

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Quantificação e análise de viabilidade de *Listeria monocytogenes*  
em biofilmes por semeadura em placa, microscopia de  
fluorescência e ensaios preliminares de PCR em tempo real**

Lizziane Kretli Winkelströter

Ribeirão Preto  
2008

**Lizziane Kretli Winkelströter**

**Quantificação e análise de viabilidade de *Listeria monocytogenes*  
em biofilmes por semeadura em placa, microscopia de  
fluorescência e ensaios preliminares de PCR em tempo real**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia Aplicada à Farmácia,  
para obtenção do Título de Mestre em  
Biotecnologia Aplicada à Farmácia.  
Área de Concentração: Biotecnologia  
Aplicada à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Ribeirão Preto

2008

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

## FICHA CATALOGRÁFICA

Winkelströter, Lizziane Kretli

Quantificação e análise de viabilidade de *Listeria monocytogenes* em biofilmes por semeadura em placa, microscopia de fluorescência e ensaios preliminares de PCR em tempo real. Ribeirão Preto, 2008.

103p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: De Martinis, Elaine C. Pereira.

1. *Listeria monocytogenes*
2. biofilmes
3. CTC-DAPI
4. PCR em tempo real
5. bactérias lácticas

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Lizziane Kretli Winkelströter

Quantificação e análise de viabilidade de *Listeria monocytogenes* em biofilmes por semeadura em placa, microscopia de fluorescência e ensaios preliminares de PCR em tempo real.

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

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Aos meus pais, Wilson e Luciene, pelo exemplo de vida e apoio em todos os momentos. A vocês que sempre se esforçaram para que eu tivesse a melhor educação e me incentivaram a lutar pelos meus sonhos.*

*Às minhas irmãs, Larissa e Lorena, pelo suporte afetivo e estímulo constante.*

*Dedico e ofereço!*

## **Agradecimentos**

*À presença divina que ilumina nossos caminhos e nos dá força para superar os obstáculos encontrados.*

*Aos meus pais Wilson e Luciene, que mesmo com a distância sempre me ampararam e apoiaram nas minhas decisões, minha eterna gratidão!*

*Às minhas irmãs Larissa e Lorena pelo carinho e força nas horas difíceis.*

*Ao meu namorado Rodrigo, pelo amor, paciência e companheirismo.*

*Aos meus avós, tios, primos e meu afilhado Tarik por ficarem na torcida durante toda esta jornada.*

*Ao tio José Duarte e minha tia Vera, pelo incentivo e entusiasmo na concretização deste trabalho.*

*Às minhas amigas Elisa, Farah e Lidiane pela amizade, carinho e confiança em todos os momentos longe de minha família.*

*Aos amigos: Maria Augusta, Roberto, Julise, Pedro, Stella, Fábio, Priscila, Andressa, Beatriz, Aline, Talita, Renata, Lílian pelo carinho e momentos de alegria. Vocês foram muito importantes durante este período.*

*À Profa. Dra. Sandra Veiga pela amizade, incentivo, por acreditar em mim e proporcionar a primeira oportunidade de trabalhar com Microbiologia de Alimentos na UNIFAL-MG.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis pela confiança depositada em mim, pelas sugestões e experiência compartilhada no decorrer do curso.*

*À Bruna pela ajuda em várias etapas deste trabalho, por todo apoio, conselhos e imensa disponibilidade de ajudar quando precisei.*

*À Cida e Doair que me acolheram em Ribeirão Preto. Cida, obrigada pelo apoio, pela palavra amiga, pela companhia constante e por dividir comigo momentos bons e ruins.*

*Aos colegas de laboratório, Rafael, Fabrício Thamires, Natália, Marina, Fernanda, Marta, Patrícia e a técnica Vanessa pela agradável convivência, apoio e momentos de descontração.*

*À Profa. Dra. Juliana Falcão e o Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica Bacteriana pela receptividade e ajuda.*

*Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman pela colaboração e a todos os integrantes do Laboratório de Biologia Molecular dos Microrganismos, especialmente Iran e Fred pelas sugestões e constante disposição em ajudar.*

*À Profa. Dra. Suraia Said e aos técnicos Angélica e Edimárcio do Laboratório de Enzimologia pela colaboração com o microscópio de fluorescência.*

*Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, especialmente a Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley e aos técnicos Henrique e José Orestes pela atenção e disponibilidade do microscópio de fluorescência.*

*À Maria Aparecida, Ângela, Paulo e Francisco sempre prestativos.*

*À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, juntamente com funcionários de professores do curso de Pós-Graduação em Biociências Aplicada à Farmácia da mesma unidade.*

*À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo pela concessão da bolsa de estudo (Processo nº 2006/05574-1) e pelo suporte financeiro deste projeto (Processo nº 2007/56720-0).*

*E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

*“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

*Leonardo da Vinci*



## RESUMO

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

A formação de biofilmes é um fator preocupante para indústria de alimentos, pois pode comprometer a sanitização de superfícies de contato e aumentar o risco de contaminação por patógeno em alimentos processados. *L. monocytogenes* é uma bactéria de ampla distribuição no ambiente e com capacidade de formar biofilmes e sobreviver por longos períodos em condições adversas. Esta bactéria pode causar doenças em pessoas imunocomprometidas e mulheres grávidas manifestando-se por infecções do sistema nervoso central, abortos e nascimentos prematuros. Vários estudos têm demonstrado que algumas bactérias podem sofrer transição para o estado viável mas não cultivável em resposta ao estresse. Considerando-se a importância da garantia da segurança e qualidade dos alimentos, há necessidade de desenvolvimento e de padronização de técnicas rápidas para a quantificação de células viáveis de *L. monocytogenes* em alimentos e biofilmes.

Neste estudo foi avaliada a formação de biofilmes e viabilidade celular de *Listeria monocytogenes* em condições de estresse. Foram utilizadas técnicas de semeadura em placa e quantificação direta por microscopia de fluorescência com os corantes cloreto de 5-ciano-2,3-di-(p-tolil) tetrazólio (CTC) e 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Foram também realizados ensaios preliminares para padronização da Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real (PCR em tempo real) com amostras previamente tratadas com brometo de etídio monoazídico (EMA).

Os resultados obtidos demonstraram que o método de semeadura em placa foi adequado somente para a enumeração de células viáveis de *L. monocytogenes* em biofilmes enquanto que o método de enumeração por microscopia de fluorescência com CTC-DAPI permitiu quantificar bactérias no estado viável e viável mas não cultivável. Também foi observado que a presença de bacteriocinas de *L. sakei* 1 e *L. mensenteroides* 11 causou a diminuição na viabilidade e formação de biofilmes por *L. monocytogenes*. Os resultados preliminares utilizando culturas puras de *L. monocytogenes* demonstraram que o tratamento com brometo de etídio monoazídico (EMA) antes da análise por PCR em tempo real reduziu a amplificação do DNA de células mortas em 1 log de UFC por mL. No entanto dependendo da concentração utilizada, pode ocorrer também a inibição da amplificação de células viáveis de *L. monocytogenes*.

Os resultados do presente trabalho indicaram que a microscopia de fluorescência é comparável à placa para análise de células de *L. monocytogenes* não estressadas. Entretanto, para a quantificação de *L. monocytogenes* submetida a estresse, é desejável a utilização de corantes de viabilidade celular. O método de PCR em tempo real com pré-tratamento com EMA é promissor mas, ainda necessita de maior padronização para avaliação de sua aplicabilidade na determinação seletiva de células viáveis de *L. monocytogenes*.

**Palavras-chaves:** *Listeria monocytogenes*, biofilmes, CTC-DAPI, PCR em tempo real, bactérias lácticas

## ABSTRACT

WINKELSTRÖTER, L.K. **Quantification and viability analysis of *Listeria monocytogenes* biofilms by plate count, fluorescence microscopy and preliminary assays of real-time PCR.** 2008. 103f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Biofilm formation is of great concern for food industry because it may compromise sanitization of surfaces and increase contamination risk of processed foods by bacterial pathogens. *L. monocytogenes* is an ubiquitous bacterium which is able to form biofilms and to survive for long periods under adverse conditions. *L. monocytogenes* may cause disease in immunocompromised people and pregnant women, manifesting as central nervous system infections, abortion and premature birth.

Some bacteria can undergo transition to viable but non-cultivable state in response to stress and it is important to study techniques for rapid quantification of viable cells of *L. monocytogenes* in foods.

