UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Influência de moléculas autoindutoras produzidas por *Escherichia coli* na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*

Aline Zago de Grandi

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Profª. Drª. Maria Teresa Destro

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Influência de moléculas autoindutoras produzidas por *Escherichia coli* na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*

Aline Zago de Grandi

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Profª. Drª. Maria Teresa Destro

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Grandi, Aline Zago de
G753i Influência de moléculas autoindutoras produzidas por *Escherichia coli* na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* / Aline Zago de Grandi. -- SãoPaulo, 2015.
73p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Orientador: Destro, Maria Teresa

1. Microbiologia de alimentos 2. Biofilmes 3. *Escherichia* coli 4. Listeria I. T. II. Destro, Maria Teresa, orientador.

644.07 CDD

Aline Zago de Grandi

Influência de moléculas autoindutoras produzidas por *Escherichia coli* na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profª. Drª. Maria Teresa Destro

orientador/presidente

Profª. Drª. Mariza Landgraf

1º examinador

Profª. Drª. Elaine Cristina Pereira de Martinis

2º examinador

Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili

3º examinador

Profª. Drª. Dirce Yorika Kabuki

4º examinador

São Paulo, 29 de junho de 2015.

DEDICO

Ao meu pai, Aldo de Grandi,
com amor. Saudades.

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Teresa Destro, pela oportunidade deste trabalho e por toda a orientação e aprendizado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro no desenvolvimento do projeto.

À professora Mariza Landgraf, pelas sugestões, oportunidade de aprendizado e convívio.

À professora Bernadette D. G. M. Franco pela oportunidade de aprendizado e convívio.

À professora Elaine C. P. de Martinis, pelas sugestões e por compartilhar a metodologia de ensaio com biofilme.

À professora Carla Taddei e Susana M. I. Saad, pelas sugestões e correções no projeto de pesquisa para o ingresso no programa de Pós-Graduação.

À professora Maria Regina Simionato, pelas correções e sugestões no exame de qualificação do doutorado.

Ao professor Marcelo Palma Sircili, do Instituto Butantan, por todas as sugestões e contribuição no trabalho.

Ao Food Science Department da Cornell University, EUA, por ceder as cepas de Listeria monocytogenes utilizadas no estudo.

À professora Dirce Yorika Kabuki, da UNICAMP, pela doação da cepa Vibrio harveyi BB170.

Ao professor Josef Wilhelm Baader, do Laboratório Fotoquímica Orgânica e Quimioluminescência do Instituto de Química da USP, pela disponibilidade de uso do luminômetro.

À professora Daise Aparecida Rossi, da Universidade Federal de Uberlândia, por todo o carinho e ajuda desde a graduação.

À Maria Crystina Igarashi, meus sinceros agradecimentos, por toda a contribuição na pesquisa desde os primeiros experimentos.

À Daniele Maffei, pela amizade e companheirismo, dentro e fora do laboratório.

À Ana Carolina Rezende, pela amizade e carinho.

Aos amigos e colegas do laboratório de Microbiologia de Alimentos, Daniele F., Érika, Fabiana, Isabela, Janaína, Karina, Maria Fernanda, Matheus, Natacha, Patrícia, Priscila, Rafael, Raquel, Rubia, Vanessa, Verena e Vinicius, pela amizade e colaboração.

À Kátia Leani pela atenção dedicada e ajuda nas análises.

À Lúcia, pelo carinho e convívio.

À Mônica, Cleonice, Roberta e Edilson, da secretaria do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pelos serviços prestados.

À minha querida mãe, Rosali, por todo o amor, carinho, ajuda financeira, apoio, confiança, dedicação, torcida e orações.

Ao André e Anamary, meus irmãos, pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao Rafael, pelo companheirismo e incentivo.

À Rejane, Daniella e Isabella, tia e primas amadas, que me acompanharam nesses quatro anos de estudo.

À Desirée Castello Branco, por me ouvir e me apoiar nessa caminhada.

Aos meus amigos e novos amigos de São Paulo, pelo incentivo e alegrias.

À Deus, pelas bênçãos recebidas.

Obrigada!

RESUMO

GRANDI, A.Z. **Influência de moléculas autoindutoras produzidas por *Escherichia coli* na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*.** 2015. 73p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Listeria monocytogenes é um micro-organismo Gram-positivo que está comumente associado a doenças de origem alimentar. Possui a capacidade de sobreviver a condições adversas e de formar biofilme em diferentes superfícies abióticas, tornando-se um problema constante para a indústria de alimentos, pois pode comprometer a sanitização e aumentar o risco de contaminação pós-processamento. A formação de biofilme pode ser regulada por um mecanismo denominado *quorum sensing*, no qual ocorre intensa comunicação célula-célula, mediada por moléculas químicas, chamadas de autoindutoras. Pouco se sabe sobre a ocorrência de interação entre bactérias Gram- positivas e negativas na formação de biofilmes, sendo mais frequentes estudos entre bactérias do mesmo grupo. A fim de avaliar a ocorrência de interação entre *Escherichia coli* e *L. monocytogenes* (*Lm*), desenvolveu-se esta pesquisa com os seguintes objetivos: i) verificar a capacidade de *Lm* sorotipo 1/2a selvagem e sua mutante isogênica (Δ*prfA* Δ*sigB*) formar biofilme em presença de *Escherichia coli*, avaliando-se a importância dos reguladores de virulência, prfA e sigB, no processo; e ii) verificar a produção e interferência de moléculas autoindutoras de *E. coli* E2348/69 na formação de biofilme por *Lm.* Os ensaios de formação de biofilme foram realizados utilizando-se lâminas de aço-inoxidável AISI 304 #4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e em meio pré-condicionado (MPC) por *E. coli*, com incubação a 25 ºC. Foram testadas duas concentrações iniciais de *Lm* (10^2 e 10^6 UFC.mL^{-1}) e amostragens em diferentes tempos de incubação. Utilizou-se um método de quantificação indireto com coloração do biofilme por cristal violeta e posterior leitura da absorbância. Observou-se que *Lm* 1/2a selvagem e sua mutante isogênica (Δ*prfA* Δ*sigB*) são capaz de formar biofilme na presença de *Escherichia coli* e que uma maior quantidade de biofilme foi formada por *Lm* selvagem quando comparada à sua mutante, em meio não pré-condicionado (controle), indicando que *prfA* e *sig*B estão envolvidos no processo de formação de biofilme. Quando em MPC, o biofilme formado pela cepa selvagem foi menor que no meio controle (BHI), indicando que *E. coli* E2348/69, utilizada no pré-condicionamento do meio, produz moléculas capazes de interferir no processo de formação e na quantidade de biofilme formado por *Lm*; e para o biofilme formado pela cepa mutante, houve uma maior quantificação em MPC em comparação ao meio controle, o que sugere que os genes deletados possam estar envolvidos no reconhecimento das moléculas autoindutoras. Assim, os dados obtidos permitem concluir que há interação e interferência por parte de *E. coli* na formação de biofilme por *Lm* mediante produção de moléculas autoindutoras.

Palavras-chave: Biofilme, *Listeria monocytogenes, Escherichia coli, quorum sensing*, moléculas autoindutoras.

ABSTRACT

GRANDI, A.Z. **Influence of autoinducers produced by *Escherichia coli* on biofilm formation by *Listeria monocytogenes***. 2015. 73p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Listeria monocytogenes (*Lm*) is a Gram-positive microorganism commonly associated with foodborne diseases. Due to its ability to survive under adverse environmental conditions and to form biofilm in different abiotic surfaces, this bacterium is a concern for the food industry, since it can compromise sanitation procedures and increase the risk of post-processing contamination. Biofilm formation can be regulated by a quorum sensing mechanism, in which there is intense cell-cell communication mediated by chemical molecules, called autoinducers. Little is known about the occurrence of interaction between Gram-positive and Gram-negative bacteria on biofilm formation. Thus, in order to evaluate the occurrence of interaction between *Escherichia coli* and *Lm*, this study was developed including the following objectives: i) to evaluate the ability of *Lm* 1/2a and its isogenic mutant strain (Δ*prfA*Δ*sigB*) to form biofilm on the presence of *Escherichia coli*, assessing the importance of virulence regulators, prfA and sigB, in this process; and ii) to verify the production and interference autoinducers of *E. coli* E2348/69 on biofilm formation by *Lm*. Biofilm formation assays were conducted using stainless steel AISI 304 #4 immersed into broth brain heart infusion (BHI) and into preconditioned medium (MPC) by *E. coli*, following incubation at 25 °C. *Lm* at two initial concentrations (10^2 and 10^6 $CFU.mL^{-1}$) and under different incubation time was tested. An indirect method for quantification of cells was applied, using crystal violet to color the biofilm, followed by optical density measurement. It was observed that *Lm* 1/2a and its isogenic mutant (Δ*prfA* Δ*sigB*) are able to form biofilm in the presence of *Escherichia coli* and a larger amount of biofilm was formed by wild strain *Lm* compared to its mutant, in a non-preconditioned medium (control), indicating that *prfA* and *sigB* are involved in biofilm formation. For MPC, the biofilm formation by the wild strain was lower than in the control (BHI), indicating that *E. coli* E2348/69, used in the preconditioned medium, produces molecules that can affect the formation process and the amount of biofilm formed by *Lm*; and in the biofilm formed by the mutant strain, there was a higher quantification of MPC compared to the control, suggesting that the deleted genes may be involved in recognition the of autoinducers. These results suggest that there is an interaction and interference of *E. coli* on biofilm formation by *Lm* due the production of autoinducers.

Key-words: Biofilm, *Listeria monocytogenes, Escherichia coli, quorum sensing*, autoinducers.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
3	OBJETIVOS	16
4	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	Material	17
4.1.1	Cepas bacterianas	17
4.1.2	Lâminas	17
4.2	Métodos	18
4.2.1	Preparo das culturas bacterianas	18
4.2.2	Avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* 1/2a selvagem à *E. coli* ou a compostos produzidos por *E. coli*	18
4.2.3	Formação de biofilme em superfície de aço inoxidável	20
4.2.3.1	Preparo dos cupons/lâminas de aço inoxidável	20
4.2.3.2	Meios de cultivo para formação do biofilme	20
4.2.3.3	Bioensaio para formação e quantificação de biofilme	20
4.2.4	Efeito do meio pré-condicionado por *E. coli* sobre a capacidade de *L. monocytogenes* em formar biofilme	22
4.2.4.1	Preparação do meio pré-condicionado (MPC) de *E. coli* ATCC 8739	22
4.2.4.2	Formação de biofilme por *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável utilizando MPC	23
4.2.5	Avaliação da presença do gene codificador do autoindutor AI-2 (*luxS*) e sua expressão por *E. coli*	24

4.2.6	Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em MPC com Furanona	25
4.3	Análise estatística	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	Avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* à *E. coli* ou a compostos produzidos por *E. coli*	27
5.2	Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em superfície de aço inoxidável	29
5.3	Efeito do meio pré-condicionado por *E. coli* sobre a capacidade de *L. monocytogenes* formar biofilme	35
5.4	Avaliação da presença do gene codificador do autoindutor AI-2 (*luxS*) e sua expressão por *E. coli*	39
5.5	Efeito do meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 sobre a capacidade de *L. monocytogenes* formar biofilme	41
5.5.1	*L. monocytogenes* 1/2a selvagem	41
5.5.2	*L. monocytogenes* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*)	44
5.5.3	*Listeria monocytogenes* 1/2a selvagem *vs L. monocytogenes* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*)	46
5.6	Formação de biofilme por *L. monocytogenes* em MPC com furanona	50
6	CONCLUSÕES	55
7	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICE 1	68
	APÊNDICE 2	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. **A**- lâmina de aço inoxidável AISI 304 #4 (15 cm^2); **B** – frasco e suporte de aço inoxidável para apoio das lâminas e formação de biofilme; **C** – agitador magnético e aparato para o bioensaio. 21

Figura 2. Populações médias de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em caldo infusão cérebro e coração - BHI, incubado a 37 ºC por até 24 horas. Concentrações inicial do inóculo: **A –** *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1}; **B** – *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1}; **C** – *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1} e *E. coli* 10^6 UFC.mL^{-1}; **D** – *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *E. coli* 10^6 UFC.mL^{-1}. 28

Figura 3. Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem (**A**), *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) (**B**) e *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI e mantidas a 25 ºC sob agitação constante. Concentração inicial do inóculo: *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}. 30

Figura 4. Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em monocultura e por *Lm* 1/2a selvagem em co-cultura com *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI e mantidas a 25ºC sob agitação constante. Concentração inicial do inóculo: *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}. 31

Figura 5. Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem (**A**), *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) (**B**) e *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em leite integral em pó reconstituído 10,0 % (p/v) e mantidas a 25 ºC sob agitação constante. Concentração inicial do inóculo: *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}. 32

Figura 6. Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* 8739 – MPC e caldo infusão de cérebro e coração – BHI, mantidos a 25 ºC sob agitação constante. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}. 37

Figura 7. População de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em meio pré-condicionado por *E. coli* 8739 – MPC e caldo infusão de cérebro e coração – BHI, mantidos a 25 ºC sob agitação constante. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}. 38

Figura 8. Presença do gene *luxS* em cepas de *Escherichia coli* EDL 933 (**2**) (controle positivo) e de *Escherichia coli* ATCC 8739 (**3**) em gel de agarose 1,0 % (p/v) corado com brometo de etídio. (**1**) - Marcador de peso molecular 1 kb; (**4**) - controle negativo da reação. 39

Figura 9. Indução de luminescência em cepa de *Vibrio harveyi* BB170 por autoindutor AI-2 de sobrenadantes livres de células de *E. coli* ATCC 8739, *E.* 40

coli 2348/69 e *E. coli* 042. RLU – *relative light units*.

Figura 10. Biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e em caldo infusão de cérebro e coração – BHI, mantidas a 25 ^{o}C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}. ***** - diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*). 43

Figura 11. Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e em caldo infusão de cérebro e coração – BHI (controle) com incubação a 25 ºC. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}. 44

Figura 12. Biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e em caldo infusão de cérebro e coração – BHI, mantidas a 25 ^{o}C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}. ***** - diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*). 45

Figura 13. Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e em caldo infusão de cérebro e coração – BHI (controle) com incubação a 25 ºC. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}. 46

Figura 14. Biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e de *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e incubadas a 25 ^{o}C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}. ***** - diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*). 47

Figura 15. Biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e de *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI e incubadas a 25 ^{o}C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}. ***** - diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*). 49

Figura 16. Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC adicionado de furanona nas concentrações 10 e 25 µM ($MPC_{F[10]}$; $MPC_{F[25]}$) e em MPC por *E. coli* E2348/69 sem adição de furanona, com incubação a 25 ^{o}C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}. 52

Figura 17. Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC adicionado de furanona nas concentrações 10 e 25 µM ($MPC_{F[10]}$; $MPC_{F[25]}$) e em MPC por *E. coli* E2348/69 sem adição de furanona, com incubação a 25 ^{o}C. 52

Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}.

Figura 18. Biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e de *Lm* 1/2a smutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4, imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC adicionado de furanona nas concentrações 10 e 25 µM ($MPC_{F[10]}$; $MPC_{F[25]}$) e em MPC por *E. coli* E2348/69 sem adição de furanona, com incubação à 25 ^{o}C por 24 horas. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}. ***** - diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*). 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento experimental dos bioensaios 21

Tabela 2. Valores da quantificação indireta (±desvio padrão) de biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*), em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e incubadas a 25 ^{o}C 47

Tabela 3. Valores da quantificação indireta (±desvio padrão) de biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*), em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI e incubadas a 25 ^{o}C 48

Tabela 4. Valores da quantificação indireta (±desvio padrão) de biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*), em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 e incubadas a 25 ^{o}C por 24 horas. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1} 51

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um dos mais importantes patógenos de origem alimentar e causa uma doença severa, denominada listeriose, que afeta principalmente indivíduos susceptíveis, incluindo gestantes e idosos. É considerado um micro-organismo ubíquo, sendo encontrado em diversos nichos, como solo e vegetação, podendo ser isolado de diferentes fontes, como silagem, material fecal e água; e em ambientes com diferentes temperaturas, fator determinante para a sua manutenção em ambientes de processamento de alimentos ou de estocagem.

A capacidade de formação de biofilme é considerada a principal razão para sua persistência no ambiente por períodos longos. Uma vez formado o biofilme, o micro-organismo se torna mais resistente a processos de higienização e limpeza aplicados nas superfícies, as quais se tornam fontes constantes de contaminação.

O processo de formação de biofilme inicia-se quando uma bactéria adere a uma superfície e, em seguida, coloniza vertical e horizontalmente o substrato formando microcolônias com estrutura tridimensional. Os micro-organismos presentes nessa estrutura estão envoltos por uma matriz de substâncias extracelulares. Com a maturação do biofilme, algumas células bacterianas ou agregados maiores podem se desprender, permitindo a dispersão desses micro-organismos para novos ambientes e consequente colonização.

Para entender o motivo da transição das células bacterianas da forma de vida livre para a forma séssil, podem-se citar algumas vantagens adquiridas pelas bactérias quando estão na forma biofilme. Quando inseridas nessa estrutura as células estão protegidas de agentes agressores externos, como alterações de pH, privação de nutrientes e/ou a ação de desinfetantes e antibióticos. Além disso, o biofilme é uma alternativa favorável à manutenção do ambiente em condições propícias à multiplicação celular.

De maneira geral, biofilmes podem apresentar uma população mista, havendo interação sinérgica entre as espécies. Sabe-se que existe um complexo sistema de comunicação entre as espécies bacterianas, o que lhes permiti enviar e receber mensagens químicas, havendo a possibilidade de “sentir” o ambiente através da produção, exportação e importação de pequenas moléculas sinalizadoras chamadas de autoindutoras. Esse

fenômeno é conhecido como *quorum sensing* e, tem sido extensamente estudado e relacionado com vários mecanismos biológicos.

Quorum sensing é um sistema de comunicação bacteriana célula-célula. Quando uma população bacteriana aumenta em número, ocorre um aumento proporcional da concentração extracelular da molécula de sinalização. Após atingir um limiar de concentração celular, o grupo detecta a molécula de sinalização e responde a ela com a ativação, por toda a população, de genes específicos.

Esse sistema de detecção da densidade celular proporciona acesso a nutrientes e a nichos ambientais mais favoráveis, e auxilia na competição contra outras bactérias e contra estresses ambientais. Exemplos de processos celulares modulados por *quorum sensing* são: simbiose, transferência de plasmídeos conjungativos, esporulação, síntese de peptídeos antimicrobianos, regulação da virulência, além da formação de biofilme. Alguns dos processos citados são improdutivos quando realizados individualmente, mas tornam-se efetivos mediante ação simultânea de um grupo de células. Com isso, o sistema *quorum sensing* permite às bactérias atuarem como organismos multicelulares e usufruírem de benefícios que nunca poderiam obter se agissem individualmente.

A comunicação entre as bactérias pode ser inter ou intraespécie e cada tipo de comunicação exige um "vocabulário químico" específico. A comunicação intraespécie em bactérias Gram-negativas é frequentemente realizada por sistemas do tipo AI-1 e 3, sendo o primeiro mediado por moléculas de *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs), um sistema do tipo LuxR/I; e o segundo (AI-3) mediado por um autoindutor aromático. Em bactérias Gram-positivas, a comunicação intraespécie é mediada por pequenos peptídeos, e a sinalização entre as células ocorre através de um sistema de dois componentes fosforilados. Já a comunicação interespécie, entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tem sido associada à autoindutores do tipo 2 (AI-2), molécula de furanosil borato diéster.

Essa capacidade das bactérias de comunicarem-se umas com as outras e controlar uma gama de atividades individuais e coletivas, proporciona grandes avanços na sobrevivência e persistência no ambiente. O entendimento desse mecanismo não é meramente de interesse acadêmico, pois entender quando e como as bactérias se beneficiam da produção de autoindutores, pode ser vantajoso no sentido da interrupção dessa comunicação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Listeria monocytogenes

O gênero *Listeria*, segundo o *Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology* (HOLT et al., 1994), compreende bactérias na forma de coco-bacilos, Gram-positivas, não esporuladas, não formadoras de cápsulas, anaeróbias facultativas e móveis à temperatura de 20 – 25 °C, devido à presença de flagelos peritríquios.

O gênero é atualmente composto por 17 espécies: *L. monocytogenes* (PIRIE, 1940), *L. grayi* (ERREBO LARSEN; SEELIGER, 1966), *L. inoccua* (SEELIGER, 1981), *L. welshimeri*, *L. seeligeri* (ROCOURT; GRIMONT, 1983) *L. ivanovii* (SEELIGER et al., 1984), *L. marthii* (GRAVES et al., 2010), *L. rocourtiae* (LECLERCQ et al., 2010), *L. fleischmannii* (BERTSCH et al., 2013), *L. weihenstephanensis* (LANG HALTER; NEUHAUS; SCHERER, 2013), *L. floridensis, L. aquatica, L. cornellensis, L. riparia,* e *L. grandensis* (DEN BAKKER et al., 2014), *Listeria booriae* e *Listeria newyorkensis* (WELLER et al., 2015).

De todas as espécies de *Listeria* identificadas até o momento somente *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas a humanos e, somente *L. monocytogenes* representa importância em saúde pública.

L. monocytogenes multiplica-se em temperaturas que variam de -0,4 °C até 50 °C (LOU; YOUSEF, 1999), com crescimento ótimo a 30 – 37 °C. É capaz de se multiplicar em ampla faixa de pH (4,6 a 9,2) (ICMSF, 1996) e de atividade de água, sendo o valor ótimo > 0,97 e o mínimo variando entre 0,90 – 0,93 (LOU; YOUSEF, 1999). Esse micro-organismo também tolera elevadas concentrações de cloreto de sódio, conseguindo se multiplicar na concentração de 10,0 % de NaCl, ou ainda sobreviver a uma concentração de 23,8 % durante 259 dias (RYSER; MARTH, 2007).

Listeria monocytogenes podem ser agrupadas de acordo com o sorotipo, linhagem filogenética ou fonte de isolamento. Dois antígenos são usados para determinar o sorotipo, o somático (1 – 4) e o flagelar (a – d). Os sorotipos são agrupados em linhagens, sendo a linhagem I composta pelos sorotipos 4b, 1/2b, 3b e 3c, a linhagem II pelos sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a (PIFFARETTI et al.,1989); a linhagem III (RASMUSSEN et al., 1995) e a IV

(ROBERTS et al., 2006; WARD et al., 2008), pelos sorotipos 4a, 4b e 4c. A última classificação é em relação à fonte de origem, podendo ser a partir de seres humanos, animais, alimentos ou do ambiente.

Listeriose é uma doença invasiva causada por *L. monocytogenes* e afeta principalmente gestantes, neonatos, idosos e adultos imunocomprometidos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). As manifestações clínicas incluem meningite, meningoencefalite e septicemia, além de abortos espontâneos e natimortos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

L. monocytogenes é principalmente transmitida a humanos através de alimentos contaminados. A maioria dos surtos desse patógeno está associada ao consumo de alimentos processados industrialmente, refrigerados e prontos para o consumo (*ready-to-eat*) (RYSER, 1999; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Pode-se citar produtos lácteos e cárneos, produtos de origem vegetal, além de peixes e frutos do mar (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). A identificação da origem do surto e o estudo dos casos são de grande importância para a saúde pública, pois se trata de uma doença grave que, apesar de apresentar baixa morbidade, causa elevada mortalidade (20 – 30 %).

L. monocytogenes pode também ser encontrada em indústrias processadoras de gêneros alimentícios e a presença não é, normalmente, devido a falhas na limpeza e desinfecção (LATORRE et al., 2010). São frequentes os trabalhos, a exemplo do realizado por Weiler et al. (2013), que relatam isolamento de estirpes de *L. monocytogenes* em superfícies de equipamentos que tem contato direto com alimentos.

