticas com coquetéis de bacteriófagos também tem sido estudado como uma alternativa de reduzir a adesão e controlar a formação de biofilmes, principalmente por bactérias de relevância clínica. Testes em catéteres de silicone mostraram que bacteriófagos reduziram a densidade celular dos biofilmes de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* em 99,9%, durante 48h de exposição (FU et al., 2009).

O uso de peptídeos antimicrobianos, chamados de bacteriocinas, ou de cepas produtoras de bacteriocinas também pode contribuir no controle da adesão inicial e na formação de biofilme por *L. monocytogenes* em superfícies abióticas (MINEI et al., 2008; WINKELSTRÖTER et al., 2011). Minei et al. (2008), por exemplo, demonstraram que *Enterococcus faecium* produtor de bacteriocina foi capaz de inibir a formação de biofilme por *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável quando em co-cultura por até 48h a 37°C. Do mesmo modo, Winkelströter et al.

(2011), utilizando um modelo experimental semelhante, observaram que *Lactococcus sakei* 1 e o seu sobrenadante contendo bacteriocina (sakacina 1) foi capaz de reduzir a adesão de *L. monocytogenes* a superfície de aço inoxidável por até 48h a 25°C.

De acordo com Cotter, Hill e Ross (2005) as bacteriocinas podem ser usadas para conferir proteção aos consumidores, agindo frente a patógenos em alimentos. Culturas produtoras de bacteriocinas podem ser incorporadas diretamente aos alimentos, auxiliando no controle da microbiota; ou ainda sob a forma de preparações purificadas, como a nisina produzida por *Lactococcus lactis* e com uso permitido como aditivo alimentar em muitos países.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em superfície abiótica, sob diferentes condições de incubação, bem como na presença de sobrenadante de cultura de estafilococos e de DNAses, por meio de técnicas de cultivo e de microscopia.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a capacidade de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável a 25°C e 37°C, por meio de técnicas de cultivo e microscopia de fluorescência;
- ✓ Estudar a possível interferência do sobrenadante de estafilococos, com e sem atividade de termonuclease, na formação de biofilme por *L. monocytogenes*;
- ✓ Testar a possível interferência de DNAses comerciais na capacidade de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável;
- ✓ Observar a estrutura do biofilme e localizar neste o DNAe de *L. monocytogenes*, utilizando corantes fluorescentes e CLSM.

3. Materiais e Métodos

3.1 Manutenção das linhagens bacterianas

Para os estudos da formação de biofilmes foram utilizadas as cepas *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a), *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14490. As bactérias foram mantidas a -80°C em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI, Oxoid, Reino Unido) adicionado de 20% (v/v) de glicerol (Synth, Brasil).

3.2 Estudos de formação de biofilmes por *L. monocytogenes*

Foram realizados experimentos com métodos de cultivo em sistemas com agitação ou estático, e enumeração das populações aderidas, bem como observações em microscopia de fluorescência e CLSM.

3.2.1 Tratamento dos materiais de aço inoxidável

Todo material de aço inoxidável (lâminas e suportes) utilizado no presente trabalho foi previamente tratado de acordo com o método utilizado por Marsh, Luo e Wang (2003), com modificações, através das seguintes etapas:

- Lavagem com solução de Extran MAO2 (Merck, Brasil);
- Fervura por 5 minutos em solução 1% (v/v) de lauril sulfato de sódio (Vetec, Brasil);
- Enxágue em água corrente;
- Enxágue em água purificada;
- Imersão em álcool etílico 92,6% (Riberálcool, Brasil) por 5 minutos;
- Enxágue com água purificada;
- Secagem em estufa a 60°C.

3.2.2 Sistema com agitação em frasco cilíndrico

Um dos sistemas que foi utilizado para a avaliação da formação de biofilmes por *L. monocytogenes* foi modificado de Ratti (2006) e consistia em frasco cilíndrico de poliestireno de 1000mL (Nalgene, EUA), com tampa do mesmo material. No seu interior foi colocado um suporte circular de aço inoxidável de 4,5cm de diâmetro, que acomodava verticalmente seis lâminas de aço inoxidável (AISI 304) com 15cm² de superfície e dimensões de 7,5cm X 2,0cm X 2,0cm, apoiadas por um tripé de aço inoxidável; e uma barra magnética, para manter 800mL de meio de cultura sob

agitação constante (Figura 2). O material de aço inoxidável foi tratado (item 3.2.1) e o sistema montado foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

L. monocytogenes foi reativada em caldo BHI e incubada a 37°C por 24h. Após este período, 8mL da cultura de *L. monocytogenes* foram inoculados (1%, v/v) no sistema contendo 800mL de caldo BHI, para um inóculo final de 10^7 UFC por mL. Foram empregadas as temperaturas de incubação de 25°C e 37°C por 72h, com agitação. A cada 24h de incubação, uma lâmina era removida com auxílio de uma luva esterilizada e lavada para remoção de bactérias não aderidas, com 20mL de solução salina fosfatada tamponada pH 7,0 (PBS, “*Phosphate Buffered Saline*”, constituída por cloreto de sódio 0,8%, cloreto de potássio 0,02%, fosfato de sódio dibásico 0,115% e fosfato de potássio monobásico 0,02%).

A população bacteriana aderida às lâminas de aço inoxidável foi removida por fricção manual (100 vezes) com auxílio de uma zaragatoa esterilizada e transferida para um tubo contendo 10mL de PBS. O tubo foi agitado vigorosamente em agitador tipo vórtex e foram realizadas diluições decimais seriadas.

Figura 2. Representação esquemática do sistema em frasco cilíndrico com suporte de aço inoxidável para lâminas, montado para estudo de biofilme.

As populações de *L. monocytogenes* foram determinadas pela semeadura das diluições preparadas em ágar BHI pela técnica de *Drop Plating* (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001) com incubação a 37°C por 24h (Figura 3).

As populações de *L. monocytogenes* planctônicas também foram determinadas quando os testes foram realizados a 37°C. Para isso, 1mL do caldo BHI inoculado foi transferido para um tubo contendo 9mL de PBS, o tubo foi agitado e foram realizadas diluições decimais seriadas e semeadura em superfície de ágar BHI pela técnica de *Drop Plating*, com incubação a 37°C por 24h.

As populações bacterianas foram enumeradas em triplicatas independentes nos tempos 24, 48 e 72h em ambas as temperaturas (25°C e 37°C) e os resultados foram expressos como log UFC/cm² para a população bacteriana aderida à lâmina de aço inoxidável, e log UFC/mL para a população bacteriana livre no meio de cultura.

Figura 3. Representação esquemática das etapas para quantificação da população de *L. monocytogenes* aderida à superfície de aço inoxidável, cultivada em frasco cilíndrico contendo caldo BHI e suporte de aço inoxidável para lâminas.

3.2.3 Sistema com agitação em microplaca

O outro sistema utilizado para avaliar a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* consistiu de microplaca de poliestireno contendo 24 poços (Costar Corning, EUA), proposto por Borucki et al. (2003). Para isso, no interior de cada poço da microplaca foi colocada uma lâmina circular de aço inoxidável (AISI 304) de 2,45cm², tratada (item 3.2.1) e esterilizada a 121°C por 15 minutos. Depois, foram

acrescidos 2mL de caldo BHI e 0,02mL (1%, v/v) de cultura de *L. monocytogenes* (37°C, 24h) para um inóculo final de 10^7 UFC/mL. O sistema foi mantido sob agitação (60 rpm) a 25°C ou 37°C por 72h, em agitador orbital (Cientec, Brasil).

As bactérias aderidas às lâminas de aço inoxidável foram removidas de acordo com o método descrito por Leriche e Carpentier (1995), com modificações. A cada 24h de incubação a cultura era removida de três poços da microplaca e cada poço era lavado duas vezes com 1mL de PBS. A lâmina de cada um dos poços era removida, com o auxílio de uma pinça esterilizada, e transferida para um tubo contendo 10mL de PBS. Os tubos foram submetidos a banho de água com ultrassom (Odontobrás, Brasil) a 50-60kHz por 2 minutos e em seguida foram agitados vigorosamente por 1 minuto em agitador tipo vórtex. Foram realizadas diluições decimais seriadas, que foram semeadas em ágar BHI pela técnica de *Drop Plating* e incubadas a 37°C por 24h (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática das etapas para quantificação da população de *L. monocytogenes* aderida à superfície de aço inoxidável em sistema sob agitação em microplaca.

Para o sistema testado a 37°C também foram enumeradas populações bacterianas livres nos meios de cultura. Para isso, foram transferidos 0,1mL do

efluente para um tubo contendo 0,9mL de PBS. O tubo foi agitado e foram realizadas diluições decimais seriadas e semeadura em ágar BHI pela técnica de *Drop Plating* e incubação a 37°C por 24h. As populações bacterianas foram enumeradas nos tempos 24, 48 e 72h. Em ambas as condições de incubação (25°C e 37°C) foram feitas duplicatas independentes e os resultados foram expressos como log UFC/cm² para a população bacteriana aderida à lâmina de aço inoxidável e log UFC/mL para a população bacteriana livre no meio de cultura.

3.2.4 Preparo do sobrenadante de cultura de estafilococos

As cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram reativadas separadamente em caldo BHI a 37°C por 24h, transferidas para caldo BHI (1%, v/v) em frascos independentes e incubadas novamente a 37°C por 24h. Estas culturas foram tratadas termicamente em banho de água em ebulição (15 minutos) e imediatamente centrifugadas a 14000xg por 10 minutos a 4°C (Sorvall Legend Mach 1.6R, Sorvall, EUA). O sobrenadante foi filtrado (0,22µm - GVWP, Millipore) e utilizado em estudos de formação de biofilme por *L. monocytogenes* na presença de sobrenadante de cultura de estafilococos.

3.2.4.1 Estudo de formação de biofilme por *L. monocytogenes* na presença de sobrenadante de cultura de estafilococos

Para o estudo de formação de biofilme por *L. monocytogenes* na presença de sobrenadante de cultura de estafilococos foram utilizados os sistemas de agitação em frasco cilíndrico e em microplaca. As populações bacterianas aderidas à superfície de aço inoxidável e livres no meio de cultura foram enumeradas como descrito anteriormente (itens 3.2.2 e 3.2.3). A capacidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes* foi testada a 37°C por 72h na presença de 50% de caldo BHI fresco e 50% de sobrenadante de cultura de *S. aureus* ATCC 29213 (cepa produtora de termonuclease) ou *S. epidermidis* ATCC 14490 (cepa não produtora de termonuclease), conforme item 3.2.4.

3.2.4.2 Quantificação da atividade de termonuclease pelo ensaio de diluição crítica

A atividade específica de termonuclease foi monitorada ao longo de 72h de incubação de *L. monocytogenes* na presença de sobrenadante de cultura de *S. aureus*.

A atividade de termonuclease foi determinada com base no ensaio de diluição crítica (MAYR-HARTING; HEDGES; BERKELEY, 1972) associado ao teste de termonuclease (BENNETT; LANCETTE, 1998), e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL).

Em placas de petri foram depositados 15mL de ágar DNA – azul de toluidina constituído por 42g de base de ágar DNase (Himedia, Índia), 7,75g de ágar bacteriológico (Oxoid, Reino Unido), 1,1mg de CaCl_2 (Vetec, Brasil), 9,25g de NaCl (Synth, Brasil), 0,1g de azul de toluidina (Vetec, Brasil), 6,1g de tris aminometano (Serva, Brasil) e 1L de água purificada. Após solidificação do ágar foram feitos orifícios de 2mm de diâmetro com auxílio de uma ponteira de micropipeta (1mL) cortada e esterilizada.

A cada 24h, foi retirado 1mL do caldo da cultura dos poços (microplaca) ou do frasco cilíndrico. O caldo foi centrifugado a 14000xg por 10 minutos a 4°C, para remover as células de *L. monocytogenes* e o sobrenadante foi filtrado (0,22µm - GVWP, Millipore). O filtrado foi diluído serialmente em placas de 96 poços com caldo BHI, nas proporções de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256. Em seguida, 10µL de caldo BHI (controle), 10µL da amostra original (sem diluição) e de cada uma das diluições foram aplicados uma vez em cada orifício feito nas placas de ágar DNA – azul de toluidina. As placas foram incubadas em câmara úmida por 24h a 37°C.

A reação positiva para termonuclease consistia no aparecimento de um halo cor de rosa brilhante, estendendo-se pelo menos 1mm além das bordas do orifício. Para a quantificação da atividade de termonuclease (em UA/mL) foi considerada a recíproca da última diluição que apresentou halo cor de rosa brilhante $\geq 1\text{mm}$, corrigida para 1mL.