In this study biofilm formation and cell viability of *Listeria monocytogenes* were studied in stress conditions by plate counting, direct quantification by fluorescence microscopy with double staining dyes 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)/4'-6 diamino-2 phenylindole (DAPI). Preliminary experiments with real time polymerase chain reaction and treatment with ethidium bromide monoazide (EMA) were also performed.

The results showed that plate count method was suitable for enumeration only of viable cells of *L. monocytogenes* in biofilms since, fluorescence microscopy with CTC-DAPI yielded higher counts, probably due to the presence of viable but non-culturable cells. It was also observed that the presence of bacteriocins of *L. sakei* 1 and *L. mensenteroides* 11 decreased viability and formation of biofilm by *L. monocytogenes*. Results obtained with pure cultures of *L. monocytogenes* showed that the treatment with ethidium bromide monoazide (EMA) before real time PCR detection, reduced DNA amplification of dead cells in 1 log CFU per mL, but depending on the concentration used, EMA also inhibited amplification of viable cells of *L. monocytogenes*.

The results indicated that plate counting and fluorescence microscopy are equivalent for enumeration of non-stressed *L. monocytogenes* cells. However, the use of double staining with fluorescence microscopy is a more suitable method if stressed cells are present. The EMA-real time PCR is a promising tool for rapid evaluation of viable *L. monocytogenes*, but it needs further standardization.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, biofilms, CTC-DAPI, real time PCR, lactic acid bacteria

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da formação do biofilme bacteriano. Etapa 1: aderência inicial a superfície; etapa 2: produção da matriz de exopolissacarídeos; etapa 3: início do desenvolvimento do biofilme; etapa 4: maturação do biofilme; etapa 5: dispersão das células do biofilme (Fonte: LASA, 2006).....08
- Figura 2.** Representação esquemática da ação do SYBR Green na molécula de DNA (Fonte: GINZINGER, 2002).....22
- Figura 3.** Representação esquemática da formação de biofilme em lâmina de aço inoxidável sob agitação .....27
- Figura 4.** Representação esquemática da enumeração das células bacterianas aderidas às lâminas de aço inoxidável por semeadura em placa.....29
- Figura 5.** Representação esquemática da técnica de coloração CTC-DAPI em lâminas de aço inoxidável.....30
- Figura 6.** População de *L. monocytogenes* aderidas às lâminas de aço inoxidável determinada pelo método de semeadura em placa após cultivo em diferentes condições: **A)** Caldo BHI (controle), **B)** Caldo BHI + NaCl 5%, **C)** Caldo BHI + Sacarose 2%, **D)** Caldo BHI + Bac- (*L. sakei* ATCC15521), **E)** Caldo BHI + Bac+ (*L. sakei* 1), **F)** Caldo BHI + Bac- (*L. mesenteroides* 13), **G)** Caldo BHI + Bac+ (*L. mesenteroides* 11).....37
- Figura 7.** Fotomicrografia de lâmina de aço inoxidável contendo células de *L. monocytogenes* aderidas e coradas com CTC-DAPI após cultivo em caldo BHI (24h/37°C) e observadas sob microscopia de fluorescência (Filtro 05 - absorção: 395nm e emissão: 440nm, aumento 1000x): células verdes = células não viáveis coradas com DAPI e células vermelhas = células viáveis coradas com CTC .....38
- Figura 8.** População de *L. monocytogenes* aderidas às lâminas de aço inoxidável determinada pela coloração CTC-DAPI após cultivo em diferentes condições: A) Caldo BHI (controle), B) Caldo BHI + NaCl 5%, C) Caldo BHI + Sacarose 2%, D) Caldo BHI + Bac- (*L. sakei* ATCC 15521), E) Caldo BHI + Bac+ (*L. sakei* 1), F) Caldo BHI + Bac- (*L. mesenteroides* 13), G) Caldo BHI + Bac+ (*L. mesenteroides* 11) .....39
- Figura 9.** Comparação da população de células viáveis *L. monocytogenes* aderidas a lâminas de aço inoxidável determinada pelo método de semeadura em placas de TSAYE e coloração com CTC-DAPI em diferentes condições: **A)** Caldo BHI (controle), **B)** Caldo BHI + NaCl 5%, **C)** Caldo BHI + Sacarose 2%, **D)** Caldo BHI + Bac- (*L. sakei* ATCC 15521), **E)** Caldo BHI + Bac+ (*L. sakei* 1), **F)** Caldo BHI + Bac- (*L. mesenteroides* 13), **G)** Caldo BHI + Bac+ (*L. mesenteroides* 11).....40