L. monocytogenes sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, são os mais associados a caso de listeriose e surtos em humanos (MCLAUCHLIN et al., 2004). O sorotipo 1/2a tem sido o mais frequentemente encontrado em alimentos e fontes ambientais (SAUNDERS; WIEDMANN, 2007), embora a maioria dos surtos de origem alimentar e a maioria dos casos esporádicos de listeriose são causadas por cepas do sorotipo 4b (JEFFERS et al., 2001).

A razão que leva *L. monocytogenes* 4b a ser mais frequentemente relacionada à doença em humanos e 1/2a mais a alimentos e ambiente de produção, ainda não está esclarecida. Pode-se supor que essa diferença de comportamento esteja relacionada à expressão dos fatores de virulência.

A maioria dos fatores de virulência de *L. monocytogenes* é regulada pelo Fator Regulador Positivo (PrfA), codificado pelo gene *prfA*. Além disso, evidências indicam que um fator sigma B (σ^B), codificado por *sigB*, também contribui para a transcrição de alguns genes de virulência de *L. monocytogenes*, assim como do regulador PrfA (OLLINGER et al., 2009). Sigma B também contribui na regulação da expressão de, pelo menos, 140 genes relacionados à produção de proteínas de importância na resposta ao estresse, regulação da transcrição, metabolismo de carboidratos e transporte (RAENGPRADUB; WIEDMANN; BOOR, 2008).

Biofilmes

Em ambientes industriais, *L. monocytogenes* é encontrada nas superfícies principalmente na forma de biofilme (LATORRE et al., 2010). Em geral, todos os micro-organismos são capazes de formar biofilmes em diferentes superfícies, a exemplo de ambientes naturais aquáticos e terrestres, tecidos vivos, dispositivos médicos e tubulações da indústria. Um substrato sólido, com fonte de água e de alguns nutrientes, é suficiente para permitir a formação da estrutura biofilme.

Biofilme é uma comunidade séssil de micro-organismos que se encontram, irreversivelmente, aderidos a um substrato ou interface, ou até mesmo uns aos outros e, que estão incorporados em uma matriz de polímeros extracelulares, altamente hidratada, produzida por eles mesmos e, exibem um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978; DONLAN; COSTERTON, 2002).

A transição da vida planctônica para a forma de biofilme envolve uma série de etapas, as quais estão susceptíveis a interações químicas, físicas e biológicas. Podem ser citadas: (1) fixação reversível das células planctônicas à superfície; (2) fixação das células de forma irreversível; (3) multiplicação celular e formação de microcolônias; (4) crescimento e maturação do biofilme; e (5) dispersão (XAVIER et al., 2005; RENNER; WEIBEL, 2011).

Para dar início à colonização, as bactérias fixam-se no substrato, o qual pode estar imerso ou em contato com fluidos que contém eletrólitos e macromoléculas. Estruturas externas à parede celular, como fimbrias, pili e flagelos, aumentam a taxa de fixação das

células, já que, uma vez aderida à superfície, possuem a capacidade de superar forças repulsivas comuns a todos os materiais (BULLITT; MAKOWSKI, 1995; THOMAS et al., 2004). Primeiramente, esta fixação se dá de forma reversível, mediada por forças de Van der Walls e atração eletrostática e, posteriormente, com a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) a adesão da célula ao substrato se torna irreversível (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Após a adesão, inicia-se um processo de replicação e formação das microcolônias, que ficam envolvidas pela matriz secretada. Essa comunidade aumenta em densidade populacional e em estrutura física com o acúmulo de EPS, resistindo a tensões mecânicas e possíveis deslocamentos. Com o crescimento do biofilme algumas células ou até mesmo agregados maiores tendem a se desprender e se dispersar no ambiente, ficando livres para colonizar outros nichos. Esta última etapa é importante para a propagação e autorenovação da comunidade (HALL-STOODLEY et al., 2004).

Os fatores químicos, físicos e biológicos envolvidos na fixação das células e consequente formação do biofilme incluem, de maneira geral, as propriedades da superfície ou interface, disponibilidade de nutrientes e diversidade da comunidade microbiana (KLAUSEN et al., 2003; COSTERTON et al., 1995).

Com relação aos micro-organismos, são fatores que podem influenciar a adesão ao substrato, a fase metabólica da célula, a presença de matéria orgânica, o pH e a temperatura do ambiente (DONLAN; COSTERTON, 2002; PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). Com relação às superfícies deve ser considerado, o condicionamento do substrato relacionado ao acúmulo de moléculas na interface líquido-sólido (CHAMBERLAIN, 1992), o transporte de massa, a carga superficial, além da hidrofobicidade e rugosidade (HALL-STOODLEY et al., 2004; PALMER; FLINT; BROOKS, 2007).

Já a arquitetura do biofilme, ou forma física, é influenciada por fatores que incluem as condições hidrodinâmicas, concentração de nutrientes, motilidade bacteriana e comunicação intercelular, bem como exopolissacarídeos e proteínas (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Sua arquitetura também pode ser fortemente influenciada pela interação de EPS aniônicos, contendo grupos carboxílicos, com cátions polivalentes. Por exemplo, Ca^{2+} pode formar uma ponte entre as moléculas de alginato polianiônicos, o que estimula o desenvolvimento de biofilmes mais espessos e compactos, com maior estabilidade mecânica (KÖRSTGENS et al., 2001).

Os micro-organismos que agora compõem o biofilme irão apresentar um metabolismo distinto daquele que as células no modo de vida livre apresentam. Dentre as alterações estão presentes, maior transferência de genes por conjugação (HAUSNER; WUERTZ, 1999), alteração na taxa de multiplicação celular e aumento da produção EPS (SUTHERLAND, 2001) e, ainda, maior resistência a sanitizantes e desinfetantes (ROBBINS et al., 2005). Além disso, as células podem expressar diferentes fenótipos dependendo da sua localização dentro do biofilme (MCLANDSBOROUGH et al., 2006). Esses comportamentos distintos de subpopulações heterogêneas contribuem para o sucesso ecológico do biofilme (BRIDIER et al, 2015).

Biofilmes apresentam-se como uma estrutura porosa e altamente hidratada, contendo pequenos canais abertos entre as microcolônias, os quais permitem o fluxo convectivo de líquidos, que irão garantir o suprimento de nutrientes para as células bacterianas e a eliminação de resíduos gerados como parte da atividade celular (DE BEER; STOODLEY; LEWANDOWSKI, 1994; MCLANDSBOROUGH et al., 2006). Este tipo de organização é extremamente vantajoso a todas as espécies presentes por fornecer proteção contra adversidades, como desidratação, colonização por bacteriófagos e agentes antimicrobianos.

Uma das explicações à maior resistência aos agentes antimicrobianos pelas células do biofilme está relacionada às características da matriz polimérica, que atua como barreira de difusão e peneira molecular. A matriz é formada por um material extracelular, de natureza viscoelástica (STOODLEY et al., 1999), constituído de diferentes tipos de biopolímeros, como polissacarídeos, proteínas e lipídeos (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A sua produção é controlada por vários genes (JEFFERSON, 2004) e a sua concentração, coesão, carga, capacidade de absorção, especificidade e natureza dos componentes individuais, determinam a sobrevivência dos micro-organismos e a consequente manutenção dessa estrutura (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A matriz promove estabilidade mecânica ao biofilme como um todo, mantendo a sua estrutura tridimensional mediante adesão à superfície e imobilização temporária das células bacterianas (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Ainda, atua retendo água, o que mantém hidratado o ambiente interno do biofilme, e pode ser fonte de nutrientes e ser utilizada pelas células como fonte de energia.

Com base em todas as funções da matriz polimérica e das vantagens proporcionadas, a formação de um biofilme pelos micro-organismos permite um estilo de vida totalmente diferente da forma planctônica, favorecendo a sobrevivência por um longo período.

Uma vez colonizada a superfície, ocorre secreção de moléculas sinalizadoras através do mecanismo *quorum sensing*, as quais autoregulam fenótipos em toda a comunidade bacteriana (CAMILLI; BASSLER, 2006; HARRAGHY; KERDUDOU; HERRMANN, 2007). Essa autoregulação pode envolver a expressão de fatores de virulência e a secreção de EPS (HALL-STOODLEY et al., 2004). Com a maturação do biofilme, pode ainda ocorrer o recrutamento de outras espécies havendo a formação de biofilmes mistos, que podem formar comunidades estáveis, desenvolvendo gradientes físico-químicos com intensa comunicação célula-célula (SADOWSKA et al., 2010; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A interação entre duas espécies bacterianas pode ser associada a uma relação harmônica de comensalismo, onde substâncias produzidas por uma espécie podem beneficiar a outra. Por exemplo, os produtos metabólicos de um micro-organismo podem servir para a multiplicação de outra espécie ou o consumo de oxigênio por uma espécie aeróbica pode facilitar o crescimento de uma espécie microaerofílica.

O biofilme misto pode também se caracterizar como uma relação de competição, onde uma espécie impede ou limita a adesão e multiplicação de outras pela produção de substâncias tóxicas (BOARI et al., 2009; LERICHE; CARPENTIER, 2000). Ainda, os micro-organismos envolvidos podem também apresentar comportamento independente, não havendo influência de uma espécie sobre a outra.

Quorum sensing

O termo *quorum sensing* (QS) foi primeiramente utilizado por Fuqua; Winans; Greenberg (1994), sendo anteriormente referenciado como “autoindução”. Autoindução foi observada e descrita pela primeira vez ao se estudar duas bactérias marinhas bioluminescentes, *Vibrio fischeri* e *Vibrio harveyi*, que são produtoras de luz, emitida

quando estão presentes elevadas densidades populacionais, em resposta ao acúmulo de moléculas sinalizadoras no meio circundante (NEALSON; HASTING, 1979).

Sendo assim, *quorum sensing* é definido como um processo de autoindução, associado a um mecanismo de autoregulação das células microbianas. Trata-se de um sistema de sensores ambientais que permite às bactérias monitorarem e responderem às densidades populacionais. O micro-organismo produz um sinal orgânico, originalmente chamado de molécula autoindutora (AI), que se acumula no ambiente durante as fases de multiplicação (BASSLER, 1999; FUQUA; GREENBERG, 2002). A molécula autoindutora, ou autoindutor, é então internalizada ou detectada por proteínas de superfície, resultando na regulação de genes específicos e induzindo determinados fenótipos.

São necessários três eventos para modular o fenótipo de resposta bacteriana: (i) a síntese de um sinal químico, (ii) a acumulação do sinal, e (iii) o reconhecimento do sinal. Porém, para que o sistema QS ocorra, é importante a presença de uma população mínima, de modo que uma quantidade suficiente da molécula de sinalização possa ser produzida (BASSLER, 2002).

O entendimento deste fenômeno leva a relacionar QS com o maior acesso a nutrientes ou a nichos específicos, o que permite às bactérias responderem defensivamente a forças eucarióticas ou organismos concorrentes e, ainda, otimizar a capacidade das células de se diferenciarem em formas morfológicas melhor adaptadas à sobrevivência em ambientes inóspitos (TUROVSKIY et al., 2007).

Sabe-se que o sistema QS está envolvido em uma série de atividades microbianas importantes, mas não restritos a elas, que incluem a regulação da virulência, biossíntese de enzimas extracelulares, bioluminescência, esporulação, capacidade de adquirir DNA de outras bactérias, produção de biossurfactante e síntese de exopolissacarídeos, além da formação de biofilme (BASSLER; LOSICK, 2006; BASSLER, 2002).

Foram identificados sistemas de sinalização intra e interespécies, sendo as moléculas de sinalização bacterianas divididas em quatro categorias: (i) derivados de ácidos graxos, como as *N*-acil-homoserina lactonas (AHL), utilizados por bactérias Gram-negativas principalmente para a comunicação intra-espécie, e conhecidas como autoindutor-1 (IA-1); (ii) furanosil borato diéster, autoindutor-2 (IA-2), produzido por bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, e utilizado para comunicação intra e

interespécie; (iii) autoindutor-3 (IA-3), de estrutura ainda desconhecida; e (iv) aminoácidos e pequenos peptídeos utilizados por bactérias Gram-positivas.

O sistema LuxIR, relacionado ao autoindutor 1, foi descoberto pela primeira vez em *Vibrio fischeri* durante a investigação do fenômeno de bioluminescência (NEALSON; HASTINGS, 1979). É constituído por LuxI, que sintetiza uma N-AHL, e LuxR, um fator de transcrição, que é responsável por controlar a expressão de genes na presença do autoindutor. Uma vez sintetizado, AI-1 difunde-se através da membrana bacteriana e é liberado para o ambiente circundante e, com um aumento da população, por conseguinte, há elevação na concentração de AI-1 no ambiente. Assim, AI-1 passa a ser difundido e internalizado e, ao se ligar a LuxR, a transcrição do operon *luxCDABEGH*, necessário para a produção de bioluminescência, é ativada (DEVINE; SHADEL; BALDWIN, 1989). A regulação deste operon é importante para a relação simbiótica entre *V. fischeri* e seu hospedeiro, a lula *Euprymna scolopes* (LUPP et al., 2003).

O sistema LuxI/LuxR, e outros sistemas homólogos a ele, já foram identificados em várias espécies Gram-negativas (HENKE; BASSLER, 2004). As variações na estrutura de AHL, como comprimento da cadeia acil, grau de saturação e substituinte localizado no terceiro carbono, proporcionam um grau de especificidade ao sistema de autoindução tipo I (TUROVSKIY et al., 2007).

Para algumas espécies bacterianas é possível o reconhecimento de AHLs endógenas. Pode-se citar, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*, que são capazes de codificarem um homólogo de LuxR (SdiA), mas não um gene homólogo a LuxI e, assim, não produzem AHL (SMITH; FRATAMICO; NOVAK, 2004). Porém, reconhecem e respondem a AHLs produzidas por outras bactérias entéricas através da expressão do operon rck e vários outros genes (HENKE; BASSLER, 2004).

O autoindutor 2 pode ser detectado por diversas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. LuxS é necessária para a síntese de AI-2, que é detectado por uma proteína periplasmática solúvel, LuxP, que conduz à ativação de uma proteína quinase de dois componentes, LuxQ (TUROVSKIY et al., 2007).

O AI-2 é produzido a partir de S-adenosilmetionina (SAM) em três etapas enzimáticas. Quando SAM é usado como um doador de metil, S-adenosilhomocisteína

(SAH) é produzida. A enzima Pfs converte SAH em S-ribosilhomocisteína (SRH) e adenina e, subsequentemente LuxS atua sobre SRH resultando em homocisteína e 4,5-di-hidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), sendo DPD a molécula percursora de todos os AI-2 (SCHAUDER; BASSLER, 2001).

Com relação à recepção e reconhecimento do sinal AI-2, duas classes de receptores específicos foram bem caracterizados (CHEN et al., 2002; MILLER et al., 2004): LuxP, presente em *Vibrio* spp e, LsrB, identificado pela primeira vez em *Salmonella* Typhimurium, mas também presente em outras bactérias entéricas (PEREIRA et al., 2009).

O sistema AI-3 foi descrito, inicialmente, como um composto encontrado em meios pré-condicionados que controla a expressão dos genes de virulência em *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (SPERANDIO et al., 2003). Este sistema ainda é o menos estudado até o momento e sua estrutura não é totalmente conhecida, sabendo-se somente que é um composto aromático e que é semelhante aos hormônios epinefrina e noroepinefrina (SPERANDIO et al., 2003).

Espécies Gram-positivas utilizam, predominantemente, pequenos peptídeos (API) para a sinalização célula-célula. Os genes que codificam o peptídeo precursor, o aparelho de detecção de sinal e a estrutura de transporte estão, geralmente, localizados no mesmo *cluster* (BASSLER, 2002).

Inicialmente um peptídeo precursor, mais longo, é sintetizado e, posteriormente, processado e modificado a uma molécula autoindutora (AIP). Esse peptídeo é secretado via transportadores da família ABC (cassete de ligação a ATP). A concentração do sinal externo aumenta à medida que as células se multiplicam. Quando uma concentração crítica de AIP é atingida, o autoindutor é detectado por um sistema de transdução do sinal de dois componentes (SCHAUDER; BASSLER, 2001). A informação é transmitida para dentro da célula por fosforilação e culmina numa alteração apropriada na expressão do gene (KLEEREBEZEM et al., 1997).

A partir da identificação dessas moléculas químicas, atuantes na comunicação celular, e sabendo-se que se um determinado sinal, gerado por uma espécie bacteriana, é reconhecido por outra espécie, com consequente regulação da expressão de genes (XAVIER; BASSLER, 2005), há a possibilidade de uma série de aplicações práticas para o

controle microbiológico, relacionadas à multiplicação de patógenos e expressão de virulência.

Biofilmes e a indústria de alimentos

As superfícies presentes na indústria de alimentos proporcionam diversas vantagens para a formação de biofilmes, principalmente aquelas que de alguma maneira recebem nutrientes. Ainda, a colonização bacteriana das superfícies que entram ou não em contato direto com alimentos, assim como a persistência dos patógenos no ambiente, apresenta impacto para a saúde pública.

A persistência de patógenos em ambientes de processamento de alimentos está intimamente relacionada com sua resposta a fatores bióticos e abióticos (DAVEY; O'TOOLE, 2000; DONLAN, 2002; DUNNE, 2002; MARIANI et al, 2007; WINKELSTROTER et al, 2013), sendo que a maioria dos patógenos envolvidos em doenças de origem alimentar é capaz de aderir e formar biofilmes na maioria dos materiais e, em quase todas as condições ambientais encontradas na indústria.

Com o crescimento e expansão do biofilme e, consequente desprendimento de células, os micro-organismos podem ser transferidos para matérias-primas ou alimentos já processados, contaminando-os. Além do risco à saúde, todo esse processo pode ocasionar prejuízos financeiros à indústria, devido a bloqueio de produtos (*recall*), que em alguns países envolvem tanto a distribuição para o consumo quanto a suspensão da fabricação de novos lotes. Assim, para evitar prejuízos para a indústria e para a saúde do consumidor, uma série de medidas preventivas deve ser tomada, incluindo limpeza e desinfecção do ambiente (JAHID; HA, 2012). Porém, a eficiência da desinfecção aplicada a uma superfície com biofilme não é a mesma que a aplicada quando há células planctônicas somente, visto que biofilmes podem ser muito mais tolerantes a estes tratamentos (BRIDIER et al., 2011) e ainda induzir a seleção de fenótipos resistentes (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Neste contexto, há a preocupação da comunidade científica no desenvolvimento de tratamentos almejando, especificamente, o biofilme.

Para *Listeria monocytogenes* a capacidade de formar biofilme, quando somada a sua resistência à condições adversas, lhe permite multiplicar e sobreviver em vários

micronichos encontrados em instalações de produção e processamento de alimentos. Há dados na literatura sobre adesão de *Listeria* em superfícies de materiais como metais, borracha e polímeros (BERESFORD; ANDREW; SHAMA, 2001; LUNDEN et al., 2000). Segundo Schwab et al. (2005) a capacidade de fixação rápida nas superfícies é a maior contribuinte para a presença e persistência de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de gêneros alimentícios. Dados de Chavant et al. (2002) indicam adesão e colonização da superfície com 2 h a 20 e 37 ºC num substrato hidrofílico.

Há relatos do isolamento de *Listeria* em forma de biofilme a partir de utensílios e equipamentos onde ocorre acúmulo de resíduos orgânicos e locais onde agentes de limpeza e desinfecção tem acesso dificultado. Neste último caso, podem ser citadas articulações, áreas mal projetadas ou partes de correias transportadoras, juntas de borracha, drenos no assoalho e tanques de armazenamento (CHARLTON; KINDE; JENSEN, 1990; COX et al., 1989; NELSON, 1990; TOMPKIN, 2002). Além disso, o micro-organismo pode sobreviver nos lubrificantes utilizados em alguns desses locais (AARNISALO; RAASKA; WIRTANEN, 2007). Nessas superfícies o micro-organismo pode permanecer viável por vários meses ou anos (TREMOULET et al., 2002) e algumas cepas podem se tornar dominantes sobre outras recém-chegadas e, assim tornarem-se residentes na planta processadora (VERGHESE et al., 2011). Todos esses fatores fazem com que o controle de *L. monocytogenes* represente um grande desafio para a indústria de alimentos, principalmente em relação à segurança microbiológica dos alimentos nela processados.

A formação de biofilme por *L. monocytogenes* pode ser afetada pela eficiência da fixação das células na fase inicial e por vários fatores envolvidos em ambas as fases de colonização e desenvolvimento. Um dos fatores relacionados à fase de maturação é a disponibilidade de nutrientes. Há ensaios que indicaram que *L. monocytogenes* forma uma maior quantidade de biofilme sob condições de elevado suprimento nutricional, ao contrário de outras bactérias (STEPANOVIC et al., 2004; TAKHISTOV; GEORGE, 2004; HELKE; WONG, 1994).

Com relação à estrutura do biofilme formado sabe-se que é influenciada pelas diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*, variando principalmente na quantidade de EPS que compõem a matriz (BORUCKI et al., 2003; DJORDJEVIC; WIEDMANN; MCLANDSBOROUGH, 2002). Em contraste com a estrutura do biofilme de outras bactérias em que as células bacterianas são incorporadas nas substâncias extracelulares, *L.*

monocytogenes, em biofilme, empilham-se umas sobre as outras com pouco material extracelular (MARSH; LUO; WANG, 2003; RIEU et al., 2008).

Em estudo realizado por Takhistov e George (2004) foi observado que, após a adesão inicial de *L. monocytogenes*, as novas células se aderiram preferencialmente no EPS já presente na superfície e que, as células descendentes não se desprenderam do biofilme, mas se expandiram a novas áreas com nutrientes disponíveis e com poucas células presentes, fato que pode propiciar a formação de colônias interligadas, citadas por Marsh; Luo; Wang (2003). O EPS formado por *L. monocytogenes* pode, com o passar do tempo, se tornar fonte de energia para as células do biofilme, e devido a isso, pode haver o desprendimento do biofilme como um todo após o enfraquecimento de determinados pontos dentro da matriz (TAKHISTOV; GEORGE, 2004).

O desenvolvimento de *L. monocytogenes* em biofilmes é significativamente influenciado por fatores como temperatura (FLETCHER, 1977; MOLTZ; MARTIN, 2005; MAI; CONNER, 2007; Di BONAVENTURA et al., 2008), tempo de incubação (FLETCHER, 1977; HARVEY; KEENAN; GILMOUR, 2007), meio de cultivo (MOLTZ; MARTIN, 2005; MAI; CONNER, 2007) e natureza da superfície de contato (MIDELET; CARPENTIER, 2004; MIDELET; KOBILINSKY; CARPENTIER, 2006).

L. monocytogenes pode existir em biofilme como monocultura ou ser parte de biofilme de cultura mista e, ainda, a formação do biofilme pode ser influenciada, positiva ou negativamente, pela presença de outras bactérias no ambiente. Em estudo de Bremer, Monk e Osborne (2001) verificou-se que biofilmes de *L. monocytogenes* em co-cultura com *Flavobacterium* spp., foram significativamente maiores que no ensaio com cultura pura. Observações similares foram feitas por Schwab et al. (2005) que sugerem um maior número de células de *Listeria* aderidas quando em presença de *P. fluorescens*, e por Rieu et al. (2008) que citam que a presença de alguns micro-organismos, como *Staphylococcus aureus*, poderia facilitar a colonização e persistência de *L. monocytogenes* no ambiente.