3.2.5 Estudo de formação de biofilme por *L. monocytogenes* na presença de DNases comerciais

Para o estudo de formação de biofilme por *L. monocytogenes* na presença de DNases foram utilizados os sistemas de agitação em frasco cilíndrico e em microplaca. As populações bacterianas aderidas à superfície de aço inoxidável e livres no meio de cultura foram enumeradas como descrito anteriormente (itens 3.2.2 e 3.2.3). A formação de biofilmes por *L. monocytogenes* foi testada a 37°C por 72h na presença de 2mL de caldo BHI acrescido de 2 Unidades por mL (U/mL) de

termonuclease (nuclease micrococal de *S. aureus*, Sigma-Aldrich, EUA) ou caldo BHI acrescido de 100µg/mL de DNase I de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich, EUA).

3.2.6 Análise estatística

Os resultados das enumerações em placa de *L. monocytogenes* realizadas a partir dos sistemas de agitação em frasco cilíndrico e em microplaca foram analisados através do programa Prisma Graph versão 5.0. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias, seguido do teste de Bonferroni, considerando como diferença significativa $p < 0,05$, para avaliar a diferença entre as condições estudadas.

3.2.7 Estudos de microscopia de fluorescência

Os estudos de microscopia de fluorescência foram feitos a fim de observar a arquitetura do biofilme de *L. monocytogenes* formado nas lâminas de aço inoxidável retangulares do sistema com agitação em frasco cilíndrico (item 3.2.1) e nas lâminas de aço inoxidável circulares do sistema com agitação em microplaca (item 3.2.2). Para isso, foi utilizado o laranja de acridina, um corante metacromático seletivo de ácido nucleico, que cora diferencialmente RNA e DNA. O espectro de emissão deste corante é dependente da ligação com um determinado substrato, por isso quando o laranja de acridina interage com DNA (por intercalação) fluoresce verde e quando reage com o RNA (por atração eletrostática) fluoresce amarelo a vermelho. Desta forma, células metabolicamente ativas (ricas em RNA) mostram fluorescência laranja, enquanto células metabolicamente inativas (com pouco RNA) mostram fluorescência verde (Ramya et al., 2010).

3.2.7.1 Lâminas retangulares de aço inoxidável

Para as lâminas de aço inoxidável retangulares do sistema com agitação em frasco cilíndrico (item 3.2.2) foram registradas imagens das células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C.

A cada 24h de incubação, uma lâmina retangular era retirada do frasco cilíndrico com o auxílio de uma luva esterilizada e lavada com 20mL de PBS, para remover as bactérias não aderidas. Depois, a lâmina era fixada com metanol (Chemco, Brasil) por 5 minutos e lavada com 10mL de água corrente por 6 vezes (HIRAGA et al., 1989). Em seguida, era corada com laranja de acridina 0,01%

(Sigma-Aldrich, EUA) e lavada novamente com 20mL de PBS para retirar o excesso do corante (PAN; BREIDT; KATHARIOU, 2006).

A lâmina corada era transferida para a tampa de uma placa de Petri e coberta por lamínula de vidro. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss) utilizando filtro de excitação para comprimento de onda de 450-490nm, em objetiva de 40X e com auxílio do Software AxioVision LE, no Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP (gentilmente cedido pela Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes).

3.2.7.2 Lâminas circulares de aço inoxidável

Para as lâminas de aço inoxidável circulares do sistema com agitação em microplaca (item 3.2.3) foram registradas imagens de biofilme de *L. monocytogenes* após 24, 48 e 72h de incubação a 25°C e 37°C, e também de biofilmes formados na superfície das lâminas de aço inoxidável, quando na presença de sobrenadante de cultura de estafilococos e de DNAses. Para isso, a cada 24h de incubação, o meio de cultura era retirado de um poço da microplaca e o poço era lavado com 1mL de PBS por 2 vezes, para retirar as bactérias não aderidas à lâmina de aço inoxidável. Depois, a lâmina era fixada com metanol (Chemco, Brasil) por 5 minutos e lavada com 1mL de água corrente por 6 vezes (HIRAGA et al., 1989). Em seguida, era corada com laranja de acridina 0,01% (Sigma-Aldrich, EUA) e lavada novamente com 1mL de PBS por três vezes para retirar o excesso do corante (PAN; BREIDT; KATHARIOU, 2006).

A lâmina corada era transferida para uma lâmina de microscopia de vidro, coberta por lamínula de vidro e selada com cola (Superbonder®, Henkel, Brasil). Parte da aquisição das imagens foi feita em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss) com auxílio do Software AxioVision LE, no Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP (gentilmente cedido pela Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes) e parte foi adquirida em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i) com auxílio do Software NIS-Elements AR 3.2, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP. As imagens foram adquiridas utilizando filtros de excitação com comprimento de onda de 450-490nm e 510-560nm e objetivas com aumento de 20X, 40X e 100X com óleo de imersão.

3.2.8 Estudos de microscopia confocal a laser

Os estudos de CLSM foram feitos a fim de observar a arquitetura do biofilme de *L. monocytogenes* pelo uso de corantes de DNA, que marcam as células viáveis com membrana celular intacta em verde (SYTO 9), e marcam em vermelho (DDAO) as células com membrana celular danificada, bem como o DNAe da matriz polimérica. As células coradas em amarelo indicavam a presença de células viáveis envoltas por DNAe, devido à sobreposição dos corantes, como descrito por Qin et al. (2007).

A aquisição das imagens foi feita no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da FMRP-USP (Processo FAPESP 2004/08868-0) em microscópio confocal a laser invertido TCS SP5 (Leica, Heidelberg, Germany), equipado com lasers Ar-Kr-488nm e He-Ne 633nm, em objetiva de 63X com óleo de imersão.

Para preparação de lâminas para observação em CLSM, foi utilizado um sistema estático fechado (NUNC Chamber Slides, Sigma-Aldrich, EUA) conforme recomendação do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da FMRP-USP. O sistema consistia de uma câmara plástica montada sobre lamínula de borosilicato, com tampa plástica e 8 compartimentos com capacidade para 0,2 a 0,5mL de meio de cultura ou suspensão celular (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática de câmara plástica montada sobre lamínula de borosilicato adquirida para observação com CLSM (<<http://www.bioexpress.com/divinity-cart/item/312100/NALGE-NUNC-Lab-Tek-II-Chambered-Coverglass/1.html>>).

Foram registradas imagens dos biofilmes de *L. monocytogenes* formados na superfície de borosilicato após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C em caldo BHI. Para isso, em cada compartimento da câmara foi colocado 0,5mL de caldo BHI acrescido de 1% (v/v) de cultura de *L. monocytogenes* (24h/37°C). Decorrido o tempo de incubação, cada compartimento da câmara foi lavado com 0,5mL de PBS por duas vezes para retirar as bactérias não aderidas. Em seguida, foram acrescentados 0,1 mL dos corantes SYTO 9 (Molecular Probes, USA) e DDAO

(Invitrogen, USA), nas concentrações de 3,34mM e 1 μ M, respectivamente, por 20 minutos. Os corantes foram removidos e o sistema fechado e selado com Superbonder® foi levado ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da FMRP-USP (Processo FAPESP 2004/08868-0) para a aquisição das imagens.

Neste sistema estático também foram realizados experimentos com 50% de caldo BHI fresco e 50% de sobrenadante de cultura de *S. aureus* (item 3.2.4). As imagens dos biofilmes de *L. monocytogenes* formados nesta condição, na superfície de borosilicato, foram registradas após 24, 48 e 72h de incubação.

Foram realizadas duplicatas independentes de cada condição de incubação. As imagens adquiridas por CLSM foram montadas e analisadas quanto à intensidade de fluorescência com auxílio do programa MacBiophotonics ImageJ (disponível em <http://www.macbiophotonics.ca/imagej/installing_imagej.htm>), a fim de realizar a reconstrução do biofilme de *L. monocytogenes* utilizando os *z-stack* (0,13 μ m); e quantificar a biomassa, que foi expressa em unidade de fluorescência por μm^3 (UF/ μm^3). A figura 6 ilustra os parâmetros considerados para os cálculos de quantificação de biomassa.

Os resultados de quantificação de biomassa foram analisados através do programa Prisma Graph versão 5.0, com teste ANOVA de duas vias, seguido do teste de Bonferroni, considerando como diferença significativa $p < 0,05$, para avaliar a diferença entre as condições estudadas.

Figura 6. Representação esquemática de imagem tridimensional adquirida por CLSM de um biofilme. Os eixos x e y determinam a área de visualização, enquanto o eixo z representa a profundidade. A multiplicação da área pela profundidade permite a análise de fatias (*z-stack*) do biofilme, bem como do volume total por ele ocupado (modificado de ARNOLD; GROBMANN; BAUMANN, 2010).

3.3 Avaliação da atividade inibitória de *S. aureus* sobre *L. monocytogenes* em ágar

Para melhor definir quais compostos eram responsáveis pela inibição da formação de biofilmes de *L. monocytogenes* por *S. aureus*, foram propostos ensaios para avaliação da produção por *S. aureus* de peptídeos com atividade antilisteriana.

A produção de substância inibitória por *S. aureus* contra *L. monocytogenes* foi verificada pelo teste de antagonismo direto, proposto por Lewus, Kaiser e Motville (1991), com modificações.

S. aureus foi reativado em caldo BHI por 24h a 37°C. Após este período, 2µL foram inoculados no centro de uma placa de Petri contendo ágar TSA-ye (Tryptose de soja adicionado de 0,6% p/v de extrato de levedura – Oxoid, Reino Unido) e submetido a incubação por 24h a 37°C. Após a incubação, a placa foi tratada com vapor de clorofórmio durante 15 minutos para destruir células viáveis de *S. aureus* e em seguida foi deixada aberta por 30 minutos para eliminar o clorofórmio por evaporação (LIMA, 2002). Após este tratamento, foram depositados sobre a placa, 7mL de ágar BHI semi-sólido (caldo BHI adicionado de 0,8% de ágar, p/v), previamente inoculado a 1% (v/v) com uma cultura de 24h/37°C de *L. monocytogenes* em caldo BHI (Figura 7). A placa foi incubada a 37°C por 24h e a formação de halo de inibição ao redor da colônia de *S. aureus* seria indicativa de atividade inibitória.

Figura 7. Representação esquemática do teste de antagonismo direto em ágar para avaliação da atividade inibitória de *S. aureus* sobre *L. monocytogenes*.

3.3.1 Avaliação da presença de bacteriófagos líticos

Esse teste foi realizado segundo metodologia de Lewus, Kaiser e Motville (1991), para verificar a possível presença de bacteriófagos. O teste de antagonismo descrito anteriormente foi repetido (item 3.3). Parte do ágar da região da placa em

que se formou halo de inibição foi removida assepticamente e adicionada em 3mL de caldo BHI, seguida de trituração com bastão de vidro esterilizado. A mistura foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,3mL da suspensão e 0,1mL de *L. monocytogenes* (previamente cultivada a 24h/37°C) foram adicionados a 4mL de ágar BHI semi-sólido (caldo BHI adicionado de 0,8% de ágar, p/v) e este foi distribuído em placa de ágar BHI, a qual foi incubada por 24h/37°C (Figura 8). Após esse período, foi realizada a leitura quanto à presença de zonas líticas, que seriam indicativas da presença de bacteriófagos.

Figura 8. Representação esquemática do teste para verificação da presença de bacteriófagos líticos.

3.3.2 Avaliação da natureza proteica

A sensibilidade a proteases do inibidor produzido por *S. aureus* foi verificada conforme método modificado de Lewus, Kaiser e Montville (1991).

Foi inoculado no centro de uma placa de Petri contendo ágar TSA-ye (Oxoid, Reino Unido), 2μL de cultura de *S. aureus* (24h a 37°C). A placa foi incubada a 37°C por 24h e depois tratada com vapor de clorofórmio, como no item 3.3. Após este tratamento, foram feitos três poços distantes 5mm da colônia de *S. aureus* e em cada um dos poços foi acrescido 20μL de água esterilizada (controle), 20μL de protease de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, EUA) ou 20μL de α-quimiotripsina (Sigma-Aldrich, EUA). A placa foi incubada a 30°C por 2h para a difusão das enzimas. Em seguida, foram depositados sobre a placa, 7mL de ágar BHI semi-sólido (caldo BHI adicionado de 0,8% de ágar, p/v), inoculado a 1% (v/v) com cultura de 24h/37°C de *L. monocytogenes* previamente obtida em caldo BHI. A placa foi incubada a 37°C por 24h (Figura 9).