- Figura 10.** Curva de amplificação de PCR em tempo real (A) e curva de dissociação (“*melting curve*”) (B) da análise da especificidade do *primer* para o gene *hly* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003): ■ Branco, ■ *L. monocytogenes* ATCC 19115, ■ *L. sakei* ATCC15521, ■ *L. innocua* ATCC33090 ..... 41
- Figura 11.** Resultados de análises para determinação do limite de detecção do método (A) Curva de amplificação de PCR em tempo real obtidas com o *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003) e (B) curva de dissociação (“*melting curve*”): ■ Branco ■  $10^4$  cópias de DNA por reação ■  $10^3$  cópias de DNA por reação, ■  $10^2$  cópias de DNA por reação, ■  $10^1$  cópias de DNA por reação, ■  $10^0$  cópias de DNA por reação..... 42
- Figura 12.** Fotografia de gel de agarose do *amplicon* obtido previamente por PCR em tempo real com *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003) e diluições seriadas da amostra: M) marcador de 50pb, B) branco, e na seqüência diluição seriada de  $10^4$   $10^3$   $10^2$   $10^1$   $10^0$  cópias de DNA por reação..... 42
- Figura 13.** Curva de linearidade do método de PCR em tempo real obtida com diluições decimais seriadas de DNA extraído de *L. monocytogenes* e amplificado com *primer* para o gene *hly* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003), mostrando a equação da reta e o coeficiente de correlação ..... 43
- Figura 14.** Resultados de análises obtida da amostra de biofilme de *L. monocytogenes* (A) Curva de amplificação do DNA por PCR em tempo real obtidas com o *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003) e (B) curva de dissociação (“*melting curve*”): ■ Branco ■ amostra de biofilme de *L. monocytogenes* ..... 43
- Figura 15.** Resultados de experimentos para avaliação da interferência de diferentes concentrações de brometo de etídio monoazídico (EMA) na amplificação por PCR em tempo real com o *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003), a partir de culturas em caldo Infusão Cérebro Coração, 37°C/24h: (A) Curva de amplificação e (B) curva de dissociação (“*melting curve*”). Amostras tratadas com ■ EMA 1 µg/mL, ■ EMA 5 µg/mL, ■ EMA 10 µg/mL, ■ EMA 50 µg/mL ■ amostra sem tratamento com EMA, ■ branco, sem *L. monocytogenes*..... 44
- Figura 16.** Fotografia de gel de agarose de mostrando bandas relativas aos *amplicons* obtidos com por amplificação do DNA de amostras de *L. monocytogenes*, tratadas ou não com diferentes concentrações do brometo de etídio monoazídico (EMA): M = marcador de 50pb; S/E = amostra sem EMA e amostras tratadas com 1, 5, 10 e 50 µg/mL de EMA..... 46

**Figura 17.** Resultados de experimentos para avaliação da interferência de diferentes concentrações de brometo de etídio monoazídico (EMA) na amplificação por PCR em tempo real com o *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003), a partir de culturas obtidas em caldo Infusão Cérebro Coração, 37°C/24h e submetidas à fervura: amostras tratadas com ■ EMA 1 µg/mL, ■ EMA 5 µg/mL, ■ EMA 10 µg/mL, ■ EMA 50 µg/mL ■ amostra sem EMA; ■ Branco sem *L. monocytogenes* .....46

**Figura 18.** Fotografia de gel de agarose do *amplicon* obtido por PCR em tempo real com *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003), a partir de culturas obtidas em caldo Infusão Cérebro Coração (37°C/24 h), submetidas à fervura e tratadas com diferentes concentrações de brometo de etídio monoazídico (EMA): M) marcador de 50 pb, S/E) amostra sem tratamento com EMA e na seqüência amostras tratadas com concentrações de 1, 5, 10 e 50 µg/mL de EMA .....47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Especificações do *primer hly* previamente descrito por Jothikumar; Wang; Griffiths (2003) .....33
- Tabela 2.** Valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos em amplificação por PCR em tempo real com o *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003) e número de cópias de DNA calculados\* .....45
- Tabela 3.** Valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos por PCR em tempo real com *primer* para o gene *hly* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003) e de *L. monocytogenes* em caldo Infusão Cérebro Coração (37°C/24h), tratadas termicamente (fervura/10 minutos) antes da adição do brometo de etídio monoazídico (EMA), e número de cópias de DNA calculados\* .....47