No entanto, a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* pode ser restringida por outros organismos que produzem compostos antagônicos e que competem por nutrientes. Alguns autores verificaram que a presença de *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp. ocasionou uma diminuição da adesão e formação de biofilmes por *L. monocytogenes* (JEONG; FRANK, 1994; LERICHE; CARPENTIER, 2000; NORWOOD; GILMOUR, 2001). Bactérias produtoras de ácido láctico, incluindo *Enterococcus durans*, *Lactococcus*

lactis subsp. *lactis* e *Lactobacillus plantarum* mostraram serem capazes de inibir o crescimento e mesmo eliminar *Listeria monocytogenes* em biofilmes mistos, através da produção de compostos antimicrobianos, tais como os ácidos orgânicos e nisina (ZHAO, DOYLE; ZHAO, 2004).

Inicialmente, o estudo de interação entre micro-organismos fornece dados de possíveis comportamentos sociais mais complexos e, esses dados são importantes para o estabelecimento de medidas de controle em indústrias de gêneros alimentícios. Um exemplo de estudo, a fim de verificar qual a interação que ocorre entre duas espécies bacterianas, foi o realizado por Aragon-Alegro (2007), no qual se observou a influência de coliformes no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal. Os resultados indicaram que coliformes exercem influência sobre o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, levando a supor que o patógeno foi inibido por compostos, diferentes do ácido lático, produzidos por aqueles micro-organismos.

Outros estudos também têm permitido verificar uma baixa ocorrência de *L. monocytogenes* em áreas sujas de abatedouros frigoríficos, quando comparada com a verificada nas áreas limpas dos mesmos estabelecimentos (SAKATE, 2005; CHIARINI, 2007). Tais dados sugerem a interferência de outros micro-organismos e/ou compostos por eles produzidos na ocorrência e permanência de *L. monocytogenes* no ambiente. Essas constatações são também compartilhadas pelas indústrias de alimentos que encontram maior frequência de amostras ambientais positivas para *L. monocytogenes* nas áreas mais limpas das indústrias processadoras, mesmo após procedimentos de limpeza e sanitização.

Devido à complexidade de biofilmes mistos e poucas de informações sobre a interação e o comportamento dos biofilmes compostos por *L. monocytogenes* e outras espécies microbianas, há a necessidade de estudos para identificar e caracterizar interações e as possíveis moléculas envolvidas no processo, para auxiliar no controle de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de alimentos.

3. OBJETIVOS

- Verificar a capacidade de *Listeria monocytogenes* formar biofilme em presença de *Escherichia coli*.

- Avaliar a importância dos genes reguladores de virulência (*prfA e sigB*) na formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

- Verificar a presença e interferência de moléculas autoindutoras, responsáveis pelo mecanismo *quorum sensing*, na formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas uma cepa de *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2a selvagem (BISHOP; HINRICHS, 1987) e sua mutante isogênica (Δ*pfrA* Δ*sigB*) (McGANN; WIEDMANN; BOOR, 2007), ambas fornecidas pelo Food Science Department da Cornell University, EUA. Cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP; *E. coli* E2348/69, sorotipo O127:H6, protótipo de *Escherichia coli* enteropatogênica (LEVINE et al., 1978) e *E. coli* 042, sorotipo O44:H18 (NATARO et al., 1985), cedidas pelo professor Marcelo Palma Sircili do Instituto Butantã, São Paulo-SP; e como cepa biossensora empregou-se *Vibrio harveyi* BB170, cedida pela professora Dirce Yorika Kabuki, da UNICAMP, Campinas-SP.

As culturas foram mantidas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Oxoid, Inglaterra) adicionado de 25,0 % (v/v) de glicerol (Synth, Brasil), com exceção da cepa biossensora mantida em caldo AB [Autoinducer Bioassay; 0,3 M NaCl, 0,05 M $MgSO_4$, 0,2 % (p/v) ácido casamino, 1 M tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4/ KH_2PO_4) 0,1 M L-arginine, e 50 % (v/v) glicerol] (GREENBERG; HASTINGS; ULITZUR, 1979) também adicionado de glicerol, e estocadas a -80 ºC.

4.1.2 Lâminas

Para a formação de biofilme foram utilizadas lâminas de aço inoxidável AISI 304 com acabamento número 4 (#4). As lâminas possuem dimensão padronizada de 15 cm^2 (6,0 x 2,5 cm) e 1 cm^2.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das culturas bacterianas

As culturas foram inoculadas em cinco mL de caldo BHI e incubadas a 37 ºC por 24 horas, após este período uma alíquota de um mL foi transferida para frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo BHI, sendo incubado sob agitação (180 rpm) a 37 ºC até atingir o final da fase exponencial. Uma alíquota do cultivo foi centrifugada (6 16K, Sigma, Alemanha) a 6.000 x g por 10 minutos a 4 ºC e ressuspendida em solução de peptona 0,1 % (p/v) (Oxoid). A densidade óptica (DO) de cada cultivo foi ajustada em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotec, EUA) a 0,5 (cerca de 10^8 UFC.mL^{-1}) no comprimento de onda de 600nm (A_{600}).

4.2.2 Avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* 1/2a selvagem à *E. coli* ou a compostos produzidos por *E. coli*

Para a realização deste teste foram utilizadas culturas de *L. monocytogenes* e *E. coli* ATCC 8739 preparadas conforme 4.2.1. A avaliação da sensibilidade *in vitro* foi realizada empregando dois métodos, a saber: o de difusão em poços, descrito por Deans e Ritchie (1987), e o método da gota, segundo Gratia (1946) (apud TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976).

Para o método de difusão em poços, transferiu-se para uma placa de Petri uma alíquota de 1 mL da cultura de *L. monocytogenes* (10^7 UFC.mL^{-1}) e adicionou-se 20 mL de caldo triptona de soja (TSB, Oxoid) contendo 1,0 % de ágar. Após homogeneização e solidificação do meio, com auxílio de ponteiras descartáveis foram perfurados poços de aproximadamente 8 a 9 mm de diâmetro. Uma alíquota de 30 µL da cultura de *E. coli* com população de 10^7 UFC.mL^{-1} foi aplicada nos poços. As placas foram incubadas a 37 ºC durante 24 horas e, em seguida, foram analisadas quanto à formação de halos de inibição.

Seguindo a metodologia para a realização do método da gota adicionou-se, em placas de Petri, 20 mL de TSB + 1,5 % de ágar. Após a solidificação, três alíquotas de cinco µL da cultura de *E. coli* (10^7 UFC.mL^{-1}) foram utilizadas para se fazer três “spots” na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37ºC e após 24 horas recobriu-se a placa com uma sobrecamada de TSB + 0,75 % de ágar, que continha 20 µL da cultura de

L. monocytogenes (10^7 UFC.mL^{-1}). As placas foram então incubadas a 37 ºC durante 24 horas e, em seguida, também foram analisadas quanto à formação de halos de inibição.

Para os testes da verificação da sensibilidade de *L. monocytogenes* a algum composto produzido por *E. coli* foi utilizado sobrenadante livre de células, obtido através de centrifugação do cultivo de *E. coli* (10^7 UFC.mL^{-1}) a 8.000 x g por 10 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi avaliado pelo método da gota previamente empregado e pelo de antagonismo por inoculação em poços, descrito por Tagg e Mcgiven (1971).

Para o método da gota nesta etapa utilizou-se o mesmo procedimento anteriormente descrito, porém após as primeiras 24 horas de incubação as placas foram expostas ao vapor de clorofórmio por 30 minutos em capela e mantidas entreabertas por igual período de tempo, para evaporação do clorofórmio residual. Em seguida, recobriu-se a placa com uma sobrecamada de 10 mL de TSB + 0,75 % de ágar contendo 20 µL da cultura de *L. monocytogenes* (10^7 UFC.mL^{-1}). As placas foram então incubadas a 37 ºC durante 24 horas e foram analisadas quanto à formação de halos de inibição.

Para o teste de antagonismo por inoculação em poços adicionou-se, em placas de Petri, uma alíquota de 1 mL da cultura de *L. monocytogenes* (10^7 UFC.mL^{-1}) e 20 mL de caldo TSB acrescido de 0,6 % (p/v) de extrato de levedura (TSB-YE) + 1,5 % de ágar. Após homogeneização e solidificação do ágar, foram perfurados poços conforme descrito anteriormente e 30 µL do sobrenadante preparado foram aplicados nos poços. As placas foram incubadas a 37 ºC durante 24 horas e, em seguida, foram analisadas quanto à formação de halos de inibição.

Ainda, para a avaliação da sensibilidade em caldo seguiu-se a metodologia apresentada por Aragon-Alegro (2007) com modificações, a saber. As culturas de *L. monocytogenes* e *E. coli* foram inoculadas concomintantemente em 50 mL de caldo BHI, com o monitoramento da população bacteriana imediatamente após a adição do inóculo e a cada duas horas, até o tempo de 10 horas e após 24 horas de incubação a 37 ^{o}C. Cinco combinações de bactérias foram avaliadas, sempre com inóculos de 1 mL: **A**- *L. monocytogenes* (10^2 UFC.mL^{-1}); **B**- *L. monocytogenes* (10^6 UFC.mL^{-1}); **C**- *E. coli* (10^6 UFC.mL^{-1}) + *L. monocytogenes* (10^6 UFC.mL^{-1}); **D**- *E. coli* (10^6 UFC.mL^{-1}) + *L. monocytogenes* (10^2 UFC.mL^{-1}). A enumeração foi feita em ágar azul-de-metileno eosina (EMB; Oxoid) para *E. coli* e em meio cromogênico ágar Listeria acc. Ottaviani e Agostini

- ALOA (Merck, Alemanha) para enumeração de *Listeria monocytogenes*, com incubação a 37 ºC durante 24 – 48 horas.

4.2.3 Formação de biofilme em superfície de aço inoxidável

4.2.3.1 Preparo dos cupons/lâminas de aço inoxidável

As lâminas foram submetidas aos procedimentos de limpeza e desinfecção segundo Marsh, Luo e Wang (2003). Foram fervidas em solução de dodecil sulfato de sódio 1,0 % (p/v) (Bio Agency, Brasil), enxaguadas em isopropanol 100 % (Synth) e posteriormente lavadas com água destilada. O armazenamento foi feito em etanol absoluto (Synth) e antes do uso foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

4.2.3.2 Meios de cultivo para a formação do biofilme

Para o desenvolvimento e formação do biofilme nas lâminas de aço inoxidável utilizou-se como meio de cultivo caldo BHI e leite em pó integral reconstituído (LR; 10,0 % p/v) (Nestle®, Brasil).

4.2.3.3 Bioensaio para formação e quantificação de biofilme

Para os ensaios foram utilizadas lâminas de 15 cm^2 colocadas em suportes verticais (MINEI et al., 2008) e dentro de frascos contendo meio de cultivo, mantidos sob agitação magnética vigorosa (752, Fisaton, Brasil) e incubação a 25 ºC. Cada conjunto (Figura 1) continha 800 mL do meio de cultivo e oito mL da cultura padronizada (item 4.2.1). Sempre que necessário, a cultura foi diluída em solução de peptona 0,1 % (p/v) para o ajuste da população bacteriana. Os experimentos foram realizados empregando as combinações apresentadas na Tabela 1.

Nos ensaios as lâminas foram retiradas e submetidas à avaliação após 3, 6, 9, 24, 48 e 60 horas de incubação. O pH dos meios de cultivo inoculados foi verificado a cada tempo de coleta com tiras medidoras de pH (faixa de leitura 4,0 - 7,0; Merck, Alemanha).

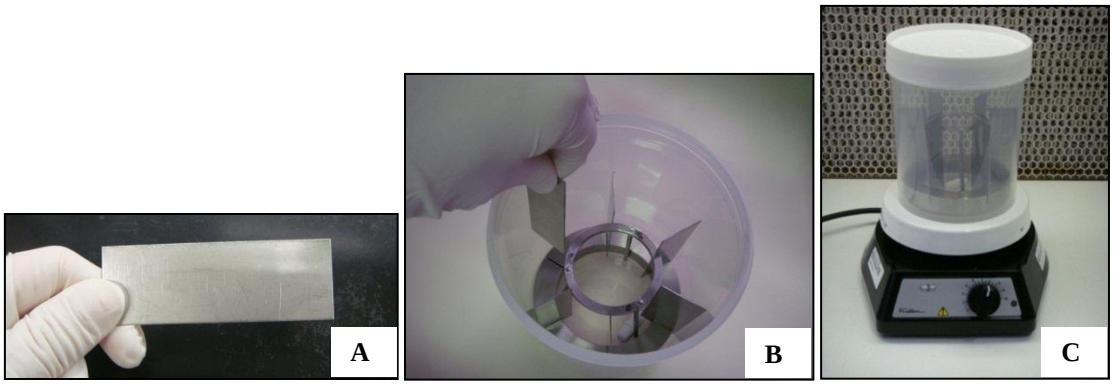


Figura 1. **A** – lâmina de aço inoxidável AISI 304 #4 (15 cm^2); **B** – frasco e suporte de aço inoxidável para apoio das lâminas e formação de biofilme; **C** – agitador magnético e aparato para o bioensaio.

Tabela 1. Planejamento experimental dos bioensaios

Meio de cultivo*	**Cepa *Listeria monocytogenes***	**Tempo para amostragem (horas)**	**Concentração do inóculo *L. monocytogenes / E. coli* (UFC.mL^{-1})**
BHI	1/2a Selvagem	3 / 6 / 9 / 24 / 48 / 60	10^6 / 0
			10^2 / 0
			10^6 / 10^2
			10^2 / 10^6
			10^6 / 10^6
	1/2a Δ*pfrA* Δ*sigB*	3 / 6 / 9 / 24 / 48 / 60	10^6 / 0
			10^2 / 0
			10^6 / 10^2
			10^2 / 10^6
			10^6 / 10^6
LR	1/2a Selvagem	3 / 6 / 9 / 24	10^6 / 0
			10^2 / 0
			10^6 / 10^2
			10^2 / 10^6
			10^6 / 10^6
	1/2a Δ*pfrA* Δ*sigB*	3 / 6 / 9 / 24	10^6 / 0
			10^2 / 0
			10^6 / 10^2
			10^2 / 10^6
			10^6 / 10^6

* BHI – caldo infusão de cérebro e coração; LR – leite em pó integral reconstituído 10,0 % (p/v).

A cada tempo de amostragem as lâminas foram retiradas e lavadas com 20 mL de tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) para a remoção de células planctônicas. As células aderidas foram retiradas empregando-se o método *swab-vortex* (CHAE; SCHRAFT, 2000) descrito a seguir. Um *swab* (Absorve®, Brasil) umedecido em PBS foi aplicado por toda a superfície da lâmina de aço inoxidável, cerca de 100 vezes, sendo a seguir transferido para 10 mL de PBS e submetido à vigorosa agitação em *vortex* durante um minuto. Foram feitas diluições apropriadas da suspensão celular em solução de peptona 0,1 % (p/v) que foram transferidas para placas de Petri com ágar EMB para enumeração de *E. coli* e meio cromogênico ALOA para enumeração de *Listeria monocytogenes*. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 – 48 horas, sendo as colônias típicas contadas, as populações determinadas e expressas em $UFC.cm^{-2}$.

4.2.4 Efeito do meio pré-condicionado por *E. coli* sobre a capacidade de *L. monocytogenes* em formar biofilme

4.2.4.1 Preparação do meio pré-condicionado (MPC) de *E. coli* ATCC 8739

E. coli ATCC 8739 foi inoculada em caldo BHI e incubada a 37 ºC *overnight*. Em seguida realizou-se diluição 1:100 (v/v) em frasco Erlenmeyer contendo 500 mL de caldo BHI mantido a 37 ºC sob agitação (180 rpm) até atingir o final da fase exponencial (*late log*). O cultivo foi centrifugado (8.000 x g/ 10 min/ 4 ºC) e parte do sobrenadante foi esterilizada por filtração utilizando membrana de 0,22 µm (Corning, EUA), e agora chamada de meio pré-condicionado (MPC).

O pH foi verificado minutos antes da inoculação do meio de cultivo com a cultura de *Lm*. Uma alíquota foi retirada e avaliada em pHmetro (W3B, Bel Engineering, Itália).

4.2.4.2 Formação de biofilme por *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável utilizando MPC

- Em suportes verticais com lâminas de aço inoxidável de 15 cm^2

Foi utilizada metodologia semelhante à apresentada no item 4.2.3 utilizando a mesma temperatura de incubação (25 ºC) e os tempos para amostragem de 0,5, 1, 3, 4,5, 6 e 24 horas.

Para esta avaliação inóculos de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a selvagem foram adicionados ao MPC de forma a obter populações finais em caldo de aproximadamente 10^2 e 10^6 UFC.mL^{-1}. O procedimento para enumeração das células viáveis aderidas foi o mesmo empregado anteriormente (item 4.2.3.3), porém a enumeração foi realizada somente em meio cromogênico ALOA, uma vez que não havia células de *E. coli* no caldo. Todos os experimentos foram realizados três vezes e sempre acompanhados de um teste controle, composto por caldo BHI fresco.

A população de *L. monocytogenes* em caldo foi determinada, a cada tempo de amostragem das lâminas, com a retirada de uma alíquota do meio de cultivo, seguida da diluição seriada em solução de peptona 0,1 % (p/v) e semeadura em ágar ALOA (Merck), com incubação a 37 ºC durante 24 – 48 horas. O resultado foi expresso em UFC.mL^{-1}.

- Em placa de poliestireno e lâminas de 1 cm^2

Neste ensaio foram utilizadas placas de poliestireno para cultura de células com 24 poços de fundo chato (TPP®, Suiça), e lâminas de aço inoxidável AISI 304 #4 medindo 1 cm^2.

As lâminas limpas e esterilizadas (item 4.2.3.1) foram colocadas nas placas, uma lâmina por poço. O MPC por *E. coli* E2348/69 foi preparado conforme item 4.2.4.1 e a cultura de *L. monocytogenes* conforme item 4.2.1. Inoculou-se o MPC com a suspensão de *Lm*, de forma a obter concentrações do patógeno de aproximadamente 10^2 e 10^6 UFC.mL^{-1}. A seguir, 1,5 mL dessa solução foram adicionados a cada poço, sendo utilizadas 16 lâminas para cada concentração de *Lm*. Caldo BHI fresco inoculado com *Lm* e caldo BHI inoculado com *E. coli* 042 foram utilizados como controles positivos. As placas foram incubadas a 25 ºC por até 24 horas, sendo quatro lâminas retiradas para cada concentração de *Lm* após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata.

MPC e caldo BHI, ambos com a suspensão de *Lm*, também foram incubados a 25 ºC para monitoramento da população através da leitura da absorbância (A_{600}) ao longo de 24 horas de incubação.

Após o período de incubação as lâminas foram transferidas para uma nova placa, seguindo a metodologia para a quantificação do biofilme por método indireto descrita por O'Toole (2011), com modificações, a saber. Cada lâmina foi lavada duas vezes com tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) para remoção das células não aderidas; em seguida foram coradas com 1,5 mL de solução de cristal violeta 0,1 % (p/v) por 15 minutos sendo lavadas por três vezes com PBS. As placas contendo as lâminas foram secas a temperatura ambiente e posteriormente o biofilme corado foi solubilizado com um mL de ácido acético glacial 33,0 % (v/v) (Synth) e 150 µL de cada solução foram transferidos para placas de 96 poços que foram submetidas à avaliação da densidade óptica a 595 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific®, EUA). Valores de absorbância de lâminas incubadas em meio de cultivo não inoculado e, posteriormente, coradas foram utilizados como branco para correção do valor da absorbância encontrado.

4.2.5 Avaliação da presença do gene codificador do autoindutor AI-2 (*luxS*) e sua expressão por *E. coli*

Para avaliar a presença do gene *luxS* na cultura de *E. coli* ATCC 8739 foi realizado ensaio com a técnica de PCR utilizada por Sircili (2004).

Para extração do DNA da cultura de *E. coli* utilizou-se o Kit DNeasy® (Qiagen, Alemanha). A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Mastercycler epgradients 534 (Eppendorf®, Alemanha) empregando as seguintes condições: ciclo inicial a 94 ºC por 9 minutos; 30 ciclos de desnaturação de 94 ºC por 30 segundos; anelamento a 60 ºC por 1 minuto e extensão a 72 ºC por 1 minuto e 30 segundos; e ciclo final a 72 ºC por 7 minutos.

As reações de amplificação foram conduzidas em volume total de 50 µL contendo: 25 µL GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA); 0,5 µM de cada um dos primers (K1663: 5'-GTCGACGCCGCTGATACCGAACCG-3' e K1664: 5'-GTCGACGCGGTGCGCACTAAGTACAA-3' (SPERANDIO et al., 2001); 150 ng de DNA extraído; e 20 µL água Mili-Q estéril. Como controle positivo para amplificação do

gene *luxS* utilizou-se a cepa de *E.coli* EDL 933, sorotipo O157:H7, protótipo de EHEC. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0 % (p/v) em solução tampão de Tris-borato EDTA (TBE), posteriormente corados com solução brometo de etídio e visualização sob luz ultravioleta (UV). Utilizou-se nos géis o marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen, EUA).

Para a confirmação da produção de AI-2 foi realizado ensaio de autoindução (TAGA; XAVIER, 2011) descrito a seguir, empregando a cepa mutante biossensora *Vibrio harveyi* BB170. A cepa de *Vibrio harveyi* BB170 foi inoculada em 10 mL de caldo AB e incubada por aproximadamente 14 horas a 30 ºC sob agitação até atingir densidade óptica a 600 nm entre 1,0 e 1,2, sendo posteriormente diluída 1:5000 em caldo AB fresco.

Para os ensaios, 10 mL do MPC de *E. coli*, preparado conforme item 4.2.4.1, foram adicionados a frascos Erlenmeyer onde foram acrescentados 90 mL da cultura de *V. harveyi* diluída. Os frascos foram mantidos sob agitação (175 rpm) a 30 ºC e a cada uma hora, durante seis horas, retirou-se alíquotas da cultura para mensuração da luminescência utilizando-se um luminômetro (Sirius, Berthold®, Alemanha). Como controle negativo do teste utilizou-se caldo AB não inoculado.

4.2.6 Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em MPC com Furanona

Foi utilizada como inibidor do autoindutor a (Z)-4-Bromo-5-(bromometileno)-2-(5H)-furanona (Sigma-Aldrich, Suiça). A solução estoque foi preparada em etanol absoluto (Synth), esterilizada por filtração com membrana de 0,22 µm (Millipore) e armazenada a -20 ºC.

Para a realização do ensaio preparou-se soluções de trabalho com concentração final de 10 e 25 µM em caldo BHI. *E. coli* E2348/69 proveniente de uma cultura *overnight* foi inoculada na solução de trabalho (1:100 v/v) e incubada a 37 ºC, sob agitação (180 rpm), até o final da fase exponencial. O cultivo foi centrifugado (8.000 x g/ 10 min/ 4 ºC) e parte do sobrenadante foi esterilizada por filtração utilizando membrana de 0,22 µm (Corning, EUA). Esse produto foi chamado de meio pré-condicionado adicionado de furanona (MPC_F).

O inóculo de *Lm* (10^6 UFC.ml^{-1}) preparado conforme item 4.2.1 foi adicionado ao MPC_F e, a seguir, 1,5 mL dessa suspensão foram adicionados em poços de uma placa de 24 poços contendo uma lâmina de aço inoxidável por poço. Para avaliação do biofilme formado foram utilizadas quatro lâminas. MPC sem adição de furanona e inoculado com *Lm* foi empregado como controle. As placas foram incubadas a 25 ºC por 24 horas. As lâminas foram coradas e avaliadas conforme anteriormente descrito (item 4.2.4.2). O experimento foi realizado em triplicata.

MPC_F, nas duas concentrações de furanona, e MPC (controle), inoculados com a suspensão de *Lm*, também foram incubados a 25 ºC para monitoramento da população em caldo através da leitura da absorbância (A_{595}) ao longo de 24 horas de incubação.