Ausência de zona de inibição próxima ao ponto de deposição de uma das proteases indicaria sensibilidade do inibidor à enzima e confirmaria que o inibidor era de natureza proteica.

Figura 9. Representação esquemática da técnica utilizada para avaliação do efeito da enzima proteolítica sobre a atividade inibitória de *S. aureus*.

3.3.3 Quantificação da atividade inibitória pelo método de diluição crítica

A quantificação da atividade inibitória de *S. aureus* pelo ensaio de diluição crítica foi realizada de acordo com Mayr-Harting, Hedges e Berkeley (1972) e expressa em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL), com modificações.

Em placa de ágar BHI foram colocados 7mL de ágar BHI semi-sólido (caldo BHI adicionado de 0,8% de ágar, p/v), previamente inoculado a 1% (v/v) com uma cultura de 24h/37°C de *L. monocytogenes* em caldo BHI.

Sobrenadantes de culturas de *S. aureus* tratados termicamente ou não (95°C por 15 minutos) foram centrifugados a 14000xg por 10 minutos a 4°C (Sorvall Legend Mach 1.6R, Sorvall, EUA), filtrados (0,22µm - GVWP, Millipore) e diluídos serialmente em placa de 96 poços com solução tampão fosfato 10mM, pH 7,0, nas proporções de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256. Em seguida, 10µL da amostra original (sem diluição) e de cada uma das diluições foram aplicados 5 vezes (com intervalos de 10 minutos entre cada aplicação, em um mesmo ponto) nas placas de ágar BHI previamente preparadas, totalizando 50µL para cada amostra e

suas respectivas diluições. Essas placas foram mantidas a 5°C/2h para permitir a absorção das amostras pelo ágar e em seguida incubadas por 24h a 37°C (Figura 10). A atividade inibitória foi expressa em UA/mL, considerando-se a recíproca da última diluição com inibição da multiplicação de *L. monocytogenes*, corrigida para 1mL.

Figura 10. Representação esquemática do ensaio para quantificação da atividade inibitória de *S. aureus* frente a *L. monocytogenes* pelo método de diluição crítica.

4.1 Avaliação da formação de biofilme por meio de técnicas de cultivo e microscopia de fluorescência

Para este trabalho foi considerado que houve formação de biofilme quando, no mínimo, 10^4 UFC de *L. monocytogenes* estavam aderidas por cm^2 na lâmina de aço inoxidável (GRAM et al., 2007). Nas imagens de microscopia de fluorescência foi considerada formação de biofilme quando era possível visualizar comunidades microbianas aderidas à lâmina de aço inoxidável, envolvidas por EPS.

Nos apêndices A e B estão mostrados respectivamente os resultados dos experimentos para enumeração das populações de *L. monocytogenes* aderidas às lâminas retangulares de aço inoxidável e das populações de *L. monocytogenes* livres no meio de cultura.

Nos apêndices C e D estão mostrados respectivamente os resultados dos experimentos para enumeração das populações de *L. monocytogenes* aderidas às lâminas circulares de aço inoxidável e das populações de *L. monocytogenes* livres no meio de cultura.

4.1.1 Sistema com agitação em frasco cilíndrico

A capacidade média de adesão de *L. monocytogenes* nas lâminas retangulares de aço inoxidável foi de 5,1 e 5,6 log de UFC/ cm^2 ao longo das 72h de incubação a 25°C e 37°C, respectivamente. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as temperaturas de incubação e entre as cepas testadas neste sistema (Figura 11).

Figura 11. Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) aderidas às lâminas de aço inoxidável a 25°C e 37°C durante 72h de incubação (log UFC/ cm^2), quando na imersas em caldo BHI. Lm= *L. monocytogenes*.

Com auxílio do corante laranja de acridina, nos estudos de microscopia de fluorescência foram observadas principalmente células isoladas de *L. monocytogenes* aderidas às lâminas retangulares de aço inoxidável durante 72h de incubação a 37°C em caldo BHI (Figura 12). Não foi constatada a presença de matriz extracelular, porém foi observada a presença de células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 alongadas após 48 e 72h de incubação (Figuras 12E e 12F, respectivamente).

Figura 12. Fotografias de *L. monocytogenes* aderida à lâmina de aço inoxidável corada com laranja de acridina após cultivo em caldo BHI a 37°C/72h. As setas indicam células alongadas e as barras indicam 10µm. Aumento de 40X, filtro de 450-490nm.

L. monocytogenes também foi cultivada na presença de sobrenadante de cultura de estafilococos, a fim de investigar uma possível interferência da termonuclease de *S. aureus* na adesão bacteriana à superfície de aço inoxidável. Desta forma, o sobrenadante de cultura de *S. epidermidis* ATCC 14490 foi usado apenas como controle, uma vez que esta cepa não é produtora de termonuclease.

Os resultados dos ensaios para quantificação de termonuclease indicaram que a enzima permaneceu estável (6.400 UA/mL) ao longo de 72h de incubação a 37°C (Figura 13).

Figura 13. Representação esquemática de ágar DNA – azul de toluidina após 24h de incubação em câmara úmida, ilustrando os orifícios correspondentes às diluições de 1/2 a 1/128 e halo cor de rosa brilhante $\geq 1\text{mm}$ até 1:64, que correspondia a 6.400 UA/mL.

A capacidade média de adesão de *L. monocytogenes* às lâminas de aço inoxidável quando na presença de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis* foi de 5,5 log UFC/cm², sendo pouco maior após 48h para *L. monocytogenes* IAL 366 ($p < 0,05$) e após 72h para *L. monocytogenes* ATCC 19115 ($p < 0,01$) em comparação com o controle (*L. monocytogenes* em cultura pura).

Na presença de sobrenadante de cultura de *S. aureus* com atividade de termonuclease (6.400 UA/mL), houve uma redução de 1,7 a 4,5 log UFC/cm² ($p < 0,001$) na adesão de *L. monocytogenes* à lâmina de aço inoxidável após 24h, quando comparada às células cultivadas em caldo BHI ou com sobrenadante de cultura de *S. epidermidis* (Figura 14A).

Figura 14. Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) cultivadas a 37°C/72h: (A) aderidas às lâminas de aço inoxidável; (B) livres no caldo de cultura. Lm= *L. monocytogenes*; Se= *S. epidermidis*; Sa= *S. aureus*.

Após 48h de incubação na presença da termonuclease, *L. monocytogenes* retomou a adesão, porém manteve uma população média de células aderida ainda reduzida ($p < 0,05$) quando comparada às células cultivadas na presença de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis*. Nesta mesma condição, houve menor ($p < 0,01$) adesão de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (4,6 UFC/cm²) em comparação com *L. monocytogenes* IAL 633 (6,3 UFC/cm²).

L. monocytogenes ATCC 19115, apresentou uma população média de 4,3 log UFC/cm² após 72h de incubação na presença de sobrenadante de cultura de *S. aureus*, enquanto *L. monocytogenes* IAL 633 declinou para 5,4 log UFC/cm² mantendo uma população maior ($p < 0,01$) do que quando cultivada apenas na presença de caldo BHI a 37°C.

O sobrenadante de cultura de *S. aureus* foi capaz de manter reduzida a população média de *L. monocytogenes* livre no meio de cultivo por até 72h (7,9 log UFC/mL), quando comparada aos controles, com população média de 8,8 log UFC/mL. A maior diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) foi observada após 24h de incubação na presença de caldo contendo termonuclease, com redução média de 2,4 log da população livre, em comparação com os controles. Apesar de *L. monocytogenes* ATCC 19115 ter apresentado uma população livre maior ($p < 0,001$) que *L. monocytogenes* IAL 633 após 24h na presença de caldo contendo termonuclease, houve redução após 48 e 72h de incubação ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente), com relação às células livres cultivadas somente em caldo BHI. No entanto, a população de *L. monocytogenes* IAL 633 livre permaneceu reduzida ($p < 0,01$) até 48h (Figura 14B).

4.1.2 Sistema com agitação em microplaca

A capacidade média de adesão de *L. monocytogenes* nas lâminas circulares de aço inoxidável foi de 6,7 e 6,8 log UFC/cm² a 37°C e a 25°C, respectivamente. *L. monocytogenes* IAL 633 apresentou uma maior ($p < 0,05$) adesão à superfície de aço inoxidável a 37°C (7,0 log UFC/cm²) do que a 25°C (6,3 log UFC/cm²) após 24h de incubação, enquanto *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderiu mais ($p < 0,001$) a 25°C (7,4 log UFC/cm²) do que a 37°C (6,2 log UFC/cm²) após 72h. Quanto à diferença entre as cepas, foi constatado que *L. monocytogenes* ATCC 19115 apresentou contagens superiores a *L. monocytogenes* IAL 633, após 24h ($p < 0,05$) e 72h ($p < 0,01$) de incubação somente a 25°C (Figura 15A). As populações livres de listerias no caldo atingiram 8,8 e 9,2 UFC/mL ao longo das 72h de incubação, a 37°C e 25°C, respectivamente (Figura 15B).

Figura 15. Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) cultivadas em caldo BHI: (A) aderidas às lâminas de aço inoxidável; (B) livres no caldo de cultura, a 25°C e 37°C durante 72h de incubação. Lm= *L. monocytogenes*.

De um modo geral, as duas cepas de *L. monocytogenes* testadas formaram biofilme nas lâminas circulares de aço inoxidável a 37°C e a 25°C, durante 72h de incubação em microplaca. Primeiramente, as lâminas coradas por laranja de acridina foram submetidas à microscopia de fluorescência, utilizando filtro de excitação de 450-490nm, permitindo máxima absorção da luz e emissão a 650nm (vermelho). Desta forma, após 24h de incubação, foi observado um predomínio de células isoladas ou formando pequenos grupamentos celulares aderidos à lâmina, com presença de EPS (Figura 16A). A partir de 48h, as células passaram a se organizar em camadas, formando um mosaico, de forma que a EPS já não podia mais ser

visualizada (Figura 16B). Após 72h foram observadas estruturas em terceira dimensão características de biofilmes maduros, com canais para fluxo de nutrientes e excretas (Figura 16C) e áreas de grande densidade celular com pontos vazios característicos de dispersão celular (Figura 16D).

Figura 16. Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina. (A) Células isoladas e pequenos grupamentos aderidos à superfície por meio da EPS após 24h; (B) Início da organização em camadas após 48h; (C) e (D) canais e ponto de dispersão celular após 72h, respectivamente. As barras indicam 10µm. Aumento de 100X com óleo de imersão, filtro de 450-490nm.

As lâminas coradas por laranja de acridina também foram submetidas à microscopia de fluorescência com filtro de excitação de 510-560nm, a fim de diferenciar a marcação dos ácidos nucleicos, DNA e RNA. Foi possível observar a presença de EPS corada em verde, indicando a presença de DNAe, além de células metabolicamente ativas (ricas em RNA) coradas em laranja. A presença de matriz era pequena, com aspecto de gel viscoso (do inglês, “*slime*”) formando uma “rede em forma de malha” (do inglês, “*Network of Knitted Chains*”), visível predominantemente em locais com células isoladas ou com pouco aglomerado celular (Figura 17).

Figura 17. Fotografia de biofilme de *L. monocytogenes* IAL 633 após 24h a 37°C (A) e a 25°C (B) sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina. A marcação em verde representa o DNAe da matriz formada por uma rede extracelular polimérica e a marcação laranja representa as células metabolicamente ativas (ricas em RNA) isoladas ou formando pequenos grupamentos celulares. A barra indica 10µm. Aumento de 40X, filtro de 510-560nm.

A maioria das células aderidas à superfície das lâminas, ao longo das 72h de incubação, tanto a 25°C quanto a 37°C, estava metabolicamente ativa. No entanto, a presença de DNAe foi mais abundante em biofilmes formados a 37°C do que a 25°C (Figuras 17, 18 e 19).

Figura 18. Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C. As barras indicam 10µm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm.

Figura 19. Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 25°C. As barras indicam 10µm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm.

Na presença de sobrenadante de cultura de *S. aureus* com atividade de termonuclease (6.400 UA/mL) as populações de *L. monocytogenes* aderidas às lâminas de aço inoxidável (Figura 20A) após 24h foram menores que as populações cultivadas somente em caldo BHI ou na presença de sobrenadante de cultura de *S.*

epidermidis, mas após 48 e 72h de incubação, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Quanto à população livre no meio de cultivo (Figura 20B) foi possível observar uma inibição de até 4,3 ciclos logarítmicos ao longo das 48h de incubação na presença de caldo contendo termonuclease, sendo que a maior diferença ($p < 0,001$) estatística significativa para ambas as cepas ocorreu após 6h de incubação.