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

Bac-: Cepa não produtora de bacteriocina

Bac+: Cepa produtora de bacteriocina

BHI: Caldo Infusão Cérebro Coração

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças – EUA, do inglês “*Centers for Diseases Control and Prevention*”

Ct: Ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção, do inglês “*cycle threshold*”

CTC: Cloreto de 5-ciano-2,3-di-(p-tolil) tetrazólio

DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

EMA: Brometo de Etídio Monoazídico, do inglês “*Ethidium Bromide Monoazide*”

EPS: Exopolissacarídeos

EUA: Estados Unidos da América

FCFRP-USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

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

HACCP: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, do inglês “*Hazard Analysis Critical Control Points*”

LR: *Reverse primer*

LF: *Foward primer*

MRS: de Man, Rogosa Sharpe

NaCl: Cloreto de sódio

pb : Pares de base

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia, do inglês "*Polimerase Chain Reaction*"

PBS: Solução Salina Fosfatada Tamponada, do inglês "*Phosphate buffered saline*"

PFGE: Eletroforese em gel de campo pulsado, do inglês "*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*"

RTi PCR: PCR em tempo real, do inglês "*Real Time Polimerase Chain Reaction*"

TAE: Solução tampão Tris / Ácido Acético /EDTA

$T_m$ : Temperatura de fusão do *amplicon*, do inglês "*melting temperature*"

TSA-YE: Ágar soja tripticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UV: Ultravioleta

VBNC: Viável mas não cultivável, do inglês "*Viable But Non-Culturable*"

WHO: Organização Mundial de Saúde, do inglês "*World Health Organization*"



## LISTA DE SÍMBOLOS

cm<sup>2</sup>: Centímetros quadrados

% (v/v): Porcentagem volume por volume

°C: Grau Celsius

mL: Mililitros

nm: Nanômetros

rpm: Rotações por minuto

µm: Micrometros

mol/L: Mol por litro

mM: Milimolar

µg/mL: Microgramas por mL

W: Watts

g: Gravidade

µL: Microlitro

ng/µL: Nanograma por microlitro

°C/s: Grau Celsius por segundo

V: Volts

A: Ampères

µM: Micromolar

R<sup>2</sup>: Coeficiente de correlação

UA/mL: Unidades arbitrárias por mililitro

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> e listeriose .....	4
1.2. Biofilmes .....	7
1.2.1. Biofilmes na indústria de alimentos.....	9
1.3. Viabilidade celular .....	13
1.4. Técnica de quantificação de células em biofilmes .....	16
1.4.1. Microscopia de fluorescência.....	17
1.4.1.1. Coloração CTC-DAPI.....	18
1.5. Reação da polimerase em cadeia em tempo real.....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1. Culturas bacterianas .....	26
3.2. Formação de biofilmes por <i>L. monocytogenes</i> sob agitação .....	26
3.2.1. Formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> em condições de estresse .....	27
3.2.2. Estudos com bacteriocinas semi-purificadas .....	27
3.3. Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> em biofilmes .....	28
3.3.1. Semeadura em placa .....	28
3.3.2. Contagem direta com microscopia de fluorescência.....	29

3.3.3. Ensaio preliminar com PCR em tempo real.....	30
3.3.3.1. Extração de DNA .....	30
3.3.3.1.1. Cultura pura de <i>L. monocytogenes</i> .....	30
3.3.3.1.2. Extração de DNA de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> .....	31
3.3.3.2. Tratamento de culturas puras de <i>L. monocytogenes</i> com brometo de etídio monoazídico (EMA).....	31
3.3.3.3. Quantificação por PCR em tempo real .....	32
3.3.3.4. Análise estatística .....	34
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
4.1. Semeadura em placa .....	36
4.2. Determinação das populações de <i>L. monocytogenes</i> por coloração CTC-DAPI em microscopia de fluorescência .....	38
4.3. Comparação entre as populações de <i>L. monocytogenes</i> determinadas por semeadura em placa e por coloração CTC-DAPI em microscopia de fluorescência.....	40
4.4. Ensaio preliminar com PCR em tempo real.....	41
4.4.1 Análise da amostra de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> .....	43
4.4.2 Tratamento com brometo de etídio monoazídico (EMA).....	44
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICES</b>	