4.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste *t* de Student, ao nível de 5,0 % de significância. Foi utilizado o Software Statistica versão 12.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* à *E. coli* ou a compostos produzidos por *E. coli*

Anteriormente aos ensaios de formação de biofilme realizou-se uma avaliação do crescimento em caldo de ambos os micro-organismos, isoladamente e em co-cultura, verificando-se assim se ocorria alguma inibição da multiplicação celular quando em cultivo misto.

Conforme dados apresentados na Figura 2, verifica-se que, quando a população inicial de *E. coli* (10^6 UFC.mL^{-1}) era superior a de *Lm* (10^2 UFC.mL^{-1}) (D), a população final de *Lm* foi semelhante à população final de *Lm* em monocultura, com mesmo inóculo inicial (A). As médias das enumerações das populações finais não apresentam diferenças estatísticas significativas ($p \geq 0{,}05$) o que permite concluir que, em solução, os dois micro-organismos se desenvolvem sem interferência.

Porém ao analisar as curvas C e D que possuem diferentes concentrações iniciais de *Lm*, 10^6 UFC.mL^{-1} e 10^2 UFC.mL^{-1} respectivamente, e igual concentração de *E. coli*, (10^6 UFC.mL^{-1}), verifica-se que quando iniciada com uma menor concentração as populações, após 24 horas, são cerca de um log inferior quando comparadas à curva derivada de uma maior concentração bacteriana, apesar da diferença não serem estatisticamente diferentes. Com esta observação pode-se supor que *E. coli* estaria influenciando o desenvolvimento de *Lm* em caldo, o que poderia ocorrer por diferenças no tempo de geração de novas células, pela competição por nutrientes ou por produção de algum composto inibidor.

Os dados encontrados corroboram com os de Aragon-Alegro (2007), que relatou para o teste *in vitro* em meio líquido, capacidade da cultura de coliformes de inibir *Lm.* Quando *Lm* foi cultivada isoladamente, as populações finais foram mais elevadas que aquelas presente no caldo que continha *Lm* e coliformes (83,6 % das cepas presentes eram *E. coli*). Aragon-Alegro utilizou a concentração 1 UFC.mL^{-1} de *Lm* e, neste caso, quando sozinha em solução, *Lm* obteve um aumento de oito log na população ao longo de 24 horas, mas na presença de coliformes não houve multiplicação celular capaz de ser

detectada pela técnica empregada, indicando que em baixas concentrações *Lm* poderia ser inibida por coliformes.

Na avaliação da sensibilidade *in vitro* em meio sólido, utilizando-se o teste de difusão em poços e o método da gota, não foi verificada a formação de halos de inibição de *L. monocytogenes* pela cepa de *E. coli*. O mesmo aconteceu quando se avaliou os compostos produzidos por *E. coli*, através do método da gota e de antagonismo por inoculação em poços, o que sugere que a cepa de *Listeria monocytogenes* empregada não é sensível à *Escherichia coli* e/ou compostos produzidos por esta última.

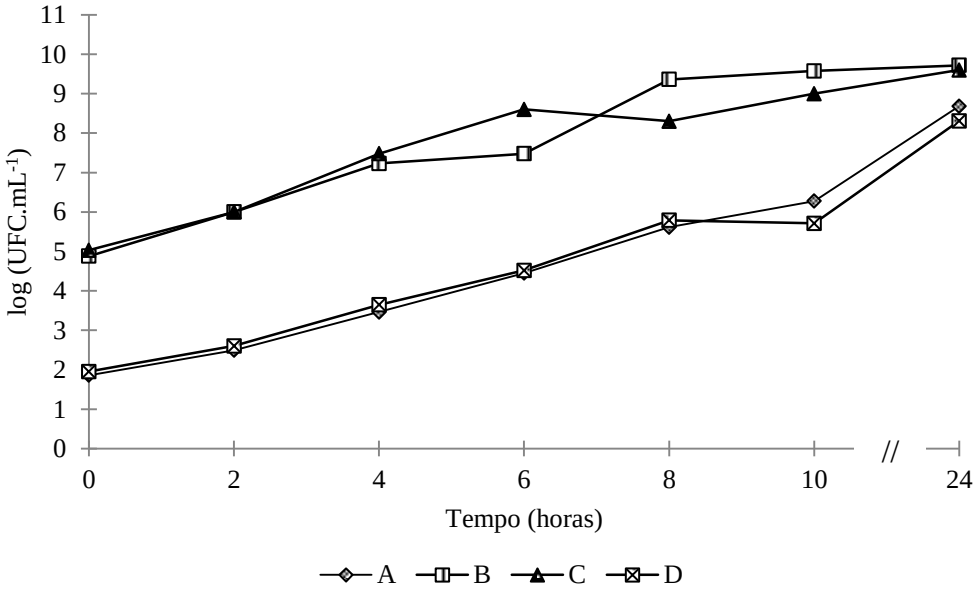


Figura 2. Populações médias de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em caldo infusão cérebro e coração - BHI, incubado a 37 ºC por até 24 horas. Concentrações inicial do inóculo: **A –** *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1}; **B** – *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1}; **C** – *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1} e *E. coli* 10^6 UFC.mL^{-1}; **D** – *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *E. coli* 10^6 UFC.mL^{-1}.

5.2 Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em superfície de aço inoxidável

Em ensaios preliminares foi verificada a capacidade de formação de biofilme por *Lm* em superfície de aço inoxidável com incubação a 25 ºC. Essa temperatura foi escolhida para simular condições existentes em indústria alimentícia que apresentam problemas com biofilme como, por exemplo, tanques de produção de queijos. Valores acima dos da temperatura ambiente ou próximo à temperatura ótima de multiplicação do micro-organismo em estudo não retratariam uma condição encontrada num ambiente de processamento de alimentos. Outro fator importante é que à temperatura de 25 ºC, *L. monocytogenes* apresenta motilidade mediada por flagelos, característica que favorece a adesão à superfície (LEMON; HIGGINS; KOLTER, 2007).

Foram utilizados dois meios de cultivo, caldo BHI e leite integral em pó reconstituído 10,0 % (p/v). O leite foi utilizado na tentativa de simular um ambiente de processamento de produtos lácteos.

Verificou-se que *Lm* 1/2a selvagem e sua cepa mutante isogênica (Δ*pfrA* Δ*sigB*) são capazes de formar biofilme em monocultura e em co-cultura com *E. coli* (Apêndice 1 e 2). Na Figura 3 estão apresentados valores da enumeração de células de *Lm* aderidas às lâminas no ensaio com população inicial de *L. monocytogenes* cerca de 10^4 vezes menor que a de *E. coli* (*Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}) utilizando-se caldo BHI. Para esta condição, o biofilme de *Lm* só foi quantificado a partir de 6 horas de incubação para *Lm* selvagem e, a partir de 9 horas para *Lm* mutante. Tomando-se como exemplo a amostragem no tempo 24h, para a cepa selvagem (Figura 3 - A), verifica-se que a quantidade de células de *Lm* aderidas nas lâminas é a aproximadamente metade da quantidade de células de *Ec* (2,58 log para *Lm* e 4,95 log para *Ec*).

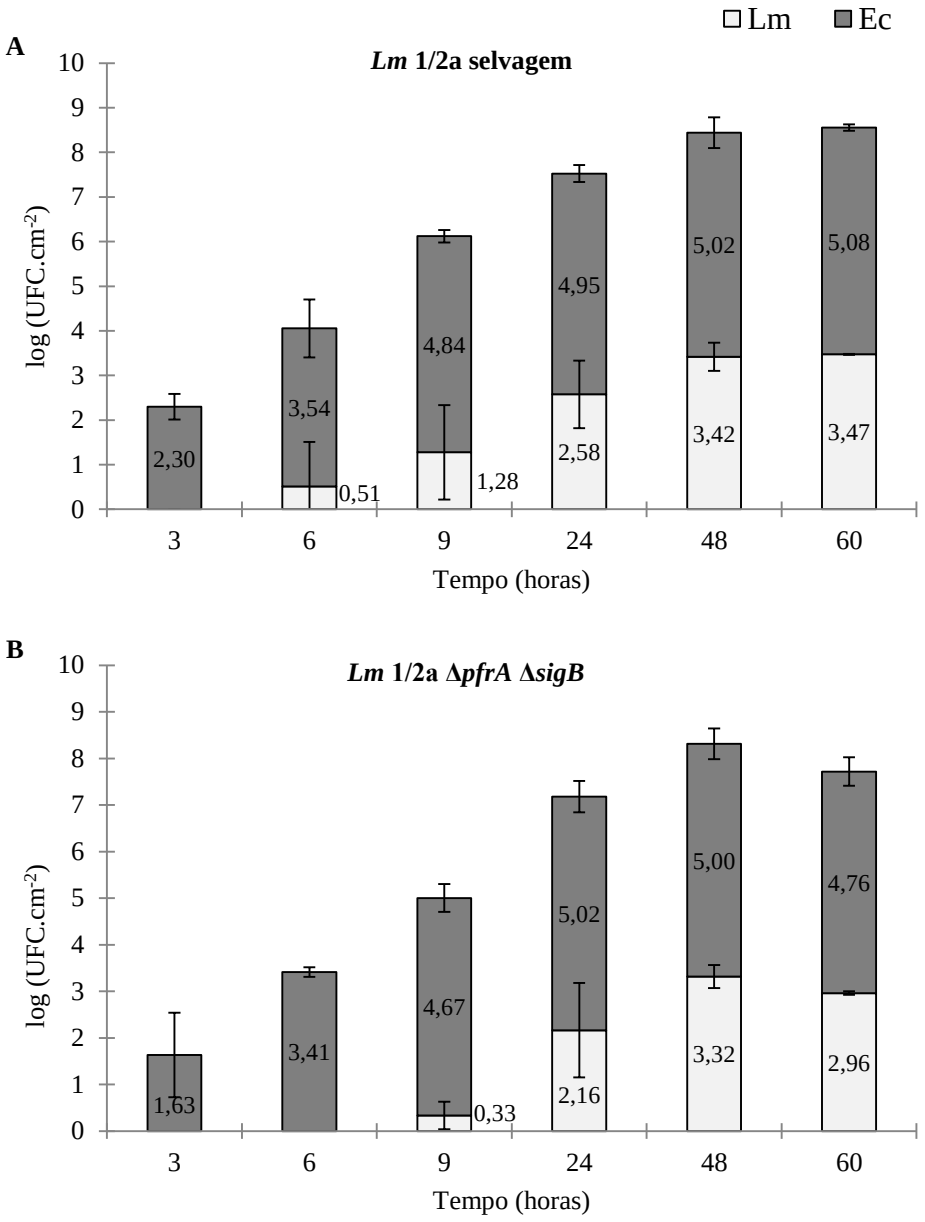


Figura 3. Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem (**A**), *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) (**B**) e *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI e mantidas a 25 ºC sob agitação constante. Concentração inicial do inóculo: *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}.

Na Figura 4 pode-se verificar menores populações de *Lm*, recuperadas na condição apresentada na Figura 3-A, em comparação aos valores de populações de *Lm* obtidas em monocultura, empregando-se concentração inicial de 10^2 UFC.mL^{-1} (Apêndice 1), o que indica que *E. coli* quando presente apresentou alguma interferência/influência na formação

de biofilme por *L. monocytogenes.* As populações finais médias no biofilme após 24, 48 e 60 horas para *Lm* em monocultura foram 4,53, 4,67 e 4,70 log, respectivamente, enquanto em co-cultura foram 2,58, 3,42 e 3,47 log, diferentes estatisticamente para cada tempo de amostragem citado ($p < 0,05$). Para a cepa mutante as diferenças também foram significativas, ao nível de 5 % de significância, nos dois últimos tempos.

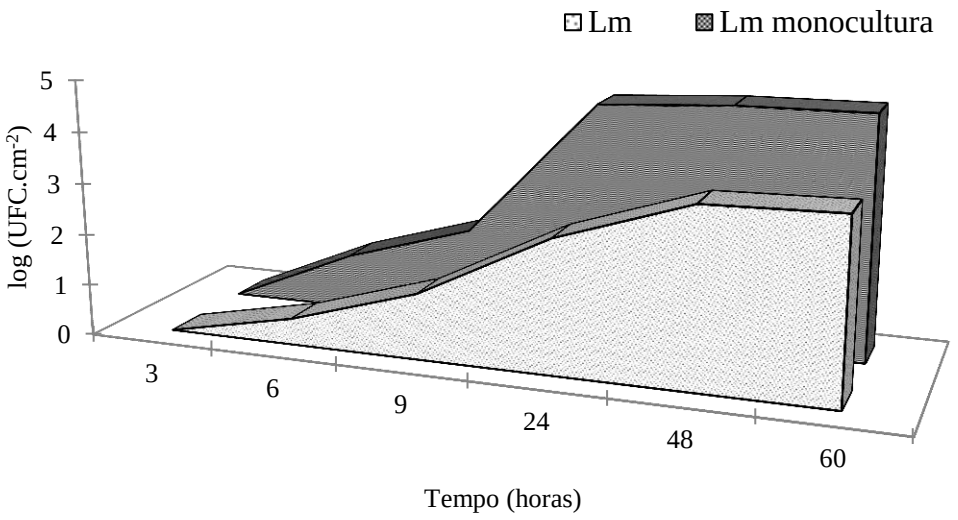


Figura 4. Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em monocultura e por *Lm* 1/2a selvagem em co-cultura com *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI e mantidas a 25ºC sob agitação constante. Concentração inicial do inóculo: *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}.

Para os experimentos com leite integral em pó reconstituído 10,0 % (p/v) o tempo máximo de incubação foi reduzido de 60 para 24 horas devido às características físico-químicas do leite e à sua acidificação, ocasionada pela cepa de *E. coli*, que atingiu valores de pH na faixa de 5,3 a 5,5, após 24 horas de incubação. Assim, foram realizadas quatro amostragens dentro do período de 24 horas.

As populações de *Lm* selvagem foram de 0,22, 0,44 e 2,58 log após 6, 9 e 24h, respectivamente (Figura 5). Para a cepa mutante encontrou-se valores de 0,30 e 2,65 log nos dois últimos tempos. Nos demais tempos de amostragem a população foi inferior ao limite de detecção (< 1 UFC.15cm^{-2}).

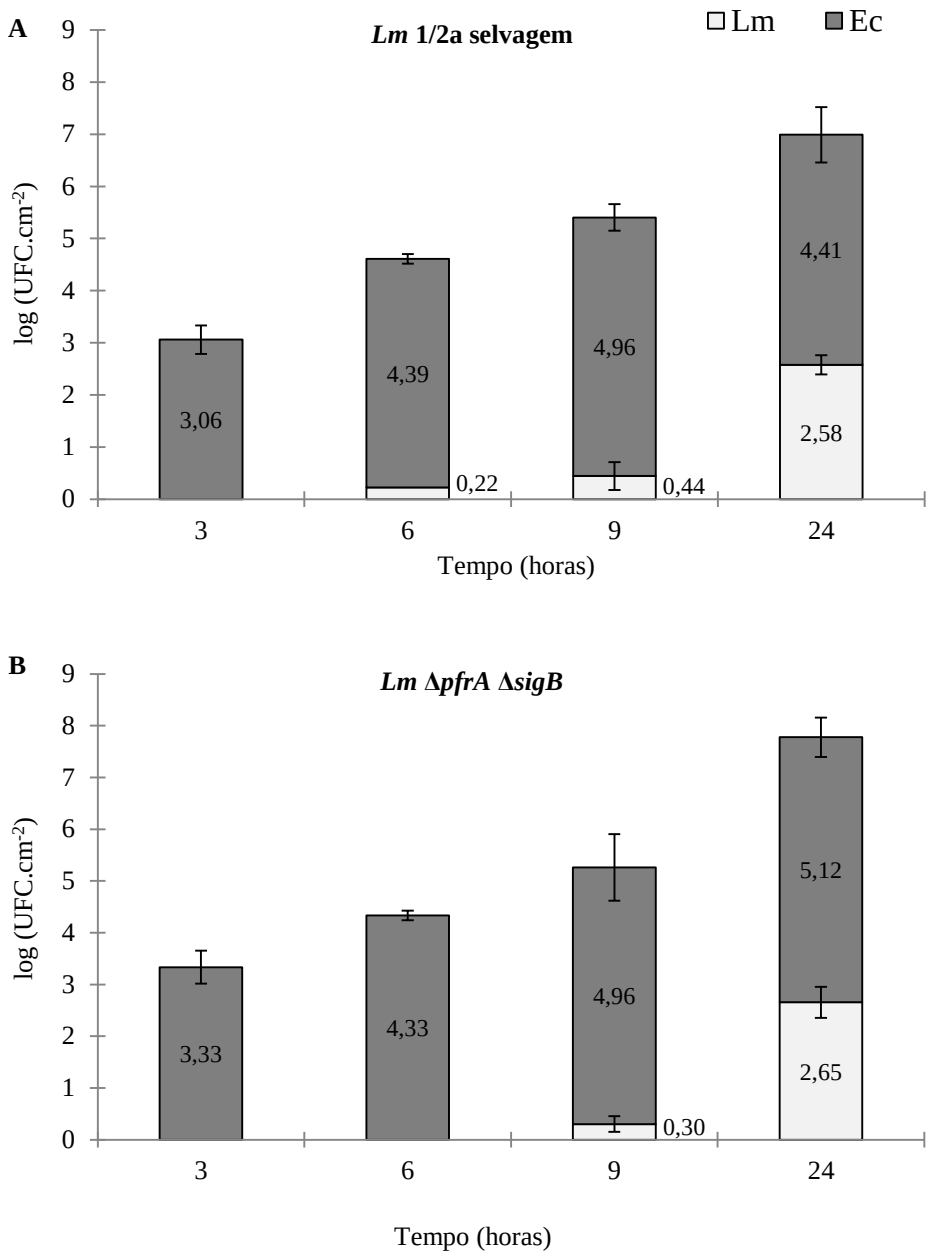


Figura 5. Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem (**A**), *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) (**B**) e *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em leite integral em pó reconstituído 10,0 % (p/v) e mantidas a 25 ºC sob agitação constante. Concentração inicial do inóculo: *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}.

Observa-se que, na condição *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}, as cepas de *L. monocytogenes* e *E. coli* apresentaram comportamentos semelhantes ao apresentado quando BHI foi utilizado como meio de cultivo. Ao comparar os valores de *Lm* da condição citada aos encontrados no ensaio em monocultura, em leite em pó integral

reconstituído, para as duas cepas, verifica-se diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para os tempos 9 e 24 horas (Apêndice 2).

O meio de cultivo é citado como um dos fatores que influenciam a formação de biofilme (DONLAN, 2002) e em se tratando do leite, sabe-se que esse proporciona a formação de um filme condicionante sobre a superfície, o qual oferece condições favoráveis à colonização inicial devido ao acúmulo de moléculas na interface líquido - sólido e, assim, gera condições para uma rápida adesão e consequente multiplicação celular (CHAMBERLAIN, 1992). Porém, diante dos resultados desses ensaios e considerando-se a facilidade de preparação do meio, optou-se por utilizar caldo BHI nos ensaios subsequentes.

A comparação dos resultados de estudos sobre formação de biofilme é dificultada pela interferência de métodos de amostragem e pelas condições experimentais empregadas (temperatura, superfície, meio de cultivo), o que pode influenciar a reprodutibilidade e, por conseguinte, a correlação dos dados (YANG et al., 2011; ALAVI; TRUELSTRUP HANSEN, 2013).

Na natureza e no ambiente de processamento de alimentos *Lm* é facilmente encontrada compondo biofilmes mistos e algumas bactérias como *Pseudomonas putida*, *P. fragi*, *P. fluorescens*, *Flavobacterium* ssp. e *Staphylococcus capitis* ou *S. aureus* são citadas como facilitadoras da adesão, colonização e formação de biofilme por *Lm* (BREMER, MONK, OSBORNE, 2001; CARPENTIER; CHASSAING, 2004; RIEU et al., 2008). Ainda, várias bactérias ácido-láticas (GUERRIERI et al., 2009; WINKELSTROTER et al., 2013; ZHAO et al., 2013) e *Staphylococcus sciuri* (LERICHE; CARPENTIER, 2000; MIDELET; KOBILINSKY; CARPENTIER, 2006) são citadas como inibidoras de biofilmes de *Lm*. Alavi e Truelstrup Hansen (2013) citam que as bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas fluorescens, Serratia proteamaculans* e *Shewanella báltica*, reduziram a população máxima no biofilme de *Lm* em co-cultura e aumentaram a inativação durante a dessecação.

São poucos os estudos de formação de biofilme com duas ou mais espécies, incluindo *L. monocytogenes,* presentes na literatura, sendo a maioria dos dados de

mecanismo de formação de biofilme foram derivadas de estudos com biofilme monoespécie. Um desses poucos estudos informa, que as interações entre as espécies *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* não influenciaram significativamente a capacidade de formação de biofilme por ambas, utilizando aço inoxidável como substrato (KOSTAKI et al., 2012).

Outro trabalho com biofilmes multiespécies encontrado foi o realizado por Almeida et al. (2011) que propuseram quantificar e visualizar biofilmes mistos compostos por *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Avaliando-se o perfil de biomassa de *Lm* e *S. enterica*, obtido pela coloração do biofilme por cristal violeta, os autores observaram que não houve diferença, tanto para o biofilme misto quanto para o biofilme monocultura (ALMEIDA et al., 2011). Porém, eles verificaram que quando *Lm* foi co-cultivada com *E. coli*, o perfil observado foi semelhante ao de *E. coli* em monocultura, dado relacionado ao fato de *Lm* produzir menores quantidades de EPS em comparação à *E. coli*.

Uma das interações mais comuns em biofilmes multiespécies é a competição (ZHAO, DOYLE; ZHAO, 2004). Micro-organismos podem competir por nutrientes, oxigênio e espaço disponível para colonizar. Substâncias tóxicas são secretadas por várias espécies microbianas para matar ou inibir o crescimento de outras. Além de interações competitivas existem as interações cooperativas, que são essenciais para a manutenção geral do biofilme (BURMØLLE et al., 2006). Sabe-se ainda que as células bacterianas são capazes de se comunicarem através de moléculas autoindutoras no processo conhecido como *quorum sensing*. Como os biofilmes apresentam elevadas concentrações de células, a atividade das moléculas autoindutoras e todo o mecanismo *quorum sensing*, relacionado à regulação da expressão de genes específicos, são considerados como componentes essenciais da fisiologia do biofilme (KJELLEBERG; MOLIN, 2002; PARSEK; GREENBERG, 2005).

A supressão do crescimento de populações bacterianas, em culturas multi-espécies, por uma única estirpe "dominante" é referenciada na literatura como “Efeito Jameson” (JAMESON, 1962). Este efeito é atribuído à produção de inibidores específicos de crescimento por uma espécie contra a outra e pode ser considerado como uma corrida entre as espécies para explorar os recursos do meio ambiente, visando maximizar os seus números populacionais (MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2008). Em estudo realizado

por Mellefont; McMeekin; Ross (2008) *L. monocytogenes* foi suprimida por todas as outras cepas testadas quando a sua concentração de inóculo foi menor. Porém, *E. coli* não teve seu crescimento suprimido por *L. monocytogenes*, mesmo quando a densidade de *E. coli* foi inicialmente menor, o que não condiz com a hipótese da limitação de nutrientes, que menciona que o desenvolvimento da população cessa quando os recursos de determinado ambiente se esgotam.

Com base nessas informações levantou-se a hipótese de que, de algum modo, a inibição do desenvolvimento de *Lm* por *E. coli* observada poderia estar ocorrendo não pelo consumo dos nutrientes, mas pela liberação de moléculas no ambiente circundante e que essas moléculas de alguma maneira sinalizariam às células de *Lm* que não era um bom momento para sua adesão e multiplicação, fator que interferiria na formação de biofilme.