Figura 20. Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) aderidas às lâminas de aço inoxidável em log UFC/cm² (A), e presente no efluente em log UFC/mL (B) a 37°C durante 72h de incubação, quando na presença de caldo BHI; caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* ou *S. epidermidis*. Lm= *L. monocytogenes*; Se= *S. epidermidis*; Sa= *S. aureus*.

Se for considerado que há formação de biofilme quando a população aderida é maior ou igual a 4,0 log UFC/cm², então o sobrenadante de cultura de *S. aureus* não foi capaz de inibir a formação de biofilme por *L. monocytogenes* nas primeiras 24h de incubação a 37°C. No entanto, nas imagens de microscopia de fluorescência foi observada uma redução significativa da quantidade de matriz extracelular e de células aderidas à superfície (Figura 21) quando comparada àquela formada após 24h em caldo BHI (Figura 18) ou na presença de sobrenadante de *S. epidermidis* (Figura 22). As imagens também mostraram que houve um restabelecimento na formação de biofilme após 48h de incubação na presença da termonuclease, sendo que *L. monocytogenes* ATCC 19115 demorou mais para se reestruturar quando comparada aos controles.

A atividade de termonuclease também foi monitorada neste sistema e o resultado obtido foi de 6.400 UA/mL ao longo das 72h de incubação, como também observado para o sistema de agitação em frasco cilíndrico.

Figura 21. Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C, quando na presença de sobrenadante de cultura de *S. aureus*. As barras indicam 10µm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm.

Figura 22. Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C, quando na presença de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis*. As barras indicam 10µm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm.

L. monocytogenes foi cultivada na presença de enzimas comerciais, DNase I bovina e nuclease micrococcal de *S. aureus*, a fim de confirmar ou excluir a hipótese inicial de que a termonuclease poderia interferir na formação de biofilme por *L.*

monocytogenes por meio da degradação do DNAe. Não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as populações de *L. monocytogenes* cultivadas na presença de ambas as enzimas, em comparação com os resultados em caldo BHI. A média de células aderidas às lâminas de aço inoxidável e livres no meio de cultura foi de 6,6 log UFC/cm² (Figura 23A) e 8,8 log UFC/mL (Figura 23B), respectivamente, ao longo das 72h de incubação em todas as condições. Deste modo, foi evidenciado que tanto a DNase I bovina como a nuclease micrococcal de *S. aureus* não interferiram com a formação de biofilme por *L. monocytogenes* e não inibiram as células do livres no caldo.

Figura 23. Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) cultivadas a 37°C/72h: (A) aderidas às lâminas de aço inoxidável; (B) livres no caldo de cultura. Lm= *L. monocytogenes*; NUC= nuclease micrococcal de *S. aureus*.

Nas imagens de microscopia de fluorescência foi possível observar que mesmo na presença das enzimas comerciais degradantes de DNA, ambas as cepas de *L. monocytogenes* foram capaz de formar biofilme contendo DNAe na EPS e houve predomínio de células metabolicamente ativas (ricas em RNA) aderidas às lâminas de aço inoxidável ao longo das 72h de incubação (Figuras 24 e 25).

Figura 24. Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C, quando na presença de caldo BHI acrescido de nuclease micrococal de *S. aureus*. As barras indicam 10μm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm.

Figura 25. Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* observados sob microscopia de fluorescência, em lâminas de aço inoxidável coradas por laranja de acridina, após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C, quando na presença de caldo BHI acrescido de DNase I bovina. As barras indicam 10μm. Aumento de 20X, filtro de 510-560nm.

4.2 Avaliação da formação de biofilme por microscopia confocal a laser

Os resultados da avaliação da formação de biofilme por CLSM mostraram que *L. monocytogenes* aderiu e formou biofilme após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C em sistema estático. Além disso, a quantificação da biomassa (Tabela 1) revelou uma média de $4,0 \times 10^{-3}$ UF/μm³ ao longo do tempo de incubação.

Tabela 1. Resultados de quantificação de biomassa ($\text{UF}/\mu\text{m}^3 \times 10^{-3}$) de biofilme de *L. monocytogenes*, obtidos a partir de CLSM. Sistema estático, com caldo BHI, 72h/37°C.

Horas	Experimento 1		Experimento 2		Média	Desvio Padrão
24	2,57	2,76	3,08	4,39	3,2	0,82
48	4,99	6,17	2,39	2,84	4,09	1,78
72	2,30	4,26	6,87	5,39	4,70	1,92

Para visualização do biofilme de *L. monocytogenes* em microscópio confocal, foram utilizados os corantes SYTO 9 para marcar o DNA das células viáveis (verde) e o DDAO para marcar o DNA de células não viáveis (vermelho) e o DNAe presente na matriz polimérica.

Após 24h de incubação a 37°C em caldo BHI, foi observado um predomínio de células viáveis envolvidas por DNAe, isoladas ou formando microcolônias (Figura 26A), que eram coradas em amarelo, devido à sobreposição dos corantes: DDAO – corando DNAe e SYTO 9 – corando célula viável. Este resultado foi obtido pela observação das imagens separadamente com dois filtros diferentes e posterior sobreposição. Após 48 e 72h, havia um predomínio de células viáveis (em verde) formando camadas homogêneas, sendo o DNAe observado apenas em locais com ausência de células, como em pontos característicos de dispersão celular (Figuras 26B e 26C).

Na presença de sobrenadante de cultura de *S. aureus*, a formação de biofilme por *L. monocytogenes* foi menor, principalmente após 24h de incubação, com uma redução significativa ($p < 0,001$) da biomassa (Tabela 2), quando comparada ao controle (Figura 27). Nas imagens de CLSM, foram observadas células viáveis aderidas à superfície, porém de forma isolada ou em pequenos grupamentos, com ausência de DNAe (Figura 26D). Após 48 e 72h de incubação *L. monocytogenes* restabeleceu a formação de biofilme, porém o DNAe continuou ausente (Figuras 26E e 26F).

Figura 26. Fotografias de biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 observados sob CLSM, em superfície de borosilicato após 24, 48 e 72h de incubação a 37°C, quando na presença de caldo BHI ou caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus*. As células viáveis foram coradas em verde pelo SYTO 9; as não viáveis e o DNAe da EPS em vermelho pelo DDAO. A sobreposição dos corantes permite a visualização do DNAe circundando as células viáveis (amarelo). As linhas em vermelho indicam o corte da imagem nos eixos x e y, possibilitando à visualização ortogonal correspondente à profundidade (z). (A) z = 5,79μm; (B) z = 2,9μm; (C) z = 4,28μm; (D) z = 1,93μm; (E) z = 2,9μm e (F) z = 3,02μm. As barras indicam 20μm. Aumento de 63X com óleo de imersão.

Tabela 2. Resultados da quantificação da biomassa ($\text{UF}/\mu\text{m}^3 \times 10^{-3}$) de biofilme de *L. monocytogenes* formado em sistema estático, quando na presença de caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* após 72h/37°C.

Horas	Experimento 1		Experimento 2		Média	Desvio Padrão
24	1,05	1,11	1,00	0,70	0,96	0,18
48	2,56	3,64	2,70	3,44	3,08	0,53
72	4,80	4,76	3,36	4,12	4,26	0,67

Figura 27. Biomassa ($\text{UF}/\mu\text{m}^3$) de biofilme de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a), quando na presença de caldo BHI ou caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* após 72h/37°C. Lm = *L. monocytogenes*; SA = sobrenadante de cultura de *S. aureus*.

4.3 Avaliação da atividade inibitória de *S. aureus* frente a *L. monocytogenes* em ágar

No teste de antagonismo direto em ágar houve formação de uma zona límpida de inibição (5mm) em volta da colônia de *S. aureus*, com *L. monocytogenes* ATCC 19115 como indicador (Figura 28A). Um halo do mesmo tamanho, porém opaco, foi observado no teste de antagonismo quando foi utilizada *L. monocytogenes* IAL 633 como indicador (Figura 28B).

A substância inibitória produzida por *S. aureus* apresentou sensibilidade às enzimas proteolíticas testadas, indicando que a sua natureza era proteica (Figura 28C). Também foi termoestável, pois a atividade inibitória sobre *L. monocytogenes* ATCC 19115 (160UA/mL) e sobre *L. monocytogenes* IAL 633 (20UA/mL), permaneceu estável, independentemente do tratamento térmico empregado. Além disso, nenhuma zona lítica foi formada a partir do homogeneizado preparado a partir do ágar da zona de inibição do teste de antagonismo direto, excluindo a inibição por bacteriófagos líticos.

Figura 28. Fotografias do teste de antagonismo direto. (A) Halo límpido de inibição em volta da colônia de *S. aureus*, quando utilizada *L. monocytogenes* ATCC 19115 como indicador; (B) halo opaco de inibição em volta da colônia de *S. aureus*, quando utilizada *L. monocytogenes* IAL 633 como indicador; e (C) Avaliação da natureza proteica, mostrando degradação do halo de inibição pelas enzimas protease de *Streptomyces griseus* e α -quimiotripsina.

A diferença entre adesão celular e formação de biofilme tem sido amplamente discutida na literatura e as definições mais aceitas baseiam-se nas quantidades de células aderidas à superfície estudada, na observação microscópica da disposição destas células na superfície e na avaliação da presença de matriz polimérica extracelular.

L. monocytogenes adere facilmente a superfícies abióticas, porém não é capaz de formar biofilmes proeminentes quando comparada a outras bactérias Gram-positivas (BRIDIER et al., 2010). No presente estudo, *L. monocytogenes* aderiu à superfície de aço inoxidável em média 10^5 a 10^6 UFC/cm². Outros estudos com listeria utilizando a mesma superfície de contato apontam uma média de adesão semelhante, entre 10^4 e 10^7 UFC/cm² (LUNDÉN et al., 2000; RATTI, 2006; GRAM et al., 2007; WINKELSTRÖTER, 2008; POIMENIDOU et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

Quando *L. monocytogenes* foi cultivada em frasco cilíndrico, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na capacidade de adesão às lâminas de aço inoxidável a 25°C e a 37°C durante as 72h de incubação, para as duas cepas testadas. As fotografias obtidas por microscopia de fluorescência revelaram que neste sistema não houve formação de biofilme com presença de EPS, apenas foram visualizadas células isoladas aderidas à superfície de aço inoxidável.

Ratti (2006) e Oliveira et al. (2010), utilizando um modelo experimental similar ao do presente estudo (sistema de agitação em frasco cilíndrico) observaram por MEV, que *L. monocytogenes* aderiu às lâminas de aço inoxidável predominantemente de forma isolada a 30°C/24h e a 37°C/144h em meio BHI e *Tryptone Soya Broth* (TSB), respectivamente. Oliveira et al. (2010), constataram células em divisão binária após 3h de incubação, porém a presença de microcolônias e a produção de EPS foram observadas somente após 240h a 37°C.

Segundo Kalmokoff et al. (2001) e Moretro e Langsrud (2004), *L. monocytogenes* é capaz de aderir rapidamente à superfície de aço inoxidável, no entanto pode necessitar de um longo período para formar biofilme.

Neste trabalho, através da microscopia de fluorescência das lâminas retangulares de aço inoxidável também foi constatada a presença de células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 alongadas após 48 e 72h de incubação, indicando uma provável adaptação a condições de estresse.

Ratti et al. (2010), utilizando a mesma cepa de *L. monocytogenes* (ATCC 19115), observaram a presença de células alongadas em biofilmes formados na presença de sacarose e de *Leuconostoc mesenteroides* A11 produtor de bacteriocina.

De acordo com Rowan et al. (2000) a formação de células alongadas por *L. monocytogenes* pode ocorrer espontaneamente, em função de uma mutação no gene responsável pela síntese de uma proteína extracelular denominada p60. A diminuição na produção da p60 leva a modificações celulares em que o septo entre as células em divisão é formado, mas as células não se separam. Além disso, estas células de listeria atípicas apresentam uma menor capacidade de aderir e invadir células de mamíferos. No entanto, células alongadas podem apresentar alto potencial de contaminação de alimentos, devido à habilidade de adaptação a condições subsequentes de estresse, multiplicando-se rapidamente quando transferidas para uma condição favorável (HAZELEGER; DALVOORDE; BEUMER, 2006).