# *Introdução*

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

O acesso a alimentos de boa qualidade é uma das condições essenciais para a promoção e manutenção da saúde, além de contribuir para o aumento da produtividade e o bem estar das pessoas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Um alimento é considerado seguro, quando não apresenta perigos intrínsecos de natureza biológica, física ou química em níveis que comprometam a saúde do consumidor (BRASIL, 1999).

Até pouco tempo, o conceito de segurança alimentar era limitado ao abastecimento de alimentos na quantidade apropriada, mas de acordo com o Ministério da Saúde, este conceito vem sendo ampliado, incorporando além do acesso universal aos alimentos, o aspecto nutricional e a sua qualidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

O número de casos e a gravidade de doenças causadas por agentes transmitidos por alimentos, têm aumentado consideravelmente o interesse da população em relação à segurança alimentar (BURLINGAME; PINEIRO, 2007; KLETER; MARVIN, 2008; WHO do inglês “*World Health Organization*”, 2008).

As infecções causadas pelo consumo de alimentos contaminados são um grande desafio para a Saúde Pública e a economia (SERGELIDIS; ABRAHIM, 2009). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC, do inglês “*Centers for Diseases Control and Prevention*”), estima-se que no ano de 1997, toxinfecções por patógenos de origem alimentar causaram 76 milhões de casos de doenças, 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes nos Estados Unidos (CDC, 1999). Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, de 1999 a 2004, ocorreram 3.410.048 internações por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), com uma média de 568.341 casos por ano, gerando custos que chegaram a 280

milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005). Apesar dos números apresentados, pouco se sabe sobre a magnitude real deste problema no Brasil devido à falta de notificação de muitos casos e surtos de DTA (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005).

Diante da preocupação com as doenças transmitidas por alimentos, governos e instituições relacionadas à indústria de alimentos, passaram a adotar a Análise de Risco Microbiológico e o sistema de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle-HACCP (do inglês "*Hazard Analysis Critical Control Points*") como ferramenta para conhecimento e gerenciamento dos riscos associados ao consumo de alimentos, e desta forma, melhorar a segurança microbiológica dos mesmos (GUILBAUD et al., 2005; RASPOR; JEVSNIK, 2007 SHARMA; ANAND, 2002; WOLFFS; NORLING; RADSTRÖM, 2005;). Vários pontos críticos são observados e a presença de biofilmes nas plantas de processamento de alimentos tem sido considerado um dos mais relevantes por favorecer a deterioração e contaminação dos alimentos por bactérias patogênicas (SHARMA; ANAND, 2002).

Dentre os patógenos de origem alimentar destaca-se atualmente a bactéria *Listeria monocytogenes* causadora da doença denominada listeriose, que apresenta alta letalidade (cerca de 25%), principalmente para indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos, mulheres grávidas e idosos (BARBALHO et al., 2005; DOGANAY, 2003). Além disso, *L. monocytogenes* também apresenta capacidade de formar biofilmes nas plantas de processamento de indústrias de alimentos, facilitando desta forma a contaminação das superfícies de contato e conseqüentemente, dos alimentos processados (TIDE et al., 1999; TRACHOO, 2003). Por este motivo, o desenvolvimento de técnicas rápidas para a quantificação de *L. monocytogenes* e outros patógenos em alimentos e em biofilmes, para garantia da segurança e

inocuidade dos alimentos é de crescente interesse (KIM, H.-J. et al., 2008; PETERKIN; IDZIAK; SHARPE, 1991).

Neste trabalho foram avaliadas técnicas de enumeração de células de *L. monocytogenes* em biofilmes, assim como a influência de condições de estresse e bacteriocinas na viabilidade celular e formação de biofilme.