5.3 Efeito do meio pré-condicionado por *E. coli* sobre a capacidade de *L. monocytogenes* formar biofilme

Verificada a capacidade de formação de biofilme na superfície de aço inoxidável pela cepa de *Listeria monocytogenes* 1/2a selvagem e sua mutante isogênica (Δ*pfrA* Δ*sigB*), partiu-se para a etapa de avaliação da causa da possível interferência de *E. coli* na quantidade de biofilme formado por *Lm* selvagem, utilizando MPC por *E. coli*.

Nos experimentos realizados foram utilizados MPC proveniente de uma cultura de *E. coli* 8739 obtida na fase *late log.* Sabe-se que, para *E. coli*, ocorre uma maior produção de autoindutores na transição da fase exponencial para a fase estacionária de crescimento, desaparecendo esses produtos rapidamente após essa transição (XAVIER, BASSLER, 2005).

Os bioensaios com o MPC, obtido conforme descrito no item 4.2.4.1, foram realizados em paralelo com ensaios em caldo BHI não pré-condicionado, considerados como ensaios controle.

As moléculas autoindutoras, sinalizadoras de quorum, causam influência nas etapas iniciais de formação do biofilme, e segundo Taga; Xavier (2011) tal sobrenadante livre de células, que contém as moléculas, deve ser utilizado assim que processado. Com base

nesses dados decidiu-se avaliar os biofilmes com amostragens em intervalos menores entre as retiradas das lâminas, por até 24 horas.

Na Figura 6 podem ser visualizados os resultados da enumeração das células viáveis de *Lm* aderidas às lâminas, que foram imersas em MPC inoculado com população de aproximadamente 10^2 UFC.mL^{-1} (A) e 10^6 UFC.mL^{-1} (B). Verifica-se que a quantidade de células de *Lm* que aderiram à superfície das lâminas foi igual em ambos os meios utilizados (MPC e controle), e para as duas concentrações iniciais, não apresentando diferenças estatísticas significativas ($p \geq 0,05$). Observando-se as populações nos tempos 3, 4,5 e 6 horas nota-se que não houve diferenças expressivas entre a quantidade de biofilme de *Lm*, que variou de 1,12 a 1,60 log no ensaio com inóculo inicial de 10^2 UFC.mL^{-1} (Figura 6 – A) e de 4,45 a 5,41 log no ensaio com inóculo inicial de 10^6 UFC.mL^{-1} (Figura 6 – B).

Nos mesmos tempos de amostragem das lâminas retirou-se também uma alíquota do meio de cultivo para avaliar a multiplicação celular de *Lm* em caldo, verificando-se o mesmo comportamento tanto em MPC como no controle, nas diferentes concentrações de inóculo (Figura 7). Pode-se notar um aumento de quase 5 log na população de *Lm* em caldo com inóculo inicial de 10^2 UFC.mL^{-1}, entre 6 e 24 horas (Figura 7 – A). Já para *Lm* com inóculo inicial de 10^6 UFC.mL^{-1} o aumento não ultrapassa 1 log, no mesmo intervalo. Considerando-se que os meios de cultivo foram mantidos sob agitação constante deve-se salientar que a multiplicação celular foi estimulada devido à aeração do meio.

No preparo do MPC, *E. coli* utilizou parte dos nutrientes presentes para sua multiplicação, o que causa a redução do mesmo, e essa menor disponibilidade de nutrientes poderia influenciar na multiplicação de *Lm*. Entretanto, os dados obtidos indicam que isso não ocorreu, não havendo comprometimento na taxa de multiplicação de *Lm*.

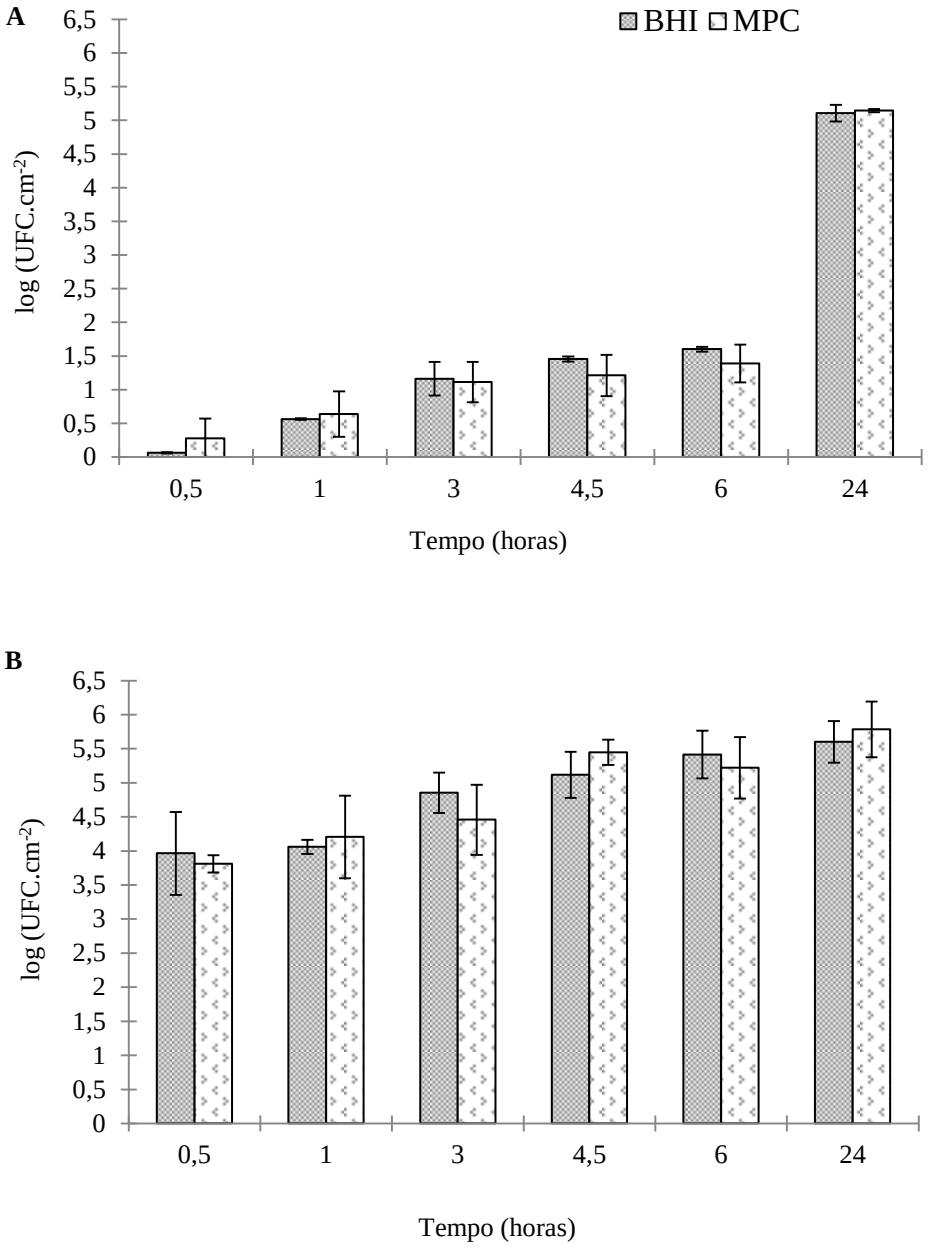


Figura 6. Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* 8739 – MPC e caldo infusão de cérebro e coração – BHI, mantidos a 25 ºC sob agitação constante. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}.

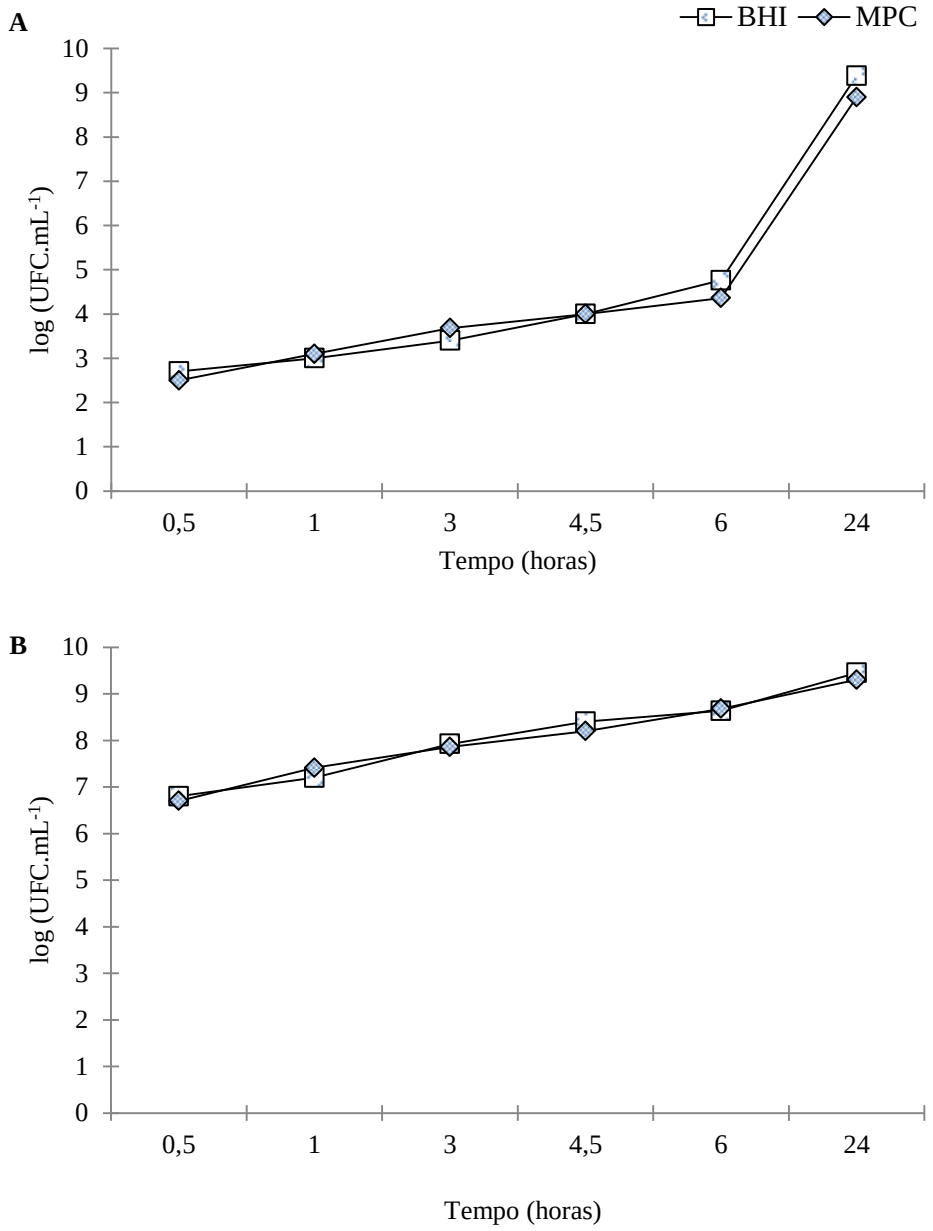


Figura 7. População de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em meio pré-condicionado por *E. coli* 8739 – MPC e caldo infusão de cérebro e coração – BHI, mantidos a 25 ºC sob agitação constante. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}.

O pH do MPC foi verificado antes da adição do inóculo de *Lm* e sempre esteve na faixa de 6,5 a 7,0, enquanto o pH do caldo BHI entre 7,0 e 7,4. Realizou-se um ensaio em paralelo (dados não apresentados) a fim de saber se essa diferença influenciaria de maneira expressiva a multiplicação de *Lm* em caldo. Para isso, utilizou-se MPC por *E. coli* 8739 ajustado a pH 6,5 e 7,0 com solução de NaOH (1 M) ou HCl (1 M). Verificou-se que *Lm*

foi capaz de multiplicar tanto em MPC pH 6,5 quanto em MPC pH 7,0. Essa diferença pode ser considerada pequena se for levada em consideração a capacidade que *Lm* tem de sobreviver e multiplicar mesmo em baixos valores de pH (4,6) (ICMSF, 1996).

Com base nos dados obtidos com o método de análise empregado não foi possível observar influência do MPC na formação de biofilme por *Lm*. Então, direcionou-se a pesquisa para a averiguação da capacidade de produção de moléculas autoindutoras, pela cepa de *E. coli* empregada, com o intuito de confirmar sua produção.

5.4 Avaliação da presença do gene codificador do autoindutor AI-2 (*luxS*) e sua expressão por *E. coli*

Pesquisou-se o gene *luxS* na cepa de *E. coli* ATCC 8739 até então utilizada nos experimentos e como controle positivo empregou-se a cepa de *E. coli* EDL 933, sabidamente portadora desse gene. O gene foi detectado na cepa de *E. coli* ATCC 8739, indicando a possibilidade da produção de moléculas autoindutoras (Figura 8). Entretanto, somente a presença do gene não é indicativa da sua expressão, o que requer teste de indução para confirmar.

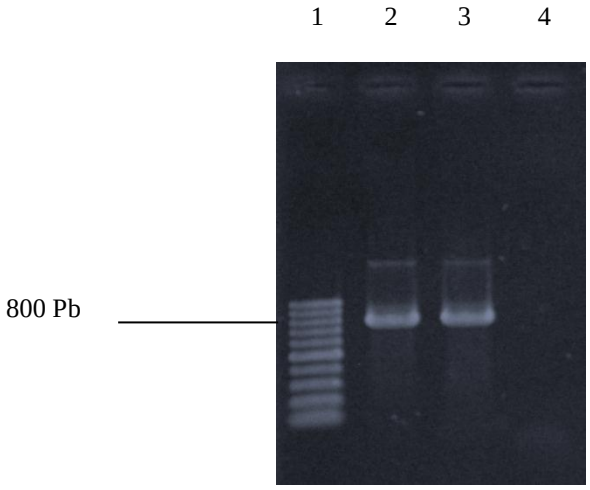


Figura 8. Presença do gene *luxS* em cepas de *Escherichia coli* EDL 933 (**2**) (controle positivo) e de *Escherichia coli* ATCC 8739 (**3**) em gel de agarose 1,0 % (p/v) corado com brometo de etídio. (**1**) - Marcador de peso molecular 1 kb; (**4**) - controle negativo da reação.

A presença de moléculas sinalizadoras AI-2 foi investigada utilizando o biossensor *Vibrio harveyi* BB170. Esse micro-organismo quando na presença do autoindutor expressa luminescência (SURETTE; BASSLER, 1999).

Nesse estudo, empregaram-se as cepas de *E. coli* 2348/69 e 042 que possuem *luxS* e o expressam. A intensidade da luminescência obtida por *V. harveyi* BB170, colocada em solução com o sobrenadante livre de células de *E. coli* ATCC 8739, foi de 452 e 369 RLU para o tempo 1 e 6h, respectivamente, próximos dos valores obtidos para o controle negativo (meio AB), 424 RLU (1h) e 333 RLU (6h).

Na Figura 9 verifica-se que a cepa de *E. coli* ATCC 8739, a qual estava sendo utilizada nos experimentos anteriores, não possui a capacidade de produção de AI-2, ao contrário das cepas controle (*E. coli* 2348/69 e 042) que apresentaram valores de 627 e 567 RLU na primeira mensuração, respectivamente. Ao longo do tempo, nota-se um decaimento dos valores de RLU, devido ao consumo das moléculas presentes em solução para a expressão de luminescência.

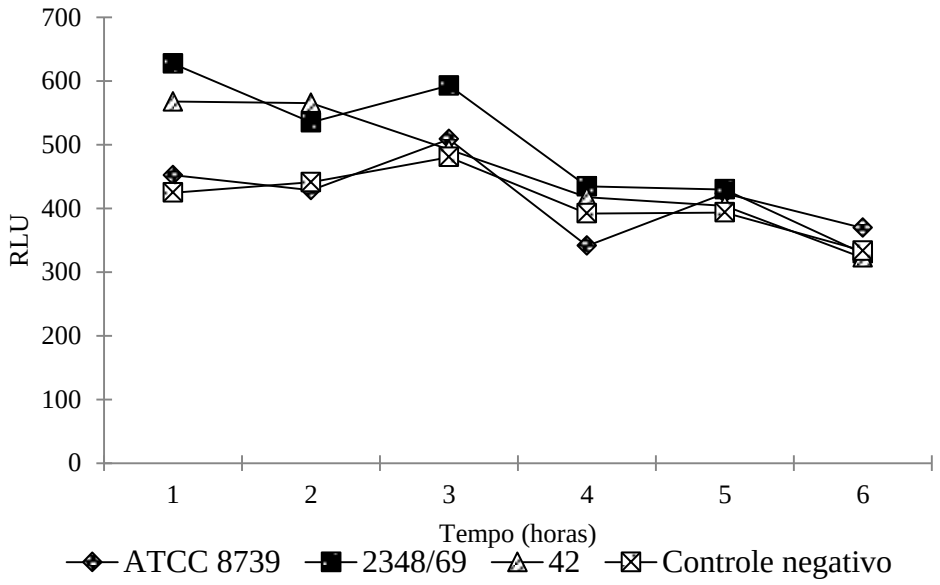


Figura 9. Indução de luminescência em cepa de *Vibrio harveyi* BB170 por autoindutor AI-2 de sobrenadantes livres de células de *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* 2348/69 e *E. coli* 042. RLU – *relative light units*.

As células de *Vibrio harveyi* BB170 apresentam uma mutação no gene sensor para AI-1 (autoindutor 1) e produzem bioluminescência exclusivamente na presença de AI-2. As células de *Vibrio harveyi* BB170 são também capazes de produzir o autoindutor AI-2,

pois o gene *luxS* continua intacto (TAGA; XAVIER, 2011). Segundo esses autores, durante os ensaios, à medida que a concentração de AI-2 exógeno presente nos sobrenadantes do cultivo de *E. coli* diminuiu, devido à degradação das moléculas, a produção de bioluminescência também diminuiu. Após este período, como o aumento da população de células de *Vibrio harveyi* BB170, ocorre o acúmulo de AI-2 endógeno induzindo novamente a bioluminescência.

A indução de luminescência proporcionada pelo acúmulo de AI-2 endógeno não pode ser verificada nesse estudo.

Diante dos dados obtidos optou-se pela realização de novos experimentos utilizando a cepa *E. coli* E2348/69 reconhecidamente produtora de AI-2 (Figura 9) em substituição à *E. coli* ATCC 8739.

5.5 Efeito do meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 sobre a capacidade de *L. monocytogenes* formar biofilme

5.5.1 *L. monocytogenes* 1/2a selvagem

Nesses ensaios foi utilizado o método indireto por coloração com cristal violeta para quantificar o biofilme aderido nas lâminas de aço inoxidável. Optou-se por trabalhar com placas de poliestireno para cultura de células, de 24 poços com fundo chato (TPP®) e lâminas de aço inoxidável AISI 304 #4 medindo 1 cm^2. Essa alteração de metodologia foi realizada devido à melhor aceitação deste método de quantificação e para facilitar comparações com outros estudos que a utilizaram.

Na Figura 10 são apresentados dados de absorbância obtidos após coloração das lâminas. Foram empregadas duas concentrações iniciais de *Lm* (10^2 e 10^6 $UFC.mL^{-1}$) e as placas foram incubadas a 25 ºC por até 24 horas, com leituras em 3, 6, 12 e 24 horas. Essa alteração nos tempos de leitura foi baseada nos resultados apresentados na Figura 6, onde não se observa diferenças na quantidade de biofilme formado até seis horas de incubação a 25 ºC.

Conforme pode ser observado, os valores obtidos nas lâminas com 12 e 24 horas de incubação, independente da concentração de *Lm* testada, indicam que houve uma maior adesão de células de *L. monocytogenes* e, subsequente formação de biofilme, nas lâminas imersas em caldo BHI (controle) quando comparadas com as lâminas imersas em MPC. Para o inóculo inicial de 10^6 UFC.mL^{-1} e tempo 24h, os valores de absorbância obtidos para as lâminas em MPC foram em média de 0,024 enquanto no caldo BHI a média foi de 0,041 (Figura 10 – B). Diferença significativa foi também observada para as amostras tomadas após 12h de incubação. Quando se avaliou o biofilme formado empregando-se inóculo inicial de 10^2 UFC.mL^{-1} no tempo 24h, obteve-se A_{595} de 0,022 para o caldo BHI e de 0,018 para o MPC por *E. coli* E2348/69, o que leva a supor que, de alguma forma, essas moléculas, estariam interferindo na formação de biofilme por *Lm*.

Baseando-se em dados da literatura, esperava-se obter diferenças significativas logo após três e seis horas de incubação, para ambas concentrações de *Lm* empregadas, devido à influência das moléculas autoindutoras nas primeiras fases da formação do biofilme. Essas moléculas sinalizariam a presença de *E. coli* e, de algum modo, retardariam a etapa de colonização e adesão à superfície. Esta interação não pode ser observada, mas isso não significa que não esteja ocorrendo, apenas que a técnica empregada não apresentou sensibilidade suficiente para essa detecção.

Os valores obtidos na enumeração de *Lm* 1/2a selvagem, nos dois meios empregados (MPC e BHI) e para a concentração inicial de *Lm* igual 10^6 UFC.mL^{-1}, estão apresentados na Figura 11. Observa-se que até sete horas de incubação os valores de DO obtidos para ambos os meios eram bastante semelhantes, sendo que a partir desse tempo, a DO de *Lm* em meio controle aumentou significativamente.

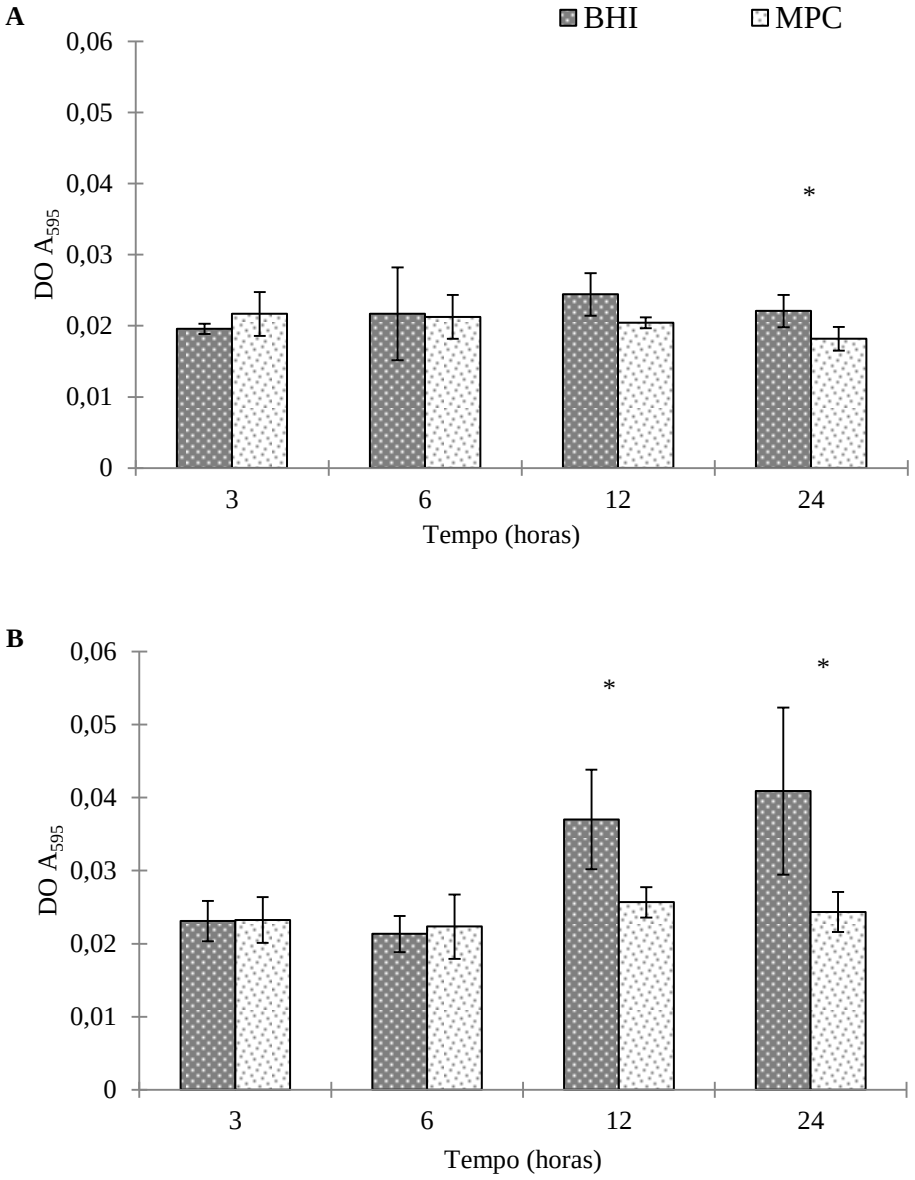


Figura 10. Biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e em caldo infusão de cérebro e coração – BHI, mantidas a 25 ^{o}C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}. ***** - diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*).