Estudos mais recentes apontam uma relação entre a formação de células alongadas de *L. monocytogenes* e o uso de sistemas de cultivo com fluxo contínuo (RIEU et al., 2008a; VAN DER VEEN; ABEE, 2010). Van der veen e Abee (2010) demonstraram que quando *L. monocytogenes* foi cultivada em sistema de fluxo contínuo, a expressão de genes relacionados com a divisão celular e a síntese da parede celular estavam diminuídas, de forma que este padrão de expressão resultava em alongamento das células e prevenção da divisão celular.

De acordo com Rieu et al. (2008a), em sistema estático de cultivo, a morfologia das células de *L. monocytogenes* consistia em pequenos bacilos, semelhantes as células na forma planctônica. No entanto, em sistema de fluxo contínuo, encontrado em tubulações industriais, por exemplo, a população de *L. monocytogenes* em biofilme consistia em uma densa rede de células alongadas e microcolônias em forma de bola.

Neste trabalho, diferentemente do frasco cilíndrico, quando cultivada em microplaca, *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) apresentou uma maior ($p < 0,05$) adesão à superfície de aço inoxidável a 37°C do que a 25°C após 24h de incubação, enquanto *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) aderiu mais ($p < 0,001$) a 25°C do que a 37°C após 72h. Entre as cepas foi observado que o sorotipo

4b apresentou maior adesão que o sorotipo 1/2a, após 24h ($p < 0,05$) e 72h ($p < 0,01$) de incubação somente a 25°C.

De acordo com Chavant et al. (2002), modificações na membrana celular de *L. monocytogenes* podem ocorrer com a variação da temperatura e da fase de crescimento. Estas modificações na membrana não influenciam na carga global da bactéria, a qual permanece sempre eletronegativa, no entanto podem influenciar na capacidade de adesão a superfícies abióticas. Em baixas temperaturas, por exemplo, a hidrofobicidade celular aumenta, tornando a colonização de superfícies hidrofóbicas (aço inoxidável e plástico) mais difícil ou até mesmo impossível.

A temperatura ótima para a adesão de *L. monocytogenes* a superfícies hidrofóbicas é de 37°C (MOLTZ; MARTIN, 2005; MAI; CONNER, 2007; Di BONAVENTURA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009), mas a expressão de flagelos a 20-25°C pode ser um fator adicional para a estabilidade da adesão, por facilitar o contato com o substrato através da superação de forças de repulsão eletrostática (CHAVANT et al., 2002). Alguns autores demonstraram que os flagelos de *L. monocytogenes*, bem como a motilidade por eles conferida pode contribuir para os diferentes estágios de formação de biofilmes em superfícies inertes (VATANYOOPAISARN et al., 2000; LEMON; HIGGINS; KOLTER, 2007; KUMAR et al., 2009). Porém, esta relação ainda é contraditória, uma vez que a adesão pode acontecer de forma passiva ou ser determinada por outras modificações da membrana celular, ainda desconhecidas (DJORDJEVIC; WIEDMANN; McLANDSBOROUGH, 2002; TRESSE et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2010). Kalmokoff et al. (2001), Hefford et al. (2005) e Zameer et al. (2010), por exemplo, com auxílio da MEV descreveram a presença de fibrilas estendendo-se da superfície de células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície abiótica. Estas estruturas, semelhante a fímbrias, estavam presentes nas cepas mais aderentes, mediava a adesão à superfície e conectava as células entre si.

Os resultados obtidos no presente estudo foram consistentes com vários outros encontrados na literatura, que observaram uma variação na formação de biofilme entre as cepas de *L. monocytogenes*, de acordo com as condições de incubação e sistema de estudo utilizados (BORUCKI et al., 2003; FOLSOM; SIRAGUSA; FRANK, 2006; HARVEY; KEENAN; GILMOUR, 2007; Di BONAVENTURA et al., 2008; PAN; BREIDT; KATHARIOU, 2009; NILSSON; ROSS; BOWMAN, 2011).

Alguns autores discutem que a maior capacidade de adesão entre as cepas de listeria pode estar relacionada à persistência das mesmas, podendo haver uma correlação entre a filogenia e a habilidade em formar biofilmes, mas não há consenso (DJORDJEVIC; WIEDMANN; McLANDSBOROUGH, 2002; BORUCKI et al., 2003; PAN; BREIDT; GORSKI, 2010). Djordjevic; Wiedmann e McLandsborough (2002) observaram que as cepas de *L. monocytogenes* pertencentes à linhagem I (sorotipos 1/2b e 4b) produziam mais biofilme do que as cepas da linhagem II (sorotipos 1/2a e 1/2c), porém Borucki et al. (2003) relataram exatamente o oposto. Pan, Breidt e Gorski (2010) observaram que o sorotipo 1/2a geralmente forma biofilmes mais densos do que o sorotipo 4b em várias condições de incubação. No entanto, o sorotipo 4b apresenta maiores taxas de crescimento do que o sorotipo 1/2a, sugerindo que a taxa de crescimento pode não estar diretamente relacionada à capacidade de formação de biofilme.

No presente estudo, a média da população bacteriana livre no meio de cultivo foi maior a 25°C do que a 37°C para ambas as cepas cultivadas em microplaca, no entanto não foi constatada uma correlação entre a população aderida e a planctônica. Isso confirma a complexidade existente na transição da forma livre para a sésil e vice-versa, a qual parece ser regulada por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos e que promovem alterações no estado fisiológico da bactéria quando em comunidade, comparada ao estado planctônico (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

Trémoulet et al. (2002) mostraram que a proteômica de *L. monocytogenes* foi significativamente influenciada pela formação de biofilme quando comparada ao estado planctônico e provaram que genes específicos podem ser induzidos nestas condições. Cerca de 30 proteínas detectadas por eletroforese em gel foram diferencialmente sintetizadas por *L. monocytogenes* quando em biofilme. Destas proteínas, nove foram identificadas e estavam implicadas em várias funções celulares como metabolismo central, estresse oxidativo, *quorum sensing*, multiplicação celular e produção de flagelos. Desta forma, os autores concluíram que o fenótipo do biofilme pode resultar de padrões complexos de regulação gênica.

Apesar do inóculo inicial (7,0 log UFC/mL) e das condições de incubação terem sido iguais para ambos os sistemas de agitação utilizados no presente estudo, houve uma diferença de aproximadamente 1,4 log UFC/cm² na capacidade de adesão de *L. monocytogenes* às lâminas de aço inoxidável acondicionadas na

microplaca e no frasco cilíndrico. Na microplaca, as lâminas circulares ficavam dispostas horizontalmente no fundo dos poços, o que provavelmente permitia a deposição bacteriana pela ação da gravidade, mesmo sob agitação orbital. No frasco cilíndrico, as lâminas retangulares ficavam dispostas verticalmente sobre uma base de aço inoxidável e a agitação era promovida por uma barra magnética, a fim de evitar a deposição bacteriana. Além disso, o frasco cilíndrico pode ter oferecido uma maior superfície de contato, o que pode ter limitado a adesão bacteriana às lâminas de aço inoxidável, já que *L. monocytogenes* também possui a capacidade de aderir a superfícies plásticas.

De acordo com Chae et al. (2000) o tipo de sistema de cultivo utilizado no estudo de biofilmes pode influenciar diretamente na adesão bacteriana à superfície e também na organização estrutural da mesma. Os autores observaram que em sistemas estáticos, as bactérias aderem à superfície, mas têm pequena interação com a EPS, porque elas não estão sob a ação constante de força de cisalhamento como ocorre em sistemas de fluxo contínuo, que mantêm as células mais fortemente aderidas.

Kalmokoff et al. (2001) cultivaram cepas de listeria em microplacas contendo lâminas de aço inoxidável imersas em caldo BHI por até 72h a 21°C, sob agitação. Os resultados apontaram uma persistência na adesão ao longo do tempo de incubação com distribuição irregular das células sobre a superfície e presença de poucos grupamentos celulares, em concordância com Oliveira et al. (2010). No presente estudo, contudo, diferentemente da organização estrutural observada nas lâminas de aço inoxidável acondicionadas em sistema cilíndrico, nas lâminas acondicionadas em microplaca foi observado, sob microscopia de fluorescência, a formação de densos biofilmes por *L. monocytogenes*. Foi ainda constatada a presença de EPS contendo DNAe mediando a adesão abundante de células de *L. monocytogenes* metabolicamente ativas (ricas em RNA) à superfície, após 24, 48 e 72h de incubação, tanto a 25°C quanto a 37°C.

A presença de EPS pode ser visualizada como um gel tridimensional associado às células do biofilme sob microscopia de fluorescência (Figura 17). No entanto, na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, a visualização de biofilme de *L. monocytogenes* foi feita com auxílio de MEV, que exige uma etapa de desidratação da amostra e pode comprometer a preservação estrutural da EPS (KALMOKOFF et al., 2001; CHAVANT et al., 2002; TRÉMOULET et al., 2002;

BORUCKI et al., 2003; HEFFORD et al., 2005; MOLTZ; MARTIN, 2005; GAMBLE; MURIANA, 2007; MAI; CONNER, 2007; BONAVENTURA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; ZAMEER et al., 2010; NILSSON; ROSS; BOWMAN, 2011).

Marsh, Luo e Wang (2003), foram os autores que descreveram a arquitetura do biofilme de *L. monocytogenes* mais compatível com a observada no presente estudo, quando utilizado o sistema sob agitação em microplaca (Figuras 16 e 17). Aqueles autores estudaram três cepas de listeria e encontraram uma característica estrutural comum entre os biofilmes formados, observados através de MEV. Foi relatada a ocorrência de uma estrutura denominada “favo de mel”, composta por células empilhadas uma sobre as outras, em arranjo perimetral, margeando espaços ociosos, com EPS aparentemente viscosa ancorando as células nas suas posições. Segundo Marsh, Luo e Wang (2003), os canais vazios teriam função de transportar água, nutrientes e excretas.

De acordo com o melhor de nosso conhecimento, o presente estudo é pioneiro na utilização do corante DDAO para marcação do DNAe em biofilme de *L. monocytogenes*. Nas imagens obtidas por CLSM, foi constatada a presença de DNAe envolvendo células isoladas ou em microcolônias, principalmente após 24h a 37°C. Após 48 e 72h, *L. monocytogenes* formou camadas homogêneas de células e o DNAe era visível apenas em pontos característicos de dispersão celular (sem células). A espessura máxima do biofilme de *L. monocytogenes* (5,79µm) foi encontrada após 24h de incubação e pode ser atribuída ao relevo de microcolônias (Figura 26).

Poucos estudos utilizando CLSM foram realizados para observar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* (CHAE; SCHRAFT, 2000; RIEU et al., 2008a; HARMSSEN et al., 2010; BRIDIER et al., 2010). Chae e Schraft (2000) foram os pioneiros e, como no presente estudo, descreveram a formação de camadas homogêneas de células em superfície de vidro, porém coradas por laranja de acridina. Já Harmsen et al. (2010) e Bridier et al. (2010), com auxílio do corante SYTO 9, mostraram uma distribuição irregular das células de *L. monocytogenes* em superfície abiótica, com formação de microcolônias e monocamadas de espessura variável, com no máximo de 16,4µm de espessura, após 4 dias de incubação a 37°C em sistema de fluxo contínuo.

Dominiak, Nielsen e Nielsen (2011) relataram que a quantidade de DNAe envolvendo as células bacterianas em biofilmes pode ser mais de 10 vezes superior à quantidade de DNA genômico e observaram ainda que o DNAe geralmente era

encontrado em proximidade com as células vivas em microcolônias, como observado no presente trabalho. Aqueles autores sugeriram que a maior parte do DNAe é ativamente secretado ou originado por lise de uma subpopulação de células.

Harmsen et al. (2010), através de métodos moleculares demonstraram pela primeira vez a presença do DNAe em biofilme de *L. monocytogenes*. Os autores também provaram que a origem do DNAe era cromossômica e que este ácido nucleico exercia função fundamental na adesão inicial de *L. monocytogenes* a superfícies abióticas. No entanto ainda não se sabe como o DNAe é liberado para o meio extracelular por listeria.

Nas figuras 16 e 26 deste trabalho, estruturas ocas podem ser sugestivas de dispersão celular, encontradas principalmente após dois dias de incubação, tanto a 25°C quanto a 37°C, em áreas de grande densidade celular. Resultados semelhantes foram descritos em biofilmes de outros patógenos, tais como, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, e *B. cereus*. O desprendimento de células a partir de biofilmes maduros parece ser regulado pelo sistema de *quorum sensing* (ABEE et al., 2010). Além disso, pode estar intimamente relacionado com a busca de outros nichos para colonizar, em decorrência da depleção de nutrientes, ou ainda pode ocorrer em função da força de cisalhamento em sistemas de fluxo contínuo (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005).