### 1.1 *Listeria monocytogenes* e listeriose

O gênero *Listeria* contém seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. grayi* (McLAULCHLIN et al., 2004). Entre estas, apenas duas são patogênicas, com importância reconhecida para a saúde humana e animal: *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; REISSBRODF, 2004).

*L. monocytogenes* é um patógeno que vem sendo associado a casos de listeriose com altas taxas de hospitalizações (CDC, 1999). Estima-se que nos Estados Unidos 2.500 pessoas adquirem listeriose a cada ano, sendo que 500 destas vão a óbito (CDC, 2008). Estudos sugerem que mesmo a presença de espécies não patogênicas do gênero *Listeria* poderia indicar um potencial de contaminação por *L. monocytogenes* (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005).

*L. monocytogenes* é um bacilo Gram positivo, não formador de esporos, anaeróbio-facultativo, oxidase negativo, catalase positivo, e apresenta motilidade a 25°C por meio de flagelos peritríquios (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998; MICHEL et al., 1998). Este microrganismo é amplamente distribuído na natureza e se multiplica em temperaturas que variam entre 4° C a 45°C. Além disso, *L. monocytogenes* é capaz de se multiplicar em altas concentrações de cloreto de sódio e pH (FABER; PETERKIN, 1991; MAUKONEM et al., 2003).

Vários surtos de listeriose foram relatados na década de 80 envolvendo alimentos. O primeiro deles ocorreu em 1981, no Canadá, sendo o alimento incriminado uma salada de repolho tipo *coleslaw*. Desde então, investigações sobre surtos e casos esporádicos de listeriose têm claramente indicado que o consumo de alimentos contaminados é a maneira mais comum de transmissão de *L. monocytogenes* (ROCOURT, 1996). Dentre os alimentos mais comumente incriminados com surtos destacam-se aqueles prontos para o consumo, mantidos sob refrigeração e ingeridos sem aquecimento prévio: leite e produtos lácteos, carne e derivados, vegetais e frutos do mar (FARBER; PETERKIN, 1991; SANDASI et al., 2008; SPERBER, 2001; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; THAM et al., 2000;).

A listeriose em indivíduos saudáveis é assintomática, ou se apresenta na forma de gastroenterite ou com sintomas semelhantes àqueles provocados pelo vírus *Influenza*: febre, dor de cabeça e mialgia (DOGANAY, 2003; ROCOURT, 1996). Em casos mais graves, acometendo geralmente indivíduos pertencentes a um grupo de maior risco, a listeriose pode causar aborto, nascimento prematuro, sepse, meningite e encefalite (DOGANAY, 2003; OKWUMABUA et al., 2005; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

A taxa de letalidade da listeriose é bastante alta quando comparado com outros patógenos de origem alimentar. Na Áustria a incidência de listeriose em 2004 foi de 0,24 casos para cada 100.000 habitantes com taxa de mortalidade de 21% (ROSSMANITH et al., 2006). Já na Hungria, 17 casos de listeriose foram confirmados no ano de 2004, com uma incidência de 0,17 por 100.000 habitantes por ano. Destes 17 casos ocorridos na Hungria, 52,8% foram causados pelo



sorotipo 4b, freqüentemente encontrado em amostras clínicas e 23,5% pelo sorotipo 1/2a, mais comum em amostra de alimentos (KISS et al., 2006).

De acordo com Makito et al. (2005), em 2001 ocorreu o primeiro surto de *L. monocytogenes* no Japão, causado pelo sorotipo 1/2b. O alimento envolvido foi um queijo caseiro. Os autores investigaram um total de 86 pessoas e 38 delas apresentaram sintomas típicos de listeriose após consumo do queijo. A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada nas fezes destes pacientes sendo que 21 amostras positivas para a presença deste patógeno.

Em 2002, ocorreu um surto de listeriose em vários estados dos EUA no período de julho a novembro. O surto acometeu 54 pessoas e foi relacionado com o consumo de carne de peru pré-cozida. Este fato despertou grande atenção sobre o consumo de alimentos prontos para o consumo e para adoção de medidas que previnem a contaminação de produtos na planta de processamento de alimentos (GOTTLIEB et al., 2006).

A listeriose é relatada principalmente em países industrializados e sua prevalência na África, Ásia e América do Sul é