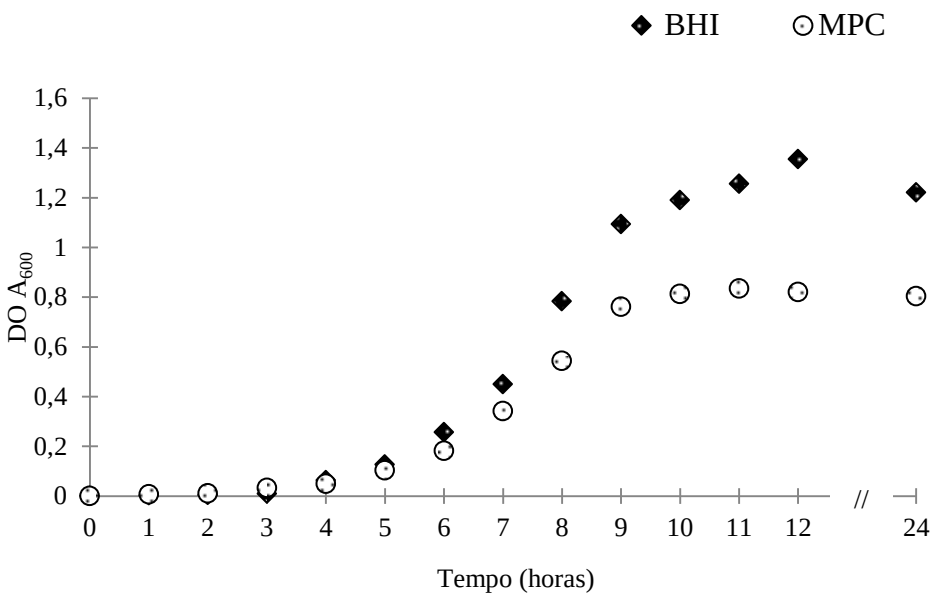


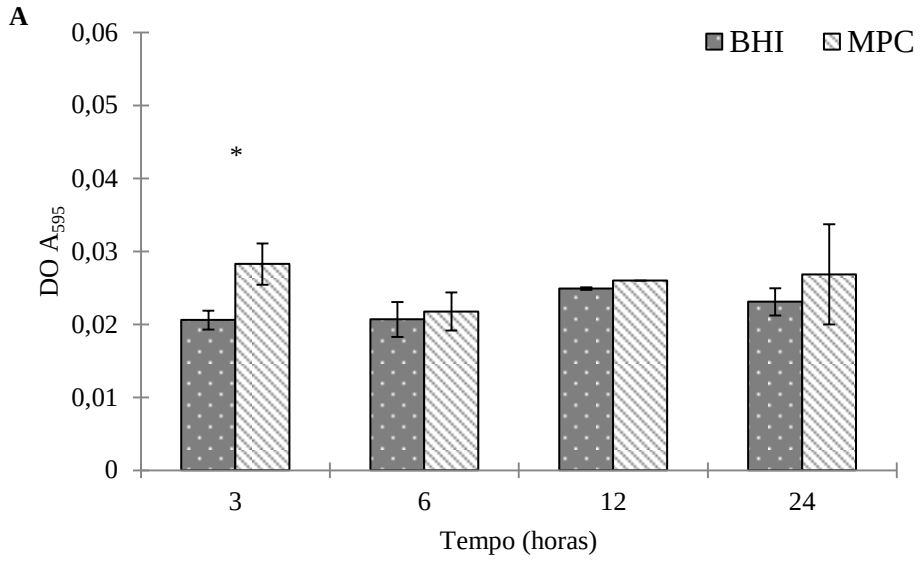
Figura 11. Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 ─ MPC e em caldo infusão de cérebro e coração – BHI (controle) com incubação a 25 ºC. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}.

Para a concentração inicial de *Lm* igual a 10^2 UFC.mL^{-1} obteve-se curva com comportamento semelhante. Esses dados reforçam a hipótese da presença de compostos inibidores no MPC.

5.5.2 *L. monocytogenes* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*)

A fim de verificar se a ausência dos genes *prfA* e *sigB* teria alguma influência na formação de biofilme por *Lm*, a cepa *Lm* 1/2a Δ*pfrA* Δ*sigB* foi avaliada em MPC por *E. coli* E2348/69. Na Figura 12 estão apresentados os dados obtidos para essa cepa de *Lm* frente às mesmas condições empregadas nos bioensaios com a cepa selvagem (item 5.5.1).

Independente da concentração inicial de *Lm* Δ*pfrA* Δ*sigB* utilizada (10^2 e 10^6 UFC.mL^{-1}) a quantidade de biofilme formado nos dois meios de cultivo foi equivalente ($p \geq 0,05$) para todos os tempos amostrados. Os valores de quantificação mais elevados foram observados para as lâminas que estavam imersas em MPC, ao contrário do observado no ensaio com a cepa selvagem (Figura 10). A razão dessa observação não pode ser identificada.



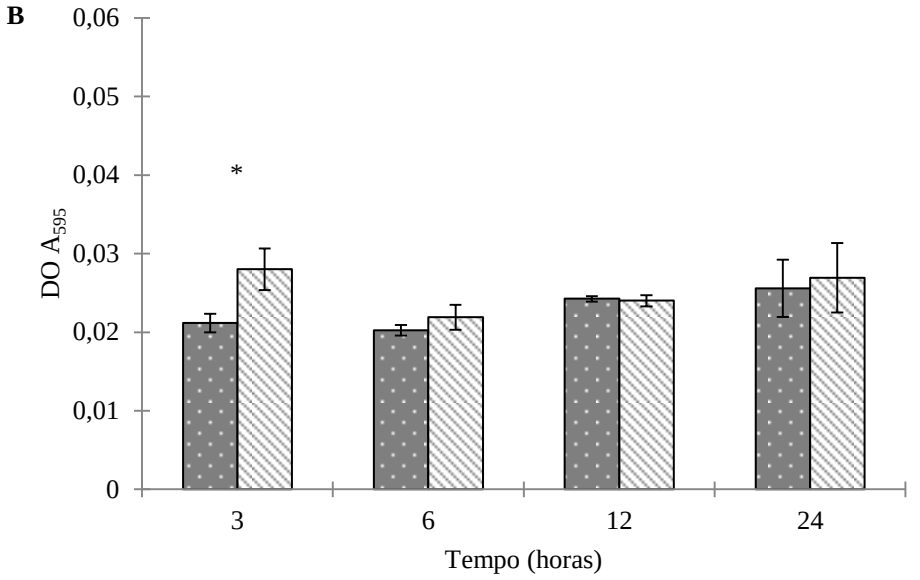


Figura 12. Biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e em caldo infusão de cérebro e coração – BHI, mantidas a 25 ^{o}C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}. ***** - diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*).

Na Figura 13 são apresentados os valores de absorbância obtidos para a cultura de *Lm* Δ*pfrA* Δ*sigB*, com inóculo inicial igual a 10^6 UFC.mL^{-1}, em MPC e caldo BHI (controle). A taxa de multiplicação foi igual para ambos os meios de cultivo, conforme já

havia sido verificada para a cepa *Lm* selvagem (Figura 11). Esse dado reforça a hipótese de haver, em solução, algum composto que interfira na multiplicação de *Lm*.

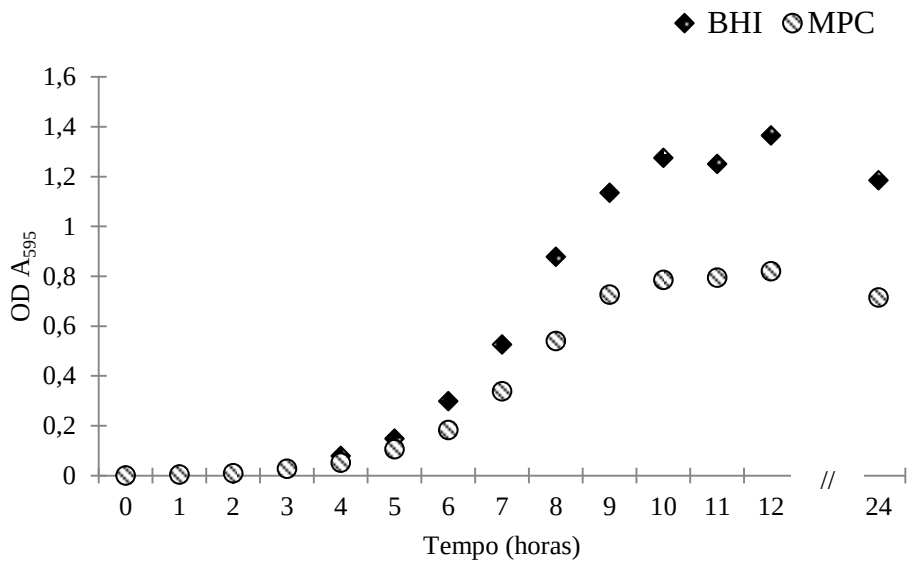


Figura 13. Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e em caldo infusão de cérebro e coração – BHI (controle) com incubação a 25 ºC. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}.

5.5.3 *Listeria monocytogenes* 1/2a selvagem *vs* *L. monocytogenes* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*)

Uma vez que foram observadas diferenças entre o comportamento de *Lm* selvagem e sua mutante isogênica optou-se por fazer a comparação da quantidade de biofilme formado por elas separadamente para o MPC e para o caldo BHI (controle).

A Tabela 2 apresenta as médias das densidades ópticas (A_{595}) após coloração das lâminas com cristal violeta para a cepa selvagem e sua mutante, após incubação por até 24h em MPC. Observa-se que para as amostras colhidas após 3h, nos dois níveis de inóculo, o comportamento das duas cepas testadas foi diferente ($p < 0,05$), tendo a cepa mutante produzido maior quantidade de biofilme (Figura 14). Comportamento semelhante foi observado após 24 horas de incubação quando o inóculo inicial de 10^2 UFC.mL^{-1} foi empregado (Figura 14 – A).

Tabela 2. Valores da quantificação indireta (± desvio padrão) de biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*), em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e incubadas a 25 °C

	10^2 UFC.mL^{-1}		10^6 UFC.mL^{-1}	
	Lm Selvagem	*Lm* Δ*pfrA* Δ*sigB*	*Lm* Selvagem	*Lm* Δ*pfrA* Δ*sigB*
3h	0,0217 ± 0,0086 **a**	0,0282 ± 0,0051 **b**	0,0232 ± 0,0039 **a**	0,0280 ± 0,0039 **b**
6h	0,0193 ± 0,0045 **a**	0,0217 ± 0,0037 **a**	0,0223 ± 0,0063 **a**	0,0219 ± 0,0040 **a**
12h	0,0282 ± 0,0114 **a**	0,0250 ± 0,0030 **a**	0,0256 ± 0,0047 **a**	0,0266 ± 0,0062 **a**
24h	0,0182 ± 0,0029 **a**	0,0285 ± 0,0122 **b**	0,0243 ± 0,0040 **a**	0,0260 ± 0,0056 **a**

a,b - letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*).

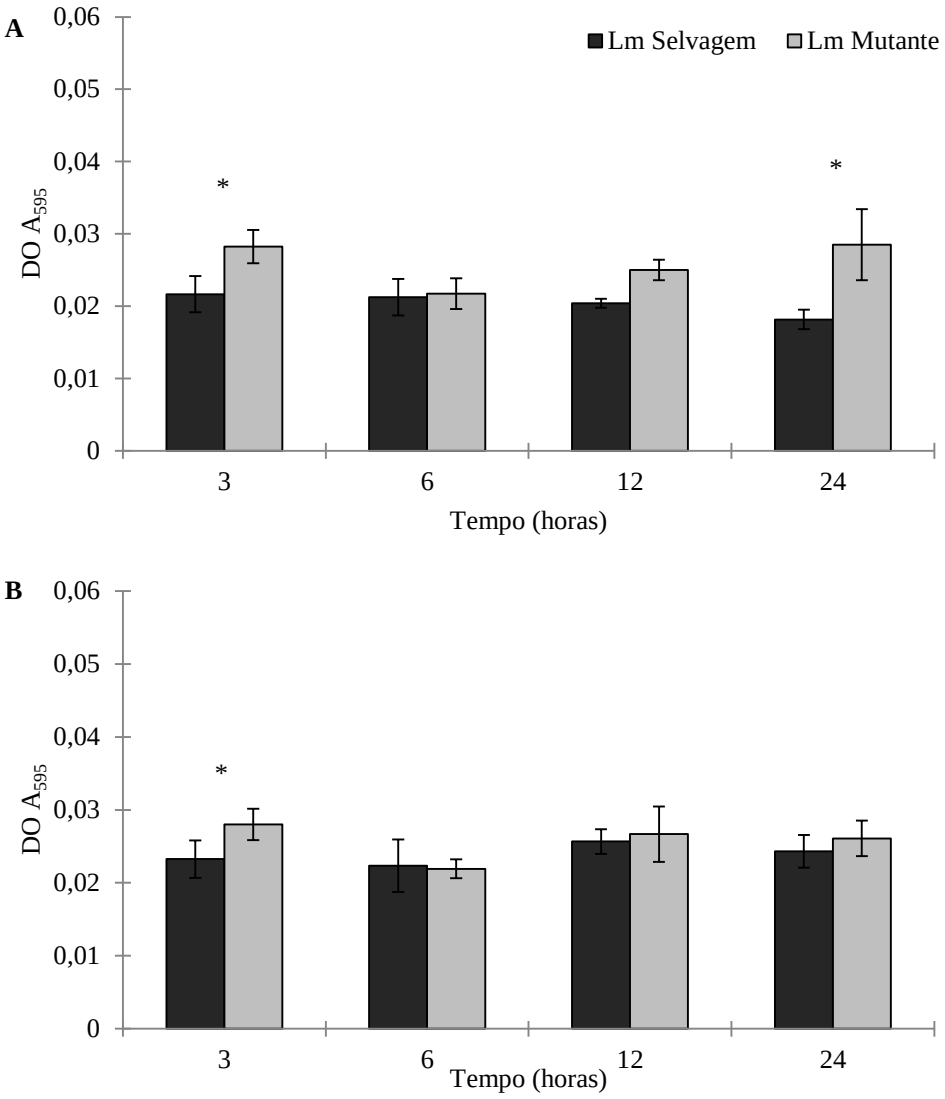


Figura 14. Biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e de *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC e incubadas a 25 °C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}. ***** - diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*).

Na Tabela 3 estão apresentados os valores obtidos na quantificação indireta do biofilme formado em caldo BHI. Observa-se que quando o inóculo inicial foi de 10^2 UFC.mL^{-1} não houve diferenças estatísticas ($p \geq 0,05$) entre o biofilme formado (Figura 15 – A). Já para o inóculo de 10^6 UFC.mL^{-1} ocorreu diferença significativa entre o biofilme formado pelas duas cepas, com 12 h e também com 24 horas, sendo a cepa selvagem mais apta para essa formação (Figura 15 – B).

Tabela 3. Valores da quantificação indireta (± desvio padrão) de biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*), em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI e incubadas a 25 ^{o}C

	10^2 UFC.mL^{-1}		10^6 UFC.mL^{-1}	
	Lm Selvagem	*Lm* Δ*pfrA* Δ*sigB*	*Lm* Selvagem	*Lm* Δ*pfrA* Δ*sigB*
3h	0,0196 ± 0,0032 **a**	0,0206 ± 0,0022 **a**	0,0231 ± 0,0056 **a**	0,0212 ± 0,0025 **a**
6h	0,0175 ± 0,0019 **a**	0,0207 ± 0,0040 **b**	0,0213 ± 0,0038 **a**	0,0202 ± 0,0026 **a**
12h	0,0244 ± 0,0044 **a**	0,0249 ± 0,0028 **a**	0,0370 ± 0,0073 **a**	0,0234 ± 0,0029 **b**
24h	0,0221 ± 0,0044 **a**	0,0229 ± 0,0033 **a**	0,0409 ± 0,0119 **a**	0,0274 ± 0,0044 **b**

a,b - letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*).

Os dados indicam que o comportamento da cepa selvagem é dependente da população inicial e que *Lm* mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) é menos apta para formar biofilme em meio de cultura não pré-condicionado. A deleção de *prfA* e *sigB* não interfere nos estágios iniciais de formação de biofilme em meio controle (até 6 horas de incubação), mas com 12 horas de incubação observa-se que a cepa selvagem quando presente em números elevados, consegue se estabelecer de maneira marcante (Figura 15 – B).

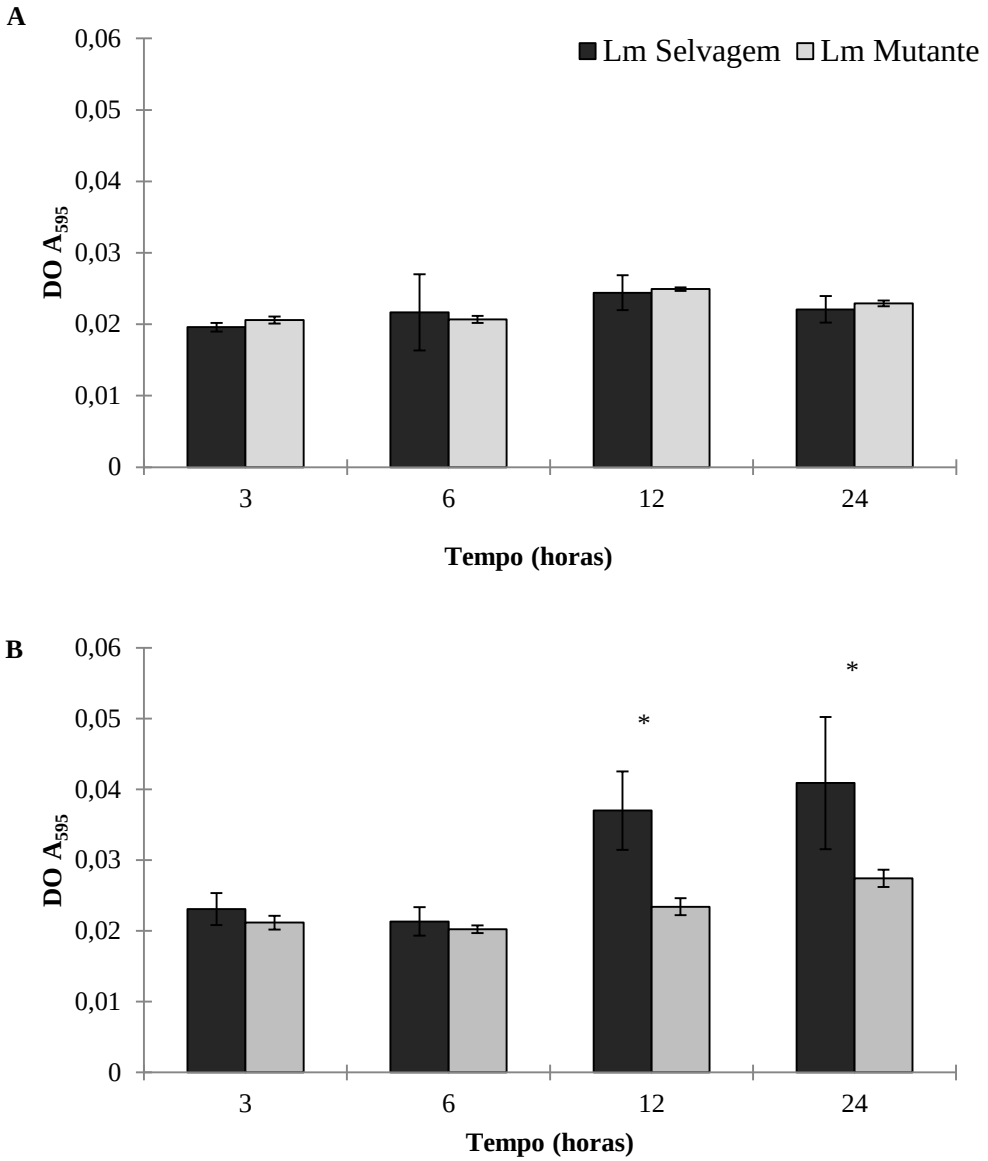


Figura 15. Biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e de *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI e incubadas a 25 ^{o}C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: **A** – 10^2 UFC.mL^{-1} e **B** – 10^6 UFC.mL^{-1}. ***** - diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*).

Esses dados corroboram o de outros estudos que também demonstram maiores quantidades de biofilme formado pela cepa de *Lm* 1/2a selvagem em comparação às cepas mutante Δ*pfrA*, Δ*sigB* e Δ*pfrA* Δ*sigB* (LEMON; FREITAG; KOLTER, 2010) e Δ*sigB* (VAN DER VEEN; ABEE, 2010). Van der Veen e Abee (2010) verificaram também que *sigB* é especificamente ativado durante a formação do biofilme e que quando foram avaliadas as condições de fluxo, a quantidade de biofilme formada por Δ*sigB* sob condições estáticas foi menor do que sob fluxo contínuo.

Tanto *sigB* quanto *prfA* não parecem estar relacionados aos estágios iniciais da formação de biofilme. Segundo Lemon, Freitag e Kolter (2010) a diferença na formação de biofilme está relacionada com eventos pós o estágio de adesão inicial. Isso foi verificado em ensaio de ligação à superfície, realizado dentro do período de 200 minutos após inoculação do meio de cultivo, onde *Lm* 1/2a selvagem e *Lm* Δ*pfrA* apresentaram valores semelhantes de adesão nesse tempo. Schwab et al. (2005) observaram que *sigB* não é essencial para a fixação inicial à superfície.

Por outro lado, a dupla deleção favoreceu a formação de biofilme nos estágios iniciais de incubação em MPC (Figura 14), indicando que um desses genes pode estar relacionado ao reconhecimento das possíveis moléculas inibidoras produzidas por *E. coli* E2348/69.

5.6 Formação de biofilme por *L. monocytogenes* em MPC com furanona

Supondo haver alguma molécula presente em solução e que estaria impedindo, ou retardando, a formação de biofilme por *Lm,* realizou-se um ensaio com a adição de furanona na preparação do MPC com o intuito de interferir no reconhecimento das moléculas sinalizadoras de quorum. O mecanismo de ação das furanonas não foi elucidado até o momento, porém sabe-se que possui capacidade de inibir a formação de biofilme sem afetar a taxa de multiplicação celular (HENTZER et al., 2002; HE et al, 2012; SHETYE et al., 2013).

Para a preparação do MPC com furanona (MPC_F) uma solução de furanona foi adicionada ao caldo BHI, nas concentrações finais de 10 e 25 µM.

Na Tabela 4 estão expressas as médias da quantidade de biofilme formado após 24 horas de incubação a 25 ºC, nos ensaios com a cepa selvagem e sua mutante isogênica (Δ*pfrA* Δ*sigB*) para o MPC_F por *E. coli* E2348/69 e para o controle empregado (MPC sem adição furanona).