Ma et al. (2009) constataram que nos estágios tardios de formação de biofilme por *P. aeruginosa*, buracos sugestivos de dispersão celular se encontravam desprovidos de exopolissacarídeos, no entanto uma grande concentração de células mortas (com membrana celular comprometida) e DNAe estavam presentes no local, sugerindo que a lise celular poderia desempenhar papel importante na formação de cavidades em biofilmes maduros. Além disso, os autores observaram que as mesmas cavidades também apareciam ocupadas por numerosas células móveis, indicando que a motilidade pode ser um fator importante na dispersão e no estabelecimento de novos biofilmes.

Considerando a recente descoberta da importância do DNAe para a adesão inicial e formação de biofilme por *L. monocytogenes* (HARMSEM et al., 2010) e a hipótese de que a termonuclease de *S. aureus* poderia ser utilizada na inibição da formação de biofilmes microbianos (TANG et al., 2011), neste trabalho foi avaliada a capacidade do sobrenadante de cultura de *S. aureus* com atividade de termonuclease, bem como das enzimas comerciais nuclease micrococcal de *S. aureus* e DNase I bovina, de inibir a formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

Nossos resultados mostraram uma redução da população de *L. monocytogenes* livre no meio de cultura e aderida à lâmina de aço inoxidável principalmente após 6h e 24h de incubação a 37°C, respectivamente, na presença do sobrenadante de cultura de *S. aureus* com atividade de termonuclease. Também uma redução na produção EPS após 24h de incubação, seguida de um restabelecimento da formação de biofilme após 48h foi observado por microscopia de fluorescência. Já a CLSM revelou uma redução significativa ($p < 0,001$) da biomassa após 24h, seguida de um restabelecimento após 48h. No entanto, na presença das DNAses comerciais não foi observada interferência na formação de biofilme por *L. monocytogenes*. Além disso, não foi constatada uma correlação entre a atividade de termonuclease (6.400UA/mL) e a redução da capacidade de adesão de *L. monocytogenes* à superfície de aço inoxidável.

Diferentemente do que foi observado no presente trabalho, Harmsem et al. (2010) obtiveram resultados positivos quanto ao uso de DNase I bovina sobre a formação de biofilme por *L. monocytogenes*. Os autores observaram que a adição precoce de DNase I ao meio de cultivo possuía efeitos pronunciáveis sobre a adesão e subsequente estabilidade do biofilme de listeria. A adição de DNase I até 24h após a incubação preveniu completamente a formação de biofilme por *L. monocytogenes* e removeu as estruturas celulares pré-existentes em superfícies de microplacas de poliestireno. Após 24h e 48h, a capacidade da DNase I de remover biofilmes diminuiu. Segundo os autores, outros fatores além do DNAe podem estabilizar o biofilme de *L. monocytogenes*.

Neste trabalho, testes de antagonismo em ágar revelaram a produção de uma substância proteica e termoestável por *S. aureus*, com atividade inibitória frente a *L. monocytogenes*.

Alguns estudos têm demonstrado a capacidade que cepas de estafilococos possuem em inibir a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* quando em co-cultura (LERICHE; CARPENTIER, 2000; NORWOOD; GILMOUR, 2001; CARPENTIER; CHASSAING, 2004). Entretanto, outros autores observaram um aumento na formação de biofilmes por *L. monocytogenes* ou uma interação sinérgica entre as cepas, como por exemplo, quando na presença da cepa de *S. aureus* CIP 53.156 e *S. epidermidis* RP62A, respectivamente (RIEU et al., 2008b; ZAMEER; KREFT; GOPAL, 2010).

Leriche e Carpentier (2000) observaram que *S. sciuri* foi capaz de prevenir a adesão de *L. monocytogenes* à superfície de aço inoxidável durante três dias de incubação em co-cultura, modificando também o balanço entre a população bacteriana livre e na forma de biofilme. A hipótese foi de que polissacarídeos extracelulares produzidos por *S. sciuri* em biofilme poderiam causar tal inibição, além da competição por nutrientes. Em contrapartida, Carpentier e Chassaing (2004) não encontraram relação entre a capacidade de *S. sciuri* produzir polissacarídeos e de inibir *L. monocytogenes*, quando em co-cultura.

Norwood e Gilmour (2001) também observaram uma inibição na formação de biofilme por *L. monocytogenes* quando na presença de *S. xylosus* DP5H, sugerindo além da competição entre as cepas, a produção de substâncias antagonistas. Estas já haviam sido identificadas e caracterizadas parcialmente por Villani et al. (1997) para *S. xylosus* 1E (isolado de salame). À semelhança do que foi observado no presente trabalho, Villani et al. (1997) relataram que o inibidor foi termoestável e adicionalmente, determinaram o tamanho entre 2,5 e 8,1kDa.

Em contraste com estudos anteriores e com o presente trabalho, Rieu et al. (2008b) observaram que a formação de biofilme por *L. monocytogenes* EDG-e em superfície de aço inoxidável aumentou quando na presença da cultura ou do sobrenadante de cultura de *S. aureus* CIP 53.156. Quando tratado com proteinase K, o efeito positivo do sobrenadante foi neutralizado, enquanto que o tratamento térmico (100°C por 15 minutos) e a ultrafiltração (em membrana de 3kDa) não alteraram o efeito positivo sobre *L. monocytogenes*. Segundo Rieu et al. (2008b), isso apontou que peptídeos presentes no sobrenadante de cultura de *S. aureus* CIP 53.156 poderiam estar envolvidos na estimulação da formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

A inibição da formação de biofilme por *L. monocytogenes* quando na presença de estafilococos ou de seus produtos, pode estar associada à ação de uma variedade de substâncias antimicrobianas reconhecidamente produzidas por bactérias deste gênero, como enzimas bacteriolíticas, polipeptídeos de alto peso molecular e bacteriocinas (LERICHE; CARPENTIER, 2000; NORWOOD; GILMOUR, 2001; CARPENTIER; CHASSAING, 2004; BRITO; SOMKUTI; RENYE, 2011). Portanto, são necessários mais estudos, a fim de caracterizar os possíveis componentes envolvidos na redução da população de *L. monocytogenes* na sua forma planctônica ou em biofilme quando na presença de sobrenadante de cultura de *S. aureus*.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A temperatura de incubação pode influenciar na adesão de *L. monocytogenes* à superfície de aço inoxidável, porém devem ser considerados outros fatores em conjunto, como a cepa bacteriana e o tipo de sistema de cultivo utilizado.
- A arquitetura do biofilme de *L. monocytogenes* observada por microscopia de fluorescência mostrou a formação de biofilmes maduros tanto a 25°C quanto a 37°C, com produção de EPS contendo DNAe e predomínio de células metabolicamente ativas, além de canais para fluxo de nutrientes e cavidades características de dispersão celular.
- Com o uso de combinação dos corantes SYTO 9 e DDAO para observar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* sob CLSM, foi constatada a formação de microcolônias e de camadas homogêneas pouco espessas de células viáveis. O DNAe foi observado envolvendo as células após 24h de incubação e em locais com ausência de células, característicos de dispersão celular, após 48 e 72h de incubação a 37°C.
- O sobrenadante de cultura de *S. aureus* com atividade de termonuclease foi capaz de inibir *L. monocytogenes* livre ou aderida à superfície de aço inoxidável, principalmente após 24h de incubação a 37°C.
- As enzimas comerciais degradantes de DNA (nuclease micrococcal de *S. aureus* e DNase I bovina) não interferiram na formação de biofilme por *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável. Deste modo, é improvável que a termonuclease de *S. aureus* tenha sido responsável pela inibição da formação de biofilme por *L. monocytogenes*.
- Foi constatada a produção de uma proteína termoestável por *S. aureus*, capaz de inibir *L. monocytogenes* em teste de antagonismo em ágar. No entanto, mais estudos são necessários a fim de caracterizar tal substância inibitória.

7. Referências

ABEE, T.; KOVÁCS, A. T.; KUIPERS, O. P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 172-179, 2011.

ADRIÃO, A.; VIEIRA, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; SOL, M.; TENREIRO, R. P.; CHAMBEL, L.; BARATA, B.; ZILHAO, I.; SHAMA, G.; PERNI, S.; JORDAN, S. J.; ANDREW, P. W.; FALEIRO, M. L. Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 142-150, 2008.

ALLEN-HOLM, M.; BARKEN, K. B.; YANG, L.; KLAUSEN, M.; WEBB, J. S.; KJELLEBERG, S.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 1114-1128, 2006.

ALMEIDA, C.; AZEVEDO, N. F.; SANTOS, S.; KEEVIL, C. W.; VIEIRA, M. J. Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH). **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-13, 2011.

ANDREWS, J. S.; ROLFE, S. A.; HUANG, W. E.; SCHOLLES, J. D.; BANWART, S. A. Biofilm formation in environmental bacteria is influenced by different macromolecules depending on genus and species. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 2496-2507, 2010.

ARNOLD, T.; GROBMANN, K.; BAUMANN, N. Uranium speciation in biofilms studied by laser fluorescence techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 1641-1653, 2010.

BELVAL, S. C.; GAL, L.; MARGIEWES, S.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Assessment of the roles of luxS, s-ribosyl homocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EDG-e. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2644-2650, 2006.

BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. **Bacteriological Analytical Manual**, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 12. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071429>>. Acesso em: 20/01/2012.

BERK, V.; FONG, J. C. N.; DEMPSEY, G. T.; DEVELIOGLU, O. N.; ZHUANG, X.; LIPHARDT, J.; YILDIZ, F. H.; CHU, S. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholera* biofilms. **Science**, v. 337, p. 236-239, 2012.

BOLLINGER, R. R.; BARBAS, A. S.; BUSH, E. L.; LIN, S. S.; PARKE, W. Biofilms in the normal human large bowel: fact rather than fiction. **Gut**, v. 56, p. 1481-1482, 2007.

BORUCKI, M. K.; PEPPIN, J. D.; WHITE, D.; LOGE, F.; CALL, D. R. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7336-7342, 2003.

BRANDA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **TRENDS in Microbiology**, v. 13, p. 20-26, 2005.

BRIDIER, A.; DUBOIS-BRISSENET, F.; BOUBETRA, A.; THOMAS, V.; BRIANDET, R. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. **Journal of Microbiology Methods**, v.82, p. 64-70, 2010.

BRITO, M. A. V. P.; SOMKUTI G. A.; RENYE J. A. Production of antilisterial bacteriocins by staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1194-1200, 2011.

BROOKS, J. D.; FLINT, S. H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 2163-2176, 2008.

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

CARPENTIER, B.; CERF, P. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 1-8, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate outbreak of listeriosis linked to whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/120811/index.html>>. Acesso em: 03/05/2012.

CHAE, M. S.; 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.

CHAVANT, P.; MARTINIE, B.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M. N.; HEBRAUD, M. *L. monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 728-737, 2002.

CHAIGNON, P.; SADOVSKAYA, I.; RAGUNAH, C.; RAMASUBBU, N.; KAPLAN, J. B.; JABBOURI, S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p.125-132, 2007.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 22-32, 2003.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z; CALDWELL, D.; KORBER, D. R.; LAPPINSCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 777-788, 2005.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 19, p. 195-206, 2008.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, p. 799-806, 2007.

DAS, T.; SHARMA, P. K.; BUSSCHER, H. J.; van der MEI, H. C.; KROM, B. P. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3405-3408, 2010.

Di BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; IANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1552-1561, 2008.

DICKSCHAT, J. S. Quorum sensing and bacterial biofilms. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 343-369, 2010.

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.

DOMINIAK, D. M.; NIELSEN, J. L.; NIELSEN, P. H. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 710-721, 2011.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167-193, 2002.

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

FOLSOM, J. P.; SIRAGUSA, G. R.; FRANK, J. F. Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 826-834, 2006.

FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, p. 227-238, 2010.

FREDERIKSEN, B.; PRESSLER, T.; HANSEN, A.; KOCH, C.; HØIBY, N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme®) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. **Acta Paediatrica**, v. 95, p. 1070-1074, 2006.

FREITAG, N. E.; PORT, G. C.; MINEV, M. D. *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 7, p. 623-628, 2009.

FU, W.; FORSTER, T.; MAYER, O.; CURTIN, J. J.; LEHMAN, S. M.; DONLAN, R. M. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an *in vitro* model system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 397-404, 2010.

FUX, C. A.; COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 34-40, 2005.

GAMBLE, R.; MURIANA, P. M. Microplate fluorescence assay for measurement of the ability of strains of *Listeria monocytogenes* from meat and meat-processing plants to adhere to abiotic surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5235-5244, 2007.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 1-15, 2007.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 1165-1171, 2007.