Ao ser comparada a quantidade de biofilme formado em $MPC_{F[10]}$ e MPC (controle), não foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($p \geq 0,05$) para ambas cepas, mas com o aumento da concentração de furanona ($MPC_{F[25]}$) verifica-se

maior quantidade de biofilme em comparação ao $MPC_{F[10]}$ e MPC, porém com diferença estatística significativa somente para a cepa mutante, entre $MPC_{F[25]}$ e MPC (Tabela 4). A furanona presente no meio possivelmente interferiu no reconhecimento das moléculas autoindutoras produzidas por *E. coli* e com isso influenciaram a formação de biofilme por *Lm*.

Tabela 4. Valores da quantificação indireta (±desvio padrão) de biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e *Lm* 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*), em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4 e incubadas a 25 ^{o}C por 24 horas. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}

	Lm Selvagem	*Lm* Δ*pfrA* Δ*sigB*
$MPC_{F[25]}$ [1]	0,0215 ± 0,0034 **a**	0,0088 ± 0,0005 **a**
$MPC_{F[10]}$ [2]	0,0149 ± 0,0062 **a**	0,0059 ± 0,0008 **ab**
MPC[3]	0,0156 ± 0,0012 **a**	0,0039 ± 0,0010 **b**

[1] meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 adicionado de furanona na concentração de 25 µM;
[2] meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 adicionado de furanona na concentração de 10 µM;
[3] meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69;
a,b - letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*).

Nas Figuras 16 e 17 são mostradas as curvas referentes ao comportamento em caldo de *Lm* selvagem e sua mutante, respectivamente. Observa-se nas duas figuras que a adição de furanona, antes do condicionamento do meio, não interferiu na capacidade das células planctônicas se multiplicarem. Entretanto, as populações obtidas empregando-se o $MPC_{F[25]}$ foram ligeiramente superiores para ambas cepas a partir de 6h de incubação e, um pouco mais tarde (7 e 9h, respectivamente, para *Lm* selvagem e sua mutante) quando furanona estava presente na concentração de 10 µM.

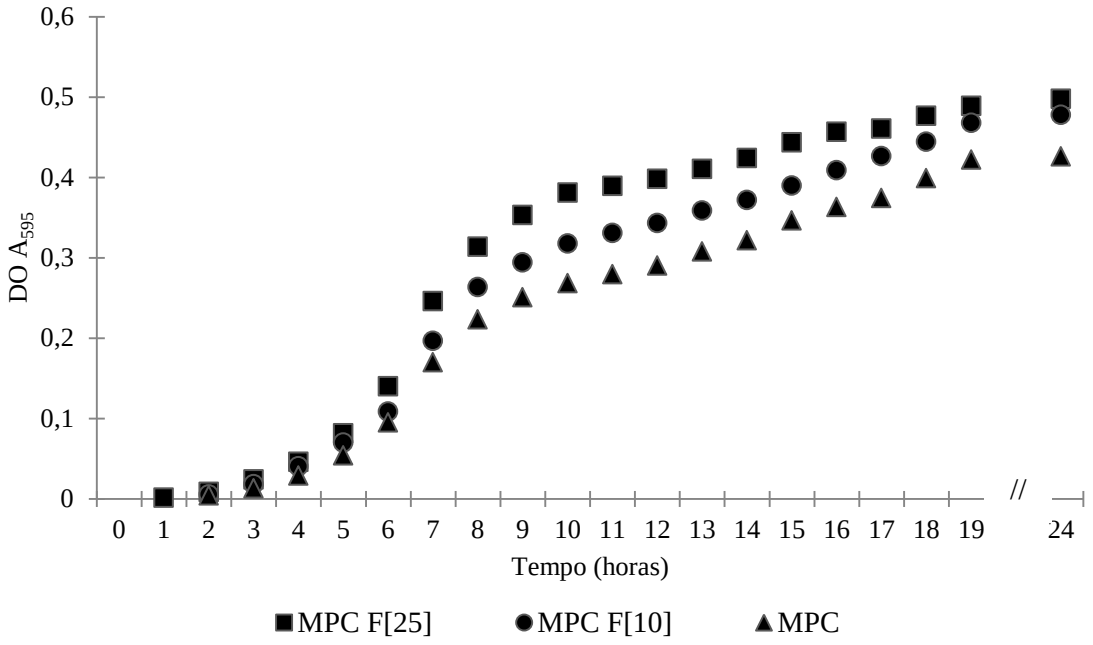


Figura 16. Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC adicionado de furanona nas concentrações 10 e 25 µM ($MPC_{F[10]}$; $MPC_{F[25]}$) e em MPC por *E. coli* E2348/69 sem adição de furanona, com incubação a 25 ^{o}C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}.

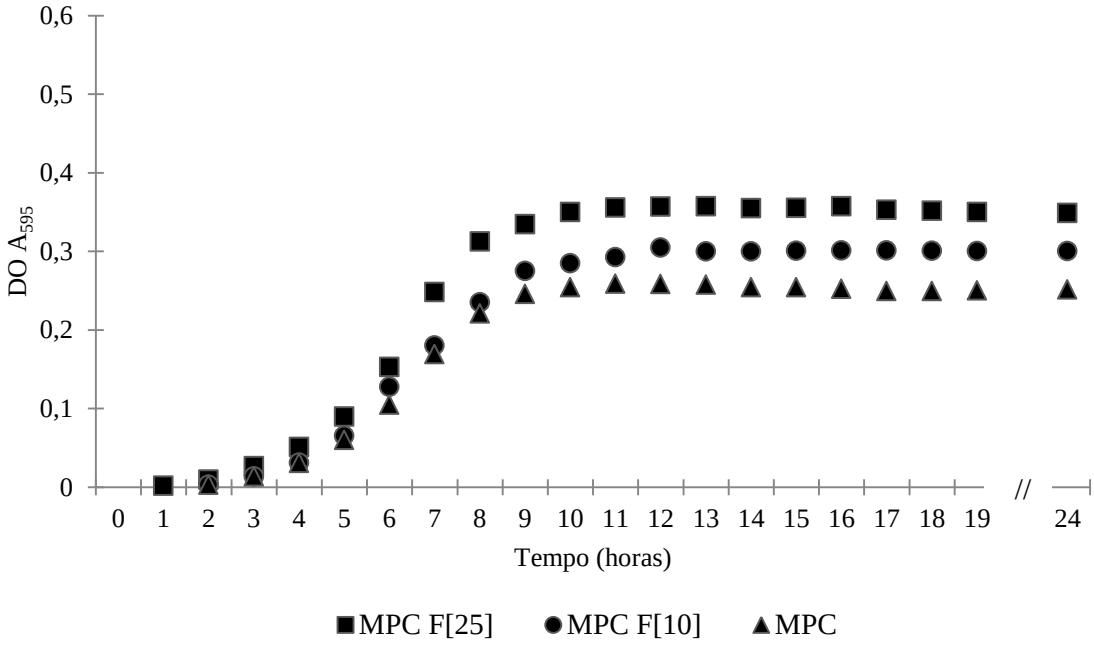


Figura 17. Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a mutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC adicionado de furanona nas concentrações 10 e 25 µM ($MPC_{F[10]}$; $MPC_{F[25]}$) e em MPC por *E. coli* E2348/69 sem adição de furanona, com incubação a 25 ^{o}C. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}.

A influência da adição de furanona, ao MPC, na formação de biofilme pode ser visualizada na Figura 18. Os valores são maiores para a cepa selvagem em comparação à sua mutante, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) para os três tratamentos empregados.

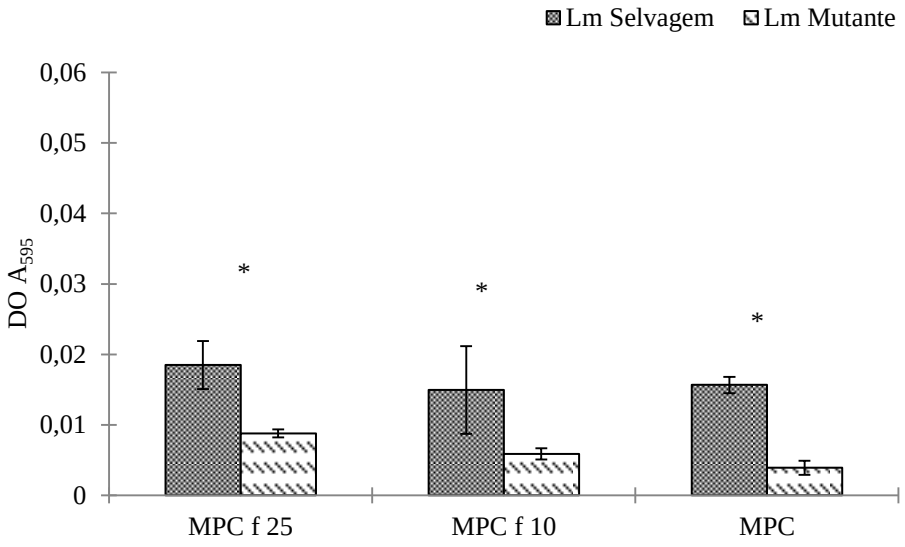


Figura 18. Biofilme de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e de *Lm* 1/2a smutante (Δ*pfrA* Δ*sigB*) em lâminas de aço inoxidável AISI 304#4, imersas em meio pré-condicionado por *E. coli* E2348/69 – MPC adicionado de furanona nas concentrações 10 e 25 µM ($MPC_{F[10]}$; $MPC_{F[25]}$) e em MPC por *E. coli* E2348/69 sem adição de furanona, com incubação à 25 ^{o}C por 24 horas. Concentração inicial do inóculo de *Lm*: 10^6 UFC.mL^{-1}. ***** - diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste *t*).

Pode-se afirmar, mais uma vez, que a presença dos genes *pfr*A e *sigB* se faz necessária para um comportamento semelhante ao da cepa selvagem em relação à formação de biofilme por *Lm.* Além disso, verifica-se que uma maior concentração de furanona é necessária, durante o condicionamento do meio, para se obter diferenças significativas na quantidade de biofilme formado.

A utilização de determinados compostos que inibem o reconhecimento do sinal de quorum, como a furanona, está sendo estudada nos últimos anos como estratégia para impedir tanto a formação de biofilme quanto de outros fenótipos controlados pelo sistema *quorum sensing*. Os dados obtidos no presente estudo, para o ensaio com furanona, sugerem que há alguma relação entre o reconhecimento ou não das moléculas autoindutoras e consequente formação de biofilme por *Lm*. Há a necessidade de estudos

mais aprofundados para o entendimento das interações que possam estar ocorrendo e para a elucidação do mecanismo de ação das furanonas na inibição da formação de biofilme por *Lm*.

Este relato científico, de interação entre essas duas espécies bacterianas em biofilme, soma-se aos estudos citados e fornece dados para a elucidação dos mecanismos de formação de biofilmes mistos. O trabalho deverá ser continuado para que se possa identificar a(s) molécula(s) envolvida(s) e para que detalhes do processo sejam esclarecidos, visando o controle desses micro-organismos no contexto de segurança alimentar.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitem concluir que *Listeria monocytogenes* apresenta capacidade de formar biofilme em presença de *Escherichia coli*. Entretanto, a quantidade de biofilme pode variar de acordo com a cepa de *Escherichia coli* presente.

Pode-se afirmar que os genes *prfA* e *sigB* estão envolvidos na formação de biofilmes e sua presença é necessária para a formação de biofilme em quantidades similares ao da cepa selvagem em meio não pré-condicionado.

Há interação e interferência de moléculas autoindutoras produzidas por *E. coli* E2348/69 na produção de biofilme por *Listeria monocytogenes* 1/2a selvagem e sua mutante isogênica (Δ*pfrA* Δ*sigB*).

7. REFERÊNCIAS

AARNISALO, K.; RAASKA, L.; WIRTANEN, G. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* in lubricants used in the food industry. **Food Control**, v.18, p.1019-1025, 2007.

ALAVI, H.E.D.; TRUELSTRUP HANSEN, L. Kinetics of biofilm formation and desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens, Serratia proteamaculans* or *Shewanella baltica* on food-grade stainless steel surfaces. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v.29, n.10, p.1253-1268, 2013.

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, n.3, 2011.

ARAGON-ALEGRO, L.C. **Influência dos coliformes no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal**. São Paulo, 2007. 84p. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2007.

BASSLER, B.L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Current Opinion of Microbiology**, v.2, p.582-587, 1999.

BASSLER, B.L. Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. **Cell**, v.109, n.4, p.421-424, 2002.

BASSLER, B.L.; LOSICK, R. Bacterially speaking. **Cell**, v.125, n.2, p.237-246, 2006.

BERESFORD, M.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.1000-1005, 2001.

BERTSCH, D.; RAU, J.; EUGSTER, M.R.; HAUG, M.C.; LAWSON, P.A.; LACROIX, C.; MEILE, L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v.63, p.526-532, 2013.

BISHOP, D.K., HINRICHS, D.J. Adoptive transfer of immunity to *Listeria monocytogenes*. The influence of in vitro stimulation on lymphocyte subset requirements. **The Journal of Immunology**, v.139, p.2005-2009, 1987.

BOARI, C.A.; ALVES, M.P.; TEBALDI, V.M.R.; SAVIAN, T.V.; PICCOLI, R.H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p.886-895, 2009.

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.

BREMER, P.J.; MONK, I.; OSBORNE, C.M. Survival of *Listeria monocytogenes* Attached to Stainless Steel Surfaces in the Presence or Absence of *Flavobacterium* spp. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 9, p.1369-1376, 2001.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v.27, n.9, p.1017-1032, 2011.

BRIDIER, A. SANCHEZ-VIZUETE, P.; GUILBAUD, M.; PIARD, J.C.; NAÏTALI, M.; BRIANDET, R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, v.45, p.167-178, 2015.

BULLITT, E.; MAKOWSKI, L. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. **Nature**, v.373, n.6510, p.164-167, 1995.

BURMØLLE, M.; WEBB, J.S.; RAO, D.; HANSEN, L.H.; SØRENSEN, S.J.; KJELLEBERG, S. Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.6, p.3916-3923, 2006.

CAMILLI, A.; BASSLER, B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v.311, p.1113-1116, 2006.

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.

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.

CHAMBERLAIN, A.H.L. The role of adsorbed layers in bacterial adhesion. In: MELO, L.F. et al. (eds), **Biofilms – Science and Technology**, v.223, p59-67, 1992.

CHARLTON, B.R.; KINDE, H.; JENSEN, L.H. Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants. **Journal of Food Protection**, v.53, n.3, p.198-201, 1990.

CHAVANT, P.; MARTINIE, B.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M.N.; HEBRAUD, M. *Listeria 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.

CHEN, X.; SCHAUDER, S.; POTIER, N.; VAN DORSSELAER, A.; PELCZER, I.; BASSLER, B.L., HUGHSON, F.M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. **Nature**, v.415, n.6871, p.545-549, 2002.

CHIARINI, E. ***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação**. São Paulo, 2007.

145p. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. **Scientific American**, v.238, n.1, p.86-95, 1978.

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

COX, L.J.; KLEISS, T.; CORDIER, J.L.; CORDELLANA, C.; KONKEL, P.; PEDRAZZINI, C.; BEUMER, R.; SIEBENGA, A. *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments. **Food Microbiology**, v.6, p.49-61, 1989.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.5**,** n.2, p.165-180, 1987.

DE BEER, D.; STOODLEY, P.; LEWANDOWSKI, Z. Liquid flow in heterogeneous biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, n.5, p.636-641, 1994.

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

DEVINE, J. H., SHADEL, G. S., & BALDWIN, T. O. Identification of the operator of the *lux* regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, p.5688-5692, 1989.

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.

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.

DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.9, p.881-890, 2002.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant

microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v.15, p.167-193, 2002.

DUNNE, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews,** v. 15, p.155-166, 2002.

ERREBO LARSEN, H.; SEELIGER, H.P.R. A mannitol fermenting *Listeria*, *Listeria grayi* sp. n. **In Proceedings of the Third International Symposiumon Listeriosis**, p. 35, 1966.

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

FLETCHER, M. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. **Canadian Journal of Microbiology**, v.23, p.1-6, 1977.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR–LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.269-275, 1994.

FUQUA, C; GREENBERG, E.P. Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signaling. **Molecular Cell Biology**, v.3, p.685-695, 2002.

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

GREENBERG, E. P.; HASTINGS; J. W.; ULITZUR, S. Induction of Luciferase Synthesis in *Beneckea harveyi* by Other Marine Bacteria. **Archives of Microbiology**, n.120, p.87-91, 1979.

GUERRIERI, E.; NIEDERHÄUSERN, S.; MESSI, P.; SABIA, C.; ISEPPI, R.; ANACARSO, I.; BONDI, M. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. **Food Control**, 20, p.861-865, 2009.

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

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

HARRAGHY, N.; KERDUDOU, S.; HERRMANN, M. Quorum-sensing systems in *Staphylococci* as therapeutic targets. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.387, p.437-444, 2007.

HAUSNER, M.; WUERTZ, S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as

determined by quantitative *in situ* analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.8, p.3710-3713, 1999.

HE, Z.; WANG, Q.; HU, Y.; LIANG, J.; JIANG, Y.; MA, R.; TANG, Z.; HUANG, Z. Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its *luxS* mutant strain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.40, p.30-35, 2012.

HELKE, D.M.; WONG, A.C.L. Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-N rubber. **Journal of Food Protection**, v.57, n.11, p.963-968, 1994.

HENKE, J.M.; BASSLER, B.L. Quorum sensing controls type III secretion in *Vibrio harveyi.* **Journal of Bacteriology**, v.186, p.3794-3805, 2004.

HENTZER, M.; RIEDEL, K.; RASMUSSEN, T.B.; HEYDORN, A.; ANDERSEN, J.B.; PARSEK, M.R.; RICE, S.A.; EBERL, L.; MOLIN, S.; HØIBY, N.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. **Microbiology**, v.148, p.87-102, 2002.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 9 ed., 1994.

ICMSF (International Commission on Microbial Specifications for Foods). **Microorganisms in Foods.** London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall, p.141-147, 1996.

JAHID, I.K.; HA, S.D. A Review of Microbial Biofilms of Produce: Future Challenge to Food Safety. **Food Science and Biotechnology,** v.21, n.2, p.299-316, 2012.

JAMESON J.E. A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. **Journal of Hygiene**, v.60, p.193-207, 1962.

JEFFERS, G.T.; BRUCE, J.L.; MCDONOUGH, P.L.; SCARLETT, J.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. **Microbiology**, v.147, n.5, p.1095-1104, 2001.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters,** v.236, n.2, p.163-173, 2004.

JEONG, D.K.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10ºC in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, v.57, n.7, p.576-586, 1994.

KJELLEBERG, S.; MOLIN, S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? **Current Opinion in Microbiology,** 5, p.254-258, 2002.

KLAUSEN, M.; AAES-JØRGENSEN, A.; MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Molecular Microbiology**, v.50, n.1, p.61-68, 2003.

KLEEREBEZEM, M.; QUADRI, L.E.N.; KUIPERS, O.P.; DE VOS, W.M. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal transduction systems in Gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**, v.24, p.895-904, 1997.

KÖRSTGENS, V.; FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J.; BORCHARD, W. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa.* **Water Science and Technology**, v.43, n.6, p.49-57, 2001.

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

LANG HALTER, E.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v.63, p.641-647, 2013.

LATORRE, A.A.; VAN KESSEL, J.S.; KARNS, J.S.; ZURAKOWSKI, M.J.; PRADHAN, A.K.; BOOR, K.J.; JAYARAO, B.M.; HOUSER, B.A.; DAUGHERTY, C.S.; SCHUKKEN, Y.H. Biofilm in milking equipment on dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes.* **Journal of Dairy Science**, v.93, p.2792-2802, 2010.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P.A.D.; ROCHE, S.M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A., et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v.60, p.2210-2214, 2010.

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

LEMON, K.P.; HIGGINS, D.E.; KOLTER, R. Flagellar Motility is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.12, p.4418-4424, 2007.

LEMON, K.P.; FREITAG, N.E.; KOLTER, R. The Virulence Regulator PrfA Promotes Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.15, p.3969-3976, 2010.

LEVINE, M.M.; BERGQUIST, E.J.; NALIN, D.R.; WATERMAN, D.H.; HORNICK, R.B.; YOUNG, C.R.; SOTMAN, S. *Escherichia coli* that cause diarrhoea but not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v.1, p.1119-1122, 1978.

LOU, Y.; YOUSEF, A.H. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. editors. ***Listeria*, listeriosis and food safety**, New York: Marcel Dekker, p.134-224, 1999.

LUNDEN, 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 time. **Journal of Food Protection**, v.63, n.9, p.1204-1207, 2000.

LUPP, C.; URBANOWSKI, M.; GREENBERG, E.P.; RUBY, E.G. The *Vibrio fischeri* quorum-sensing systems *ain* and *lux* sequentially induce luminescence gene expression and are important for persistence in the squid host. **Molecular Microbiology**, v.50. n.1, p.319-331, 2003.

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.

MARIANI, C.; BRIANDET, R.; CHAMBA, J.F.; NOTZ, E.; CARNET-PANTIEZ A.; EYOUG, R.N.; OULAHAL, N. Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the French raw milk smear cheese Reblochon de Savoie. **Journal of Dairy Science,** v.90, p.1653-1661, 2007.

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

MCGANN, P.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. The alternative sigma factor sigma B and the virulence gene regulator PrfA both regulate transcription of *Listeria monocytogenes* internalins. **Applied and Environmental Microbiology,** 73, 2919-2930, 2007.

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

MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, n.1, p.15-33, 2004.

MELLEFONT, L.A.; McMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, n.2, p.157-168, 2008.

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.97, p.262-270, 2004.

MIDELET, G.; KOBILINSKY, A.; CARPENTIER, B. Construction and Analysis of Fractional Multifactorial Designs To Study Attachment Strength and Transfer of *Listeria monocytogenes* from Pure or Mixed Biofilms after Contact with a Solid Model Food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.4, p.2313-2321, 2006.

MILLER, S.T.; XAVIER, K.B.; CAMPAGNA, S.R.; TAGA, M.E.; SEMMELHACK, M.F.; BASSLER, B.L.; HUGHSON, F.M. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. **Molecular Cell**, v.15, p.677-687, 2004.

MINEI, C.C.; GOMES, B.C.; RATTI, R.P.; D´ANGELIS, C.E.M.; DE MARTINIS, E. C. P. Influence of peroxyacetic acid, nisin and co-culture 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 *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. **Journal of Food Protection**, v.68, p.92–97, 2005.

NATARO, J.P.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; BRAVO, N; LEVINE, M.M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 152, p. 560-565, 1985.

NEALSON, K.H.; HASTINGS, J.W. Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance. **Microbiological Reviews**, v.43, p.496-518, 1979.

NELSON, J. Where are *Listeria* likely to be found in dairy plants? **Dairy Food Environmental Sanitation**, v.10, n.6, p.344-345, 1990.

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.

OLLINGER, J.; BOWEN, B.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J.; BERGHOLZ, T.M. *Listeria monocytogenes* δ^B modulates PrfA-mediated virulence factor expression. **Infection and Immunity**, v.77, n.5, p.2113-24, 2009.

O'TOOLE, G. Microtiter dish biofilm formation assay. **Journal of Visualized Experiments**, v.47, 2011.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.34, n.9, p.577-588, 2007.

PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiology**, v.13, n.1, p.27-33, 2005.

PEREIRA, C.S.; REGT, A.K.; BRITO, P.H.; MILLER, S.T.; XAVIER, K.B. Identification of Functional LsrB-Like Autoinducer-2 Receptors. **Journal of Bacteriology**, v.191, n.22, p.6975-6987, 2009.

PIFFARETTI, J.C.; KRESSEBUCH, H.; AESCHBACHER, M.; BILLE, J.; BANNERMAN, E.; MUSSER, J.M.; SELANDER, R.K.; ROCOURT, J. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.86, p.3818–3822, 1989.

PIRIE, J. H. The genus *Listerella Pirie*. **Science**, v.91, n.383, 1940.

RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Comparative analysis of the δ^B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, n.1, p.158-71, 2008.

RASMUSSEN, O.F.; SKOUBOE, P.; DONS, L.; ROSSEN, L.; OLSEN, J.E. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. **Microbiology**, v.141, p.2053-2061, 1995.

RENNER, L.D.; WEIBEL, D.B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **Materials Research Society Bulletin**, v.36, p1-9, 2011.

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

ROBBINS, J.B.; FISHER, C.W.; MOLTZ, A.G.; MARTIN, S.E. Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. **Journal of Food Protection**, v.68, n.3, p.494-498, 2005.

ROBERTS, A.; NIGTINGALE, K.; JEFFERS, G.; FORTES, E.; KONGO, J.M.; WIEDMANN, M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. **Microbiology,** v.152, n.3, p.685-963, 2006.

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

RYSER, E.T. Foodborne listeriosis. In: RYSER, E.T., MARTH, E.H. (Ed.), ***Listeria*, Listeriosis and Food Safety**, New York: Marcel Dekker Inc., 2 ed., p.299-358, 1999.

RYSER, E.T., MARTH, E.R. ***Listeria*, Listeriosis and Food Safety**. Nova York: Marcel Dekker Inc., 3 ed., 2007.

SADOWSKA, B.; WALENCKA, E.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; RÓŻALSKA, B. Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Folia microbiologica,** v.55, p.497-501, 2010.

SAKATE, R. I. **Prevalência, epidemiologia, caracterização sorológica e molecular de *Listeria monocytogenes* isoladas na criação intensiva de novilhos superprecoces e em abatedouros frigoríficos no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2005. 95p. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

SAUNDERS, B.D.; WIEDMANN, M. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In RYSER E.T.; MARTH E.H. (Ed.), ***Listeria*, listeriosis and food safety**. Boca Raton, FL: CRC Press. 2007. p.21-53.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B.L. The languages of bacteria. **Genes & Development,** v.15, p.1468-1480, 2001.

SCHWAB, U.; HU, Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Alternative Sigma Factor σ^B is not essential for *Listeria monocytogenes* surface attachment. **Journal of Food Protection**, v.68, n.2, p.311-317, 2005.

SEELIGER, H.P.R. Apathogene Listerien: *L. innocua* sp.n. (Seeliger et Schoofs, 1977). **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene 1 Abt Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie**, v.249, 487–493, 1981.

SEELIGER, H.P.R.; ROCOURT, J.; SCHRETTENBRUNNER, A.; GRIMONT, P.A.D.; JONES, D. *Listeria ivanovii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, n.3, p.336-337, 1984.

SHETYE, G.S.; SINGH, N.; GAO, X.; BANDYOPADHYAY, D.; YAN, A.; LUK, Y.Y. Structures and biofilm inhibition activities of brominated furanones for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Medicinal Chemistry Communication**, v.4, p.1079-1084, 2013.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

SIRCILI, M.P. **"*Quorum sensing*": Estudo do fenômeno em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) típicas e atípicas**. São Paulo, 2004. 98p. Tese (Doutor) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M.; NOVAK, J.S. Quorum sensing: A primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v.67, p.1053-1070, 2004.

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; GIRON, J.A.; KAPER, J.B. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5187-5197, 2001.

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

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

STOODLEY, P.; BOYLE, J.D.; DEBEER, D.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Evolving perspectives of biofilm structure. **Biofouling**, v.14, p.75-90, 1999.

SURETTE, M.G. BASSLER, B.L. Regulation of autoinducer production in *Salmonella Typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v.31, n.2, p.585-595, 1999.

SUTHERLAND, I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v.147, p.3-9, 2001.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v.9, p.1236-1243, 2007.

TAGA; M.E.; XAVIER K. Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production. **Current Protocols in Microbiology**, supplement 23, p.1-15, 2011.

TAGG, J.R.; McGIVEN, A.R. Assay System for Bacteriocins. **Applied Microbiology**, v.21, n.5, p.943, 1971.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Bacteriological Reviews**, v.40, n.3, p.722-756, 1976.

TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.26, p.259–270, 2004.

THOMAS, W.E.; NILSSON, L.M.; FORERO, M.; SOKURENKO, E.V.; VOGEL, V. Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.53, n.5, p.1545-1557, 2004.

TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, v.65, n.4, p.709-725, 2002.

TREMOULET, F.; DUCHE, O.; NAMANE, A.; MARTINIE, B.; LABADIE, J.C; EUROPEAN LISTERIA GENOME CONSORTIUM. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v.210, n.1, p.25-31, 2002.

TUROVSKIY, Y.; KASHTANOV, D.; PASKHOVER, B.; CHIKINDAS, M. Quorum sensing: fact, fiction, and everything in between. **Advances in Applied Microbiology**, v.62, p.191-234, 2007.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.23, p.7854-7860, 2010.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews,** v.14, n.3, p.584-640, 2001.

VERGHESE, B.; LOK, M.; WEN, J.; ALESSANDRIA, V.; CHEN, Y.; KATHARIOU, S.; KNABEL, S. comK prophage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.10, p.3279-3292, 2011.

WARD, T.J., DUCEY, T.F., USGAARD, T., DUNN, K.A., BIELAWSKI, J.P. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, 74, 7629-7642, 2008.

WEILER, C; IFLAND, A.; NAUMANN, A.; KLETA, S.; NOLL, M. Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v.161, p.61–68, 2013.

WELLER, D.; ANDRUS, A.; WIEDMANN, M.; DEN BAKKER, H.C. *Listeria booriae* sp. nov, and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the United States. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.286-292, 2015.

WINKELSTROTER, 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, 2013.

XAVIER, K.B.; BASSLER, B.L. Interference with AI-2-Mediated Bacterial Cell-Cell Communication. **Nature**, v.437, n.7059, p.750-753, 2005.

XAVIER, J.B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J.S.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. **Boletim de Biotecnologia**, 2005. Disponível em: <http://biofilms.bt.tudelft.nl/pdf/2002_jxavier_biofilmes.pdf>. Acesso em: Fev 2012.

YANG, L.; LIU, Y.; WU, H.; HØIBY, N.; MOLIN, S.; SONG, Z. Current understanding of multi-species biofilms. **International Journal of Oral Science,** 3: 74-81. 2011.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.3996-4003, 2004.

ZHAO, T.; PODTBURG, T.C.; ZHAO, P.; CHEN, D.; BAKER, D.A.; CORDS, B.; DOYLE, M.P. Reduction by Competitive Bacteria of *Listeria monocytogenes* in Biofilms and *Listeria* Bacteria in Floor Drains in a Ready-to-Eat Poultry Processing Plant. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 4, p. 601-607, 2013.

APÊNDICE 1

Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e sua mutante isogênica (Δ*pfrA* Δ*sigB*) e *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço-inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI.

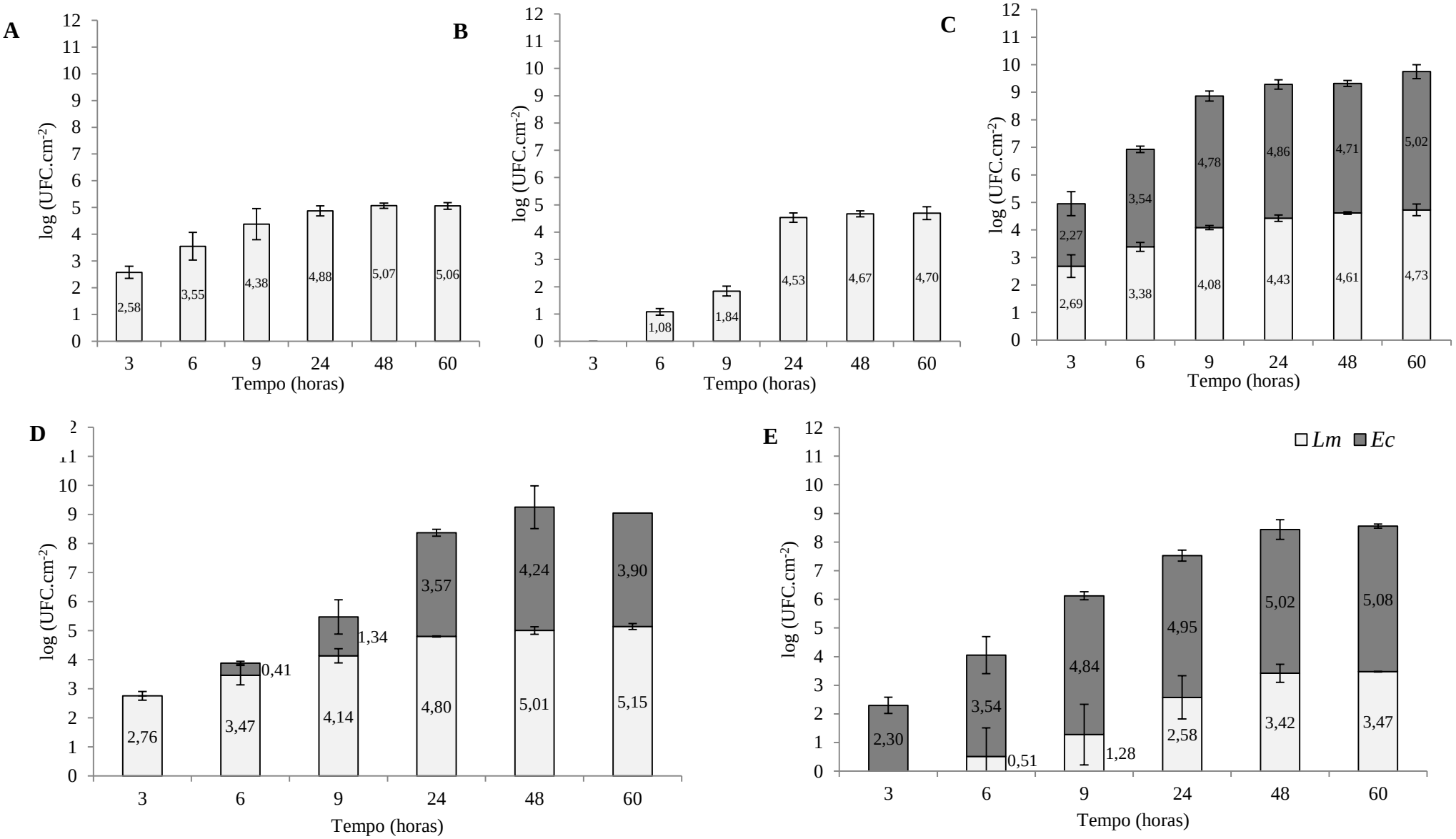


Figura 1: Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço-inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI e mantidas a 25ºC sob agitação constante. Concentração inicial: **A** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1}; **B** - *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1}; **C** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}. **D** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^2 UFC.mL^{-1}; **E** - *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}.

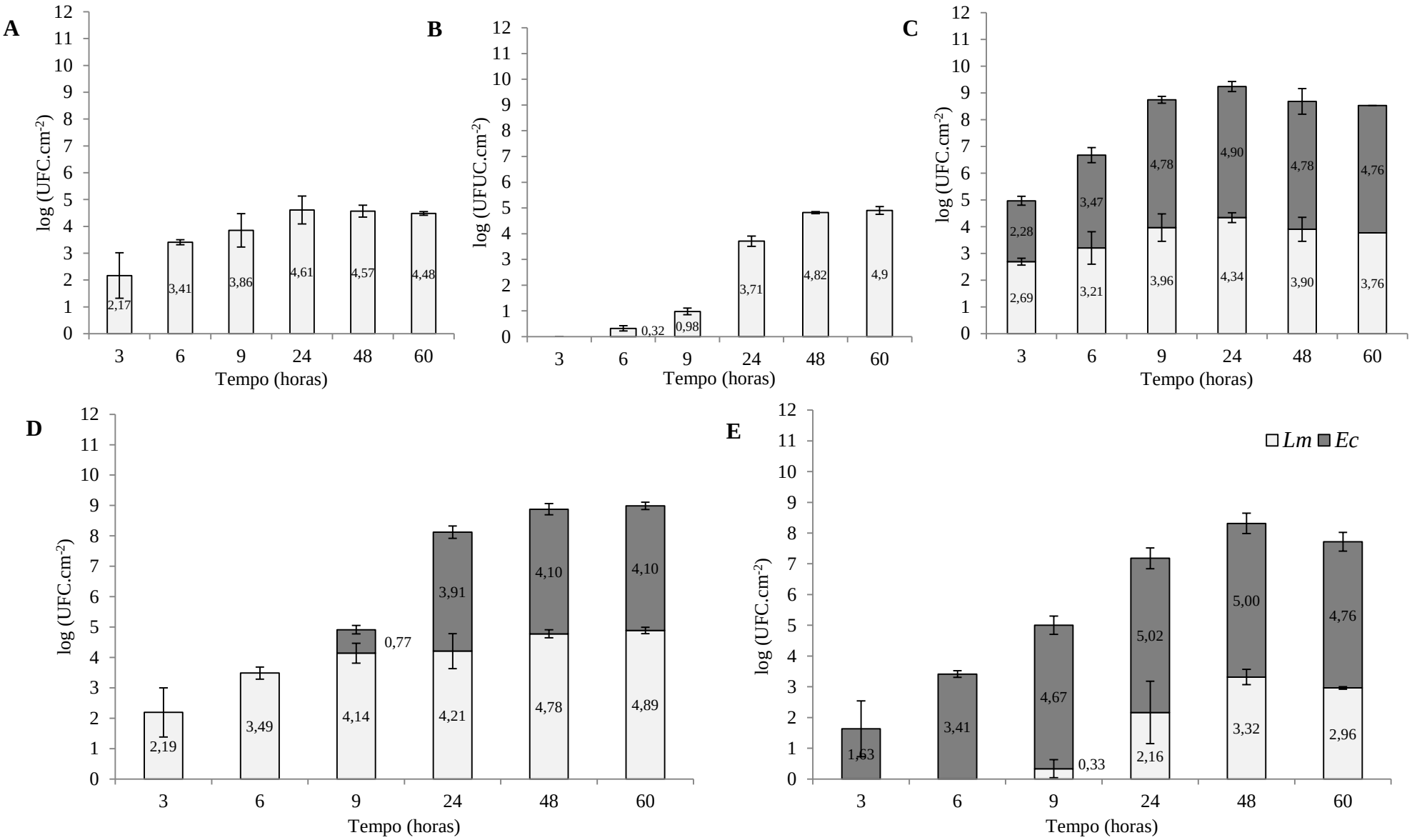


Figura 2: Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a Δ*pfrA* Δ*sigB* e *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço-inoxidável AISI 304#4 imersas em caldo infusão de cérebro e coração – BHI e mantidas a 25ºC sob agitação constante. Concentração inicial: **A** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1}; **B** - *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1}; **C** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}. **D** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^2 UFC.mL^{-1}; **E** - *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}.

APÊNDICE 2

Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e sua mutante isogênica (Δ*pfrA* Δ*sigB*) e *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço-inoxidável AISI 304#4 imersas em leite em pó integral reconstituído 10,0 % (p/v).

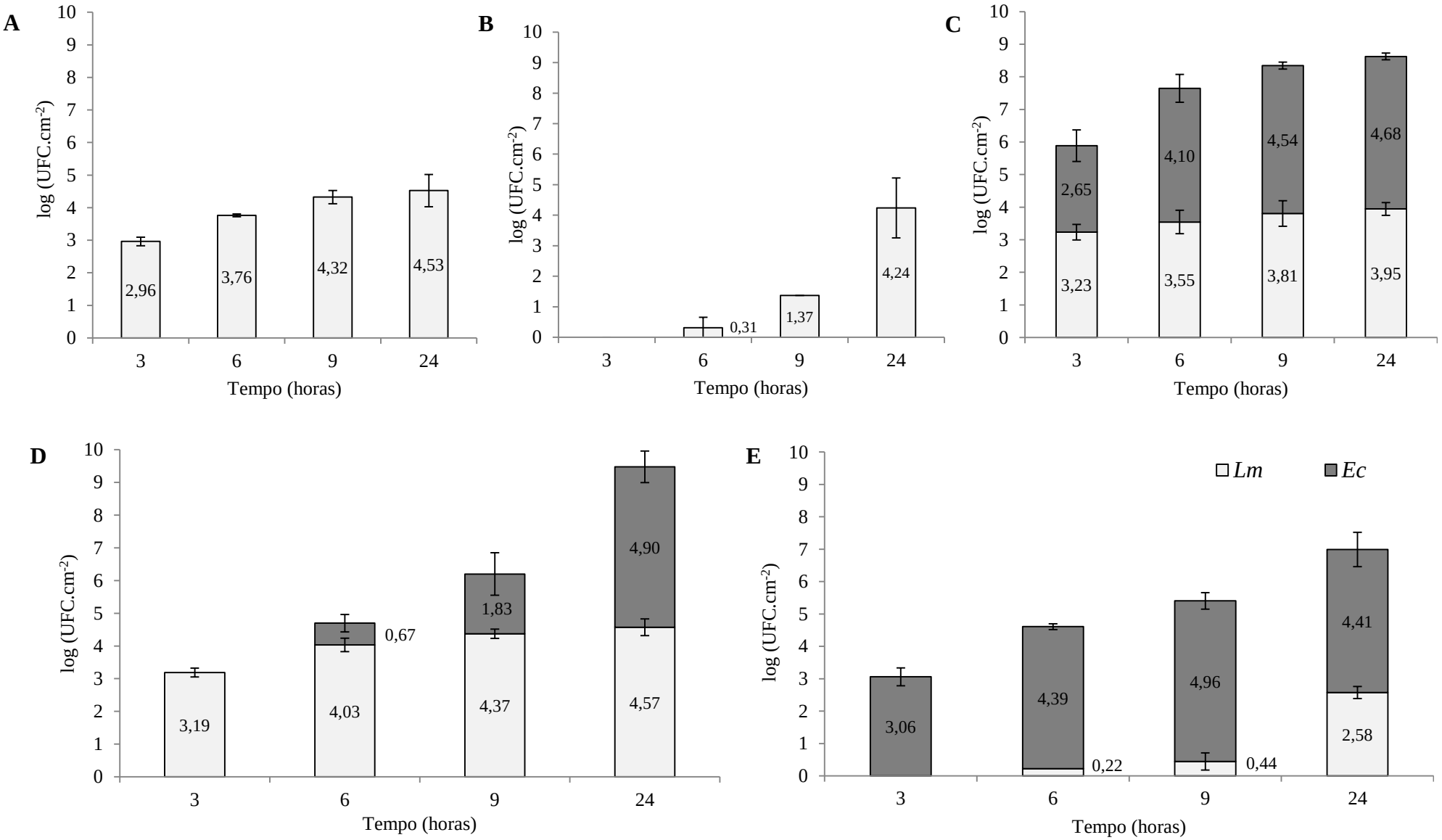


Figura 1: Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a selvagem e *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço-inoxidável AISI 304#4 imersas em leite em pó integral reconstituído a 10,0 % (p/v) e mantidas a 25ºC sob agitação constante. Concentração inicial: **A** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1}; **B** - *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1}; **C** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}. **D** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^2 UFC.mL^{-1}; **E** - *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}.

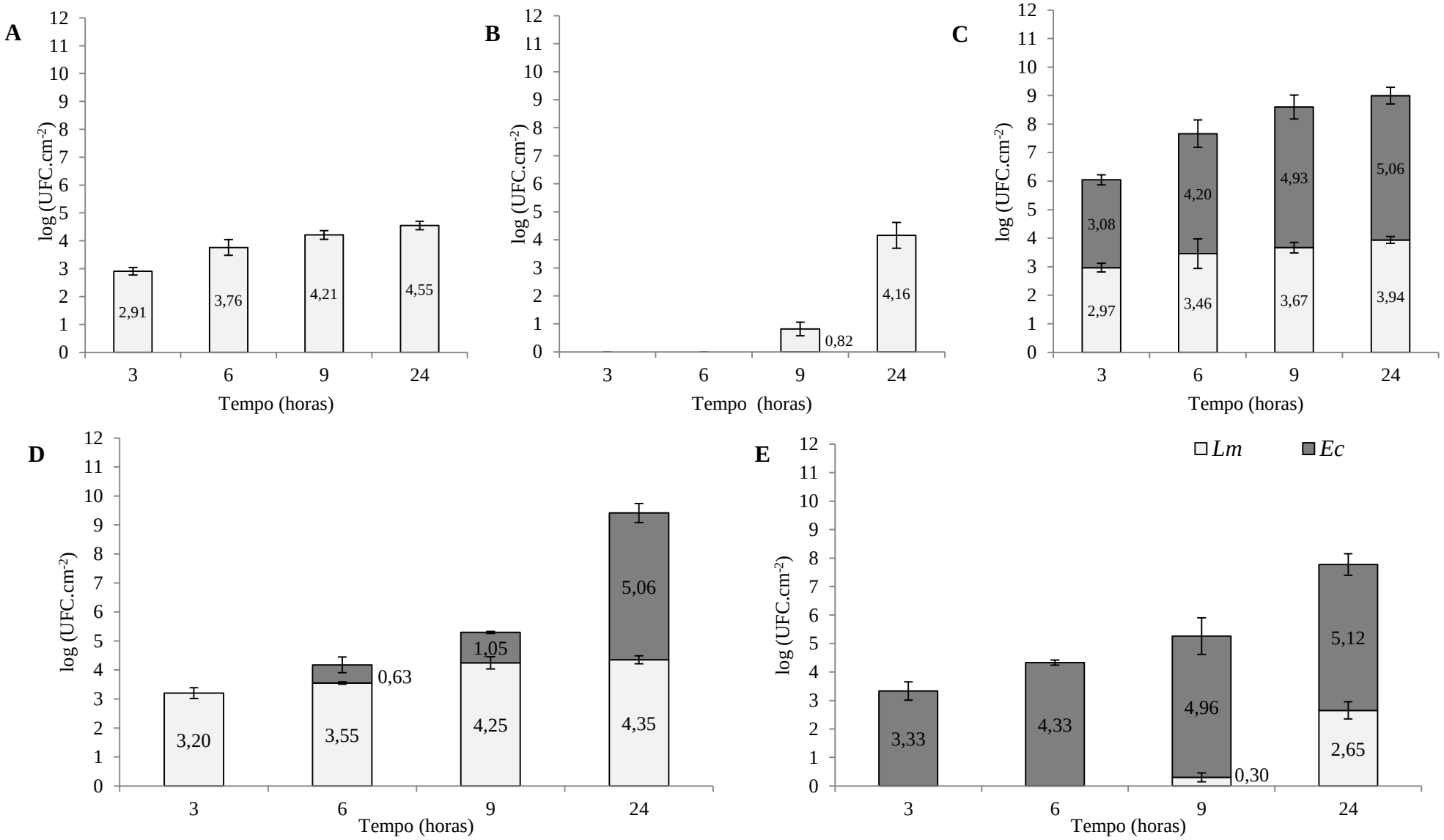


Figura 2: Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* (*Lm*) 1/2a Δ*pfrA* Δ*sigB* e *Escherichia coli* ATCC 8739 (*Ec*) em lâminas de aço-inoxidável AISI 304#4 imersas em leite em pó integral reconstituído 10,0 % (p/v) e mantidas a 25ºC sob agitação constante. Concentração inicial: **A** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1}; **B** - *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1}; **C** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}. **D** - *Lm* 10^6 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^2 UFC.mL^{-1}; **E** - *Lm* 10^2 UFC.mL^{-1} e *Ec* 10^6 UFC.mL^{-1}.