GRANDE, R.; Di GIULIO, M.; BESSA, L. J.; DI CAMPLI, E.; BAFFONI, M.; GUARNIERI, S.; CELLINI, L. Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: a backstairs rumour. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 490-498, 2010.

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

GITON, P. S.; HUNG, C. S.; KLINE, K. A.; ROTH, R.; KAU, A. L.; HAYES, E.; HEUSER, J.; DODSON, K. W.; CAPARON, M. G.; HULTGREN, S. J. Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 3626-3638, 2009.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Review in Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **TRENDS in Microbiology**, v. 13, p. 7-10, 2005.

HARMSSEN, M.; LAPPANN, M.; KNØCHEL, S.; MOLIN, S. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 2271-2279, 2010.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J.; MARQUES, L. L. R.; CERI, H. Biofilms. **American Scientist**, v. 93, p. 508-515, 2005.

HARVEY, J.; KEENAN, K. P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, v. 24, p. 380-392, 2007.

HAZELEGER, W. C.; DALVOORDE, M.; BEUMER, R. R. Fluorescence microscopy of NaCl-stressed, elongated *Salmonella* and *Listeria* cells reveals the presence of septa in filaments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 288-290, 2006.

HEFFORD, M. A.; D'AOUST, S.; CYR, T. D.; AUSTIN, J. W.; SANDERS, G.; KHERADPIR, E.; KALMOKOFF, M. L. Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* 568. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 197-208, 2005.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

HIRAGA, S.; NIKI, H.; OGURA, T.; ICHINOSE, C.; MORI, H.; EZAKI, B.; JAFFE, A. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 1496-1505, 1989.

IVANEK, R.; GRÖHN, Y. T.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, p. 319-336, 2006.

IZANO, E. A.; AMARANTE, M. A.; KHER, W. B.; KAPLAN, J. B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 470-476, 2008.

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.

KUMAR, S.; PARVATHI, A.; GEORGE, J.; KROHNE, G.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 527-531, 2009.

LAPPANN, M.; CLAUS, H.; ALLEN, V. T.; HARMSSEN, M.; ELIAS, J.; MOLIN, S.; VOGEL, U. A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of *Neisseria meningitidis*. **Molecular Microbiology**, v. 75, p. 1355-1371, 2010.

LASA, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology**, v. 9, p. 21-28, 2006.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P. A. D.; LE FLÈCHE-MATÉOS, A.; ROCHE, S. M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1210-1214, 2010.

LEMON, K. P.; HIGGINS, D. E.; KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 4418-4424, 2007.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single- and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1186-1191, 1995.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 594-605, 2000.

LEWUS, C.; KAISER, A.; MOTVILLE, T. L. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1683-1688, 1991.

LIMA, G. M. S. **Ocorrência de bacteriocinas e caracterização molecular de linhagens de *Zymomonas mobilis***. 2002, 73f. Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

LINDSAY, D.; HOLY, A. V. 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.

MA, L.; CONOVER, M.; LU, H.; PARSEK, M. R.; BAYLES, K.; WOZNIAK, D. J. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. 1-11, 2009.

MAI, T. L.; CONNER, D. E. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 282-286, 2007.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. **Methods in Microbiology**, v. 7, p. 313-342, 1972.

MANN, E. E.; RICE, K. C.; BOLES, B. R.; ENDRES, J. L.; RANJIT, D.; CHANDRAMOHAN, L.; TSANG, L. H.; SMELTZER, M. S.; HORSWILL, A. R.; BAYLES, K. W. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilme maturation. **PLoS ONE**, v. 4, p. 1-12, 2009.

MARSH, E. J.; LUO, H.; WANG, H. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 2003-2210, 2003.

MARTINS, I. S.; FARIA, F. C. C.; MIGUEL, M. L. M.; DIAS, M. P. S. C.; CARDOSO, F. L. L.; MAGALHÃES, A. M. C. G.; MASCARENHAS, L. A.; NOUÉR, S. A.; BARBOSA, A. V.; VALLIM, D. C.; HOFER, E.; REBELLO, R. F.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. A cluster of *Listeria monocytogenes* infections in hospitalized adults. **American Journal of Infection Control**, v. 38, p. 31-36, 2010a.

MARTINS, M.; UPPULURI, P.; THOMAS, D. P.; CLEARY, I. A.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; OLIVEIRA, R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, p. 323-331, 2010b.

MAUKONEN, J.; MÄTTÖ, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 327-356, 2003.

MINEI, C. C.; GOMES, B. C.; RATTI, R. P.; D'ANGELIS, C. E. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 634-638, 2008.

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

MOONS, P.; MICHIELS, C. W.; AERTSEN, A. Bacterial interactions in biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, p. 157-168, 2009.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, v. 1, p. 107-121, 2004.

MOTT, I. E. C.; STICKLER, D. J.; COAKLEY, W. T.; BOTT, T. R. The removal of bacterial biofilm from water-filled tubes using axially propagated ultrasound. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 509-514, 1998.

NIELSEN, K. M.; JOHNSEN, P. J.; BENSASSON, D.; DAFFONCHIO, D. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. **Environmental Biosafety Research**, v. 6, p. 37-53, 2007.

NILSSON, R. E.; ROSS, T.; BOWMAN, J. P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to stain origin and growth origin and growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, p. 14-24, 2011.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 320-324, 2001.

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

ORGAZ, B.; KIVES, J.; PEDREGOSA, A. M.; MONISTROL, I. F.; LABORDA, F.; SAJOS, C.; LABORDA, F. Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 51-56, 2006.

ORSI, R. H.; DEN BAKKER, H. C.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 79-96, 2011.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207-228, 2008.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 577-588, 2007.

PAN, Y.; BREIDT, F. Jr.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in simulated food processing environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7711-7717, 2006.

PAN, Y.; BREIDT, F. Jr.; GORSKI, L. Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 1433-1441, 2010.

PERRY, J. A.; CVITKOVITCH, D. G.; LÉVESQUE, C. M. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. **Microbiology Letters**, v. 299, p. 261-266, 2009.

POIMENIDOU, S.; BELESSI, C. A.; GIAOURIS, E. D.; GOUNADAKI, A. S.; NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. N. *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in simulated dairy processing environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7182-7188, 2009.

QIN, Z.; OU, Y.; YANG, L.; ZHU, Y.; TOLKER-NIELSEN, T.; MOLIN, S.; QU, D. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v. 153, p. 2083-2092, 2007.

RAMYA, S.; GEORGE, R. P.; RAO, R. V. S.; DAYAL, R. K. Effect of biofouling on anodized and sol-gel treated titanium surfaces: a comparative study. **Biofouling**, v. 26, p. 883-891, 2010.

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.

RENIER, S.; HÉBRAUD, M.; DESVAUX, M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 835-850, 2011.

RICE, K. C.; MANN, E. E.; ENDRES, J. L.; WEISS, E. C.; CASSAT, J. E.; SMELTZER, M. S.; BAYLES, K. W. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. **PNAS**, v. 104, p. 8113-8118, 2007.

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

RIEU, A.; BRIANDET, R.; HABIMANA, O.; GARMYN, D.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. *Listeria monocytogenes* EDG-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4491-4497, 2008a.

RIEU, A.; LEMAITRE, J. P.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. Interactions in dual species biofilms between *L. monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 76-82, 2008b.

RODRIGUES, D. A.; ALMEIDA, M. A.; TEIXEIRA, P. A.; OLIVEIRA, R. T.; AZEREDO, J. C. Formation of batch and fed-batch growth modes on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* at different temperatures. **Current Microbiology**, v. 59, p. 457-462, 2009.

RODRIGUEZ, A.; AUTIO, W. R.; McLANDSBOROUGH. Effects of contact time, pressure, percent relative humidity (%RH), and material type on *Listeria* biofilm adhesive strength at a cellular level using atomic force microscopy (AFM). **Food Biophysics**, v. 3, p. 305-311, 2008.

ROWAN, N. J.; CANDLISH, A. A. G.; BUBERT, A.; ANDERSON, J. G.; KRAMER, K.; McLAUCHLIN, J. Virulent rough filaments of *Listeria monocytogenes* from clinical and food samples secreting wild-type levels of cell-free p60 protein. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2643-2648, 2000.

SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, M. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 7-15, 2011.

SCHOOLING, S. R.; HUBLEY, A.; BEVERIDGE, T. J. Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 4097-4102, 2009.

SELA, S.; FRANK, S.; BELAUSOV, E.; PINTO, R. A mutation in the luxS gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5653-5658, 2006.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407–413, 2009.

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

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SOFOS, J. N. *Listeria monocytogenes* – Enemy no.1 for the ready-to-eat industry. **The National Provisioner**, p. 70-72, 2009a.

SOFOS, J. N. Biofilms: our constant enemies. **Food Safety Magazine**, v. 38, p. 40-41, 2009b.

SPOERING, A. L.; GILMORE, M. S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 133–137, 2006.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 6, p. 199-210, 2008.

TAKAHASHI, H.; SUDA, T.; TANAKA, Y.; KIMURA, B. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. **Letter in Applied Microbiology**, v. 50, p. 618-625, 2010.

TANG, J.; KANG, M. S.; CHEN, H. C.; SHI, X. M.; ZHOU, R.; CHEN, J.; DU, Y. W. The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria. **Science China Life Sciences**, v. 54, p. 863-869, 2011.

TETZ, G. V.; ARTEMENKO, N. K.; TETZ, V. V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 1204-1209, 2009.

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

TRÉMOULET, F.; DUCHE, O.; NAMANE, A.; MARTINIE, B.; LABADIE, J. C. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, p. 25-31, 2002.

TRESSE, O.; SHANNON, K.; PINON, A.; MALLE, P.; VIALETTE, M.; MIDELET-BOURDIN, G. Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 1569-1578, 2007.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Dependence of continuous-flow biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EDG-e on SOS response factor YneA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 1992-1995, 2010.

VATANYOOPAISARN, S.; NAZLI, A.; DODD, C. R.; REES, C. E. D.; WAITES, W. M. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 860-863, 2000.

VILAIN, S.; PRETORIUS, J. M.; THERON, J.; BRÖZEL, V. S. DNA as an adhesion: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2861-2868, 2009.

VILLANI, F.; SANNINO, L.; MOSCHETTI, G.; MAURIELLO, G.; PEPE, O.; AMODIO-COCCHIERI, R.; COPPOLA, S. Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosus* 1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages. **Food Microbiology**, v. 14, p. 555-566, 1997.

WHITCHURCH, C. B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P. C.; MATTICK, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v. 295, p. 1487, 2002.

WINKELSTRÖTER, L. K. **Quantificação e análise de viabilidade de *Listeria monocytogenes* em biofilmes por semeadura em placa, microscopia de fluorescência e ensaios preliminares de PCR em tempo real.** 2008, 103f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

WINKELSTRÖTER, L. K.; GOMES, B. C.; THOMAZ, M. R. S.; SOUZA, V. M.; DE MARTINIS, E. C. P. *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 22, p. 1404-1407, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Foodborne diseases, emerging. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en/>>. Acesso em: 03/05/2012.

WOOD, T. K.; HONG, S. H.; MA, Q. Engineering biofilm formation and dispersal. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 87-94, 2011.

ZAMEER, F.; KREFT, J.; GOPAL, S. Interaction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus epidermidis* in dual species biofilms. **Journal of Food Safety**, v. 30, p. 954-968, 2010.

ZAMEER, F.; GOPAL, S.; KROHNE, G.; KREFT, J. Development of a biofilm model for *Listeria monocytogenes* EDG-e. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1143-1147, 2010.

Apêndices

Apêndice A

Resultados dos experimentos de enumeração de células aderidas às lâminas retangulares de aço inoxidável do sistema de agitação em frasco cilíndrico, quando cultivadas em diferentes condições de incubação: caldo BHI a 25°C e 37°C; caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* ou de *S. epidermidis* a 37°C.

Tabela 1 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI a 25°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
24	6,96	5,07	5,14	5,73	1,07
48	6,96	5,14	5,04	5,71	1,08
72	4,80	6,86	5,34	5,67	1,06

Tabela 2 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI a 25°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
24	5,41	6,90	5,66	5,99	0,79
48	5,54	5,54	5,74	5,60	0,11
72	5,60	5,04	5,47	5,37	0,29

Tabela 3 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
24	6,93	5,72	6,04	6,23	0,62
48	5,60	5,00	5,90	5,50	0,45
72	3,44	4,56	3,66	3,89	0,59

Tabela 4 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
24	6,00	5,56	5,44	5,67	0,29
48	4,60	4,41	4,60	4,53	0,10
72	4,79	5,86	4,38	5,01	0,76

Apêndices

Tabela 5 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
24	1,83	1,83	1,83	1,83	0
48	6,90	6,93	5,07	6,30	1,06
72	5,30	5,32	5,60	5,40	0,16

Tabela 6 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
24	3,93	3,17	4,14	3,75	0,50
48	4,90	4,38	4,68	4,65	0,26
72	3,07	4,30	5,72	4,36	1,32

Tabela 7 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis* a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
24	6,90	6,81	5,38	6,36	0,85
48	5,34	4,00	5,64	4,99	0,87
72	5,30	5,71	5,23	5,41	0,26

Tabela 8 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis* a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
24	5,34	5,66	5,64	5,54	0,17
48	6,86	5,07	5,72	5,88	0,90
72	4,68	5,00	5,30	4,99	0,30

Apêndices

Apêndice B

Resultados dos experimentos de enumeração de células livres no meio de cultivo do sistema de agitação em frasco cilíndrico, quando cultivadas em diferentes condições de incubação: caldo BHI a 37°C; caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* ou de *S. epidermidis* a 37°C.

Tabela 1 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 livres em caldo BHI a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
0	7,20	7,17	7,25	7,21	0,04
24	9,17	9,14	9,20	9,17	0,02
48	9,11	9,04	9,17	9,11	0,06
72	8,88	8,88	9,00	8,92	0,06

Tabela 2 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 livres em caldo BHI a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
0	7,63	7,32	7,51	7,49	0,15
24	9,17	9,20	9,32	9,23	0,07
48	9,14	9,14	9,00	9,09	0,08
72	9,00	9,00	9,00	9,00	0

Tabela 3 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 livres em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
0	7,14	7,47	7,60	7,40	0,23
24	5,04	6,39	6,30	5,91	0,75
48	8,39	8,00	8,39	8,26	0,22
72	8,91	8,41	8,91	8,75	0,29

Apêndices

Tabela 4 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 livres em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
0	7,41	7,17	7,47	7,35	0,15
24	6,66	7,69	7,79	7,38	0,62
48	7,69	8,39	8,43	8,17	0,41
72	7,70	8,30	8,41	8,14	0,37

Tabela 5 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 livres em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis* a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
0	7,20	7,14	7,00	7,11	0,10
24	8,91	8,86	8,84	8,87	0,03
48	8,81	8,47	8,69	8,66	0,17
72	8,86	8,81	8,81	8,83	0,02

Tabela 6 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 livres em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis* a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
0	7,07	7,11	7,17	7,12	0,04
24	8,95	8,93	8,95	8,94	0,01
48	8,93	8,84	8,04	8,60	0,49
72	8,88	8,74	8,93	8,85	0,09

Apêndices

Apêndice C

Resultados dos experimentos de enumeração de células aderidas às lâminas circulares de aço inoxidável do sistema de agitação em microplaca, quando cultivadas em diferentes condições de incubação: caldo BHI a 25°C e 37°C; caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* ou de *S. epidermidis*; caldo BHI acrescido de nuclease micrococcal de *S. aureus* ou DNaseI bovina a 37°C.

Tabela 1 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI a 25°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	6,75	6,39	6,64	6,14	6,14	6,25	6,39	0,25
48	6,56	6,68	6,32	6,46	6,41	6,72	6,52	0,15
72	6,75	6,81	6,86	6,60	6,32	6,59	6,65	0,19

Tabela 2 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI a 25°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	7,72	6,64	6,94	7,04	6,59	7,46	7,06	0,44
48	7,00	7,38	6,72	7,23	7,38	5,83	6,92	0,58
72	7,51	7,88	7,34	6,96	7,41	7,64	7,46	0,30

Tabela 3 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	7,32	5,72	8,07	7,20	7,11	7,07	7,08	0,76
48	7,30	7,00	7,34	6,14	5,90	6,11	6,63	0,65
72	6,20	6,07	6,23	5,86	6,23	7,14	6,29	0,44

Apêndices

Tabela 4 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	7,51	7,38	7,75	6,81	8,11	6,83	7,40	0,51
48	5,96	7,55	7,07	6,41	6,41	6,54	6,66	0,56
72	6,25	6,07	6,34	6,11	6,55	6,30	6,27	0,17

Tabela 5 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	5,54	5,00	6,20	6,57	6,75	6,64	6,12	0,70
48	6,59	6,30	6,83	6,55	6,49	6,56	6,55	0,17
72	6,30	6,78	6,56	6,54	6,75	6,11	6,51	0,26

Tabela 6 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	5,90	5,49	5,72	6,23	6,07	6,51	5,99	0,36
48	5,64	6,20	6,14	7,11	7,07	7,25	6,57	0,66
72	6,46	7,14	6,39	6,23	6,56	6,07	6,48	0,36

Tabela 7 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis* a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	7,07	6,98	6,68	6,54	6,75	6,60	6,77	0,21
48	6,30	6,32	6,23	7,39	7,72	6,90	6,81	0,63
72	6,46	7,23	6,83	6,41	6,38	6,44	6,62	0,33

Apêndices

Tabela 8 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. epidemidis* a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	7,72	6,88	6,34	6,32	6,75	6,60	6,77	0,51
48	6,30	6,38	6,20	6,59	7,14	6,83	6,57	0,35
72	6,34	6,32	6,41	5,90	6,07	6,72	6,29	0,28

Tabela 9 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de nuclease micrococal de *S. aureus* a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	6,11	7,07	6,39	7,75	8,14	7,00	7,08	0,77
48	5,27	6,11	6,81	7,11	7,72	7,86	6,81	0,98
72	6,44	6,30	5,60	6,56	5,64	5,88	6,07	0,41

Tabela 10 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de nuclease micrococal de *S. aureus* a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	6,32	6,90	6,68	7,34	7,44	7,34	7,00	0,44
48	5,75	6,44	6,11	7,39	7,32	7,23	6,71	0,70
72	5,72	6,30	6,41	6,50	6,49	6,60	6,33	0,31

Tabela 11 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de DNaseI bovina a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	6,39	6,90	6,90	6,41	6,81	6,88	6,72	0,24
48	6,75	6,51	6,60	6,75	6,60	6,51	6,62	0,10
72	6,49	6,98	5,86	6,50	6,92	6,83	6,60	0,41

Apêndices

Tabela 12 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI acrescido de DNaseI bovina a 37°C (log UFC/cm²)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
24	6,20	6,59	7,07	6,30	6,49	7,11	6,63	0,38
48	6,60	6,23	7,50	7,50	6,59	6,30	6,78	0,57
72	6,51	6,94	6,83	6,49	6,78	6,90	6,74	0,19

Apêndices

Apêndice D

Resultados dos experimentos de enumeração de células livres no meio de cultivo do sistema de agitação em microplaca, quando cultivadas em diferentes condições de incubação: caldo BHI a 25°C e 37°C; caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* ou de *S. epidermidis*; caldo BHI acrescido de nuclease micrococcal de *S. aureus* ou DNaseI bovina a 37°C.

Tabela 1 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 livres em caldo BHI a 25°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,27	7,47	7,04	7,30	7,32	7,47	7,31	0,16
24	9,30	9,38	9,39	9,23	9,39	9,41	9,35	0,07
48	9,23	9,41	9,36	9,39	9,32	9,46	9,36	0,08
72	9,27	9,07	9,17	8,86	8,90	8,69	8,99	0,21

Tabela 2 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 livres em caldo BHI a 25°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,60	7,32	7,44	7,47	7,25	7,04	7,35	0,91
24	9,36	9,30	9,38	9,47	9,39	9,41	9,38	0,05
48	9,32	9,25	9,07	9,32	9,36	9,27	9,26	0,10
72	9,11	9,17	8,90	9,00	9,14	9,17	9,08	0,11

Tabela 3 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 livres em caldo BHI a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,11	7,27	7,23	7,27	7,23	7,34	7,24	0,07
6	9,25	9,90	9,63	9,60	9,04	9,11	9,42	0,33
24	9,04	9,14	9,25	9,00	9,00	8,86	9,05	0,13
48	8,77	8,63	8,69	8,63	8,69	8,66	8,68	0,05
72	8,60	8,86	8,69	8,47	8,60	8,00	8,54	0,29

Apêndices

Tabela 4 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 livres em caldo BHI a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,55	7,51	7,25	7,32	7,51	7,51	7,44	0,12
6	9,55	9,47	9,47	9,60	9,60	9,60	9,55	0,06
24	9,04	9,23	9,17	9,20	9,25	9,32	9,20	0,09
48	8,95	8,77	8,84	8,88	8,93	8,66	8,84	0,10
72	8,79	8,84	8,93	9,04	8,72	9,07	8,90	0,13

Tabela 5 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 livres em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	6,91	7,25	6,84	6,93	7,17	7,07	7,03	0,16
6	5,07	5,14	5,11	5,04	5,00	5,07	5,07	0,05
24	7,32	7,23	7,30	8,81	8,84	8,74	8,04	0,83
48	8,81	8,23	8,47	8,51	8,88	8,47	8,56	0,24
72	8,81	9,00	8,55	8,63	8,60	8,55	8,69	0,17

Tabela 6 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 livres em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. aureus* a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,34	7,23	7,27	7,66	7,46	7,34	7,38	0,15
6	7,14	7,25	7,23	7,07	7,11	7,14	7,16	0,06
24	7,55	7,84	7,47	8,77	8,86	8,84	8,22	0,67
48	8,11	8,04	8,17	8,47	8,69	8,74	8,37	0,30
72	8,47	9,04	8,60	8,20	8,60	8,17	8,51	0,31

Apêndices

Tabela 7 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 livres em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis* a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,55	7,17	7,25	7,27	7,07	7,20	7,25	0,16
6	9,81	9,65	9,60	9,04	8,95	9,17	9,37	0,36
24	9,00	9,04	8,98	9,47	8,93	8,86	9,04	0,21
48	8,81	8,77	8,86	8,88	8,81	8,74	8,81	0,04
72	8,63	8,77	8,69	8,60	8,79	8,66	8,69	0,07

Tabela 8 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 livres em caldo BHI acrescido de sobrenadante de cultura de *S. epidermidis* a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,11	7,14	7,07	7,27	7,07	7,20	7,15	0,07
6	9,51	9,60	9,47	9,04	8,95	9,17	9,29	0,27
24	8,98	8,96	8,84	9,47	8,93	8,86	9,01	0,23
48	8,47	8,47	8,51	8,88	8,81	8,74	8,65	0,18
72	8,27	8,38	8,27	8,60	8,79	8,66	8,50	0,21

Tabela 9 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 livres em caldo BHI acrescido de nuclease micrococcal de *S. aureus* a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,27	7,38	7,30	7,81	7,36	7,23	7,39	0,21
24	9,47	9,17	9,20	9,47	9,11	9,17	9,27	0,16
48	8,77	8,77	9,07	8,72	8,47	8,63	8,74	0,19
72	9,69	7,84	8,23	8,51	7,96	8,25	8,41	0,66

Apêndices

Tabela 10 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 livres em caldo BHI acrescido de nuclease micrococcal de *S. aureus* a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,69	7,38	7,32	7,72	7,49	7,20	7,47	0,20
24	9,27	9,23	9,23	9,23	9,11	9,25	9,22	0,05
48	8,96	8,86	8,77	8,95	8,79	8,79	8,86	0,08
72	8,81	8,74	8,88	8,81	8,77	8,84	8,81	0,04

Tabela 11 – Contagem das células de *L. monocytogenes* IAL 633 livres em caldo BHI acrescido de DNaseI bovina a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,17	7,14	7,55	7,25	7,36	7,32	7,30	0,41
24	9,04	9,41	9,17	9,04	9,17	9,36	9,20	0,15
48	8,93	9,00	8,86	9,84	9,04	8,91	9,10	0,37
72	8,66	8,72	8,69	8,69	8,81	8,88	8,74	0,08

Tabela 12 – Contagem das células de *L. monocytogenes* ATTC 19115 livres em caldo BHI acrescido de DNaseI bovina a 37°C (log UFC/mL)

Horas	Experimento 1			Experimento 2			Média	Desvio Padrão
0	7,27	7,38	7,30	7,36	7,32	7,27	7,32	0,04
24	9,20	9,30	9,27	9,20	9,27	9,11	9,23	0,07
48	9,04	9,04	9,17	8,91	9,00	9,00	9,02	0,08
72	8,69	8,81	8,74	8,86	8,91	8,63	8,78	0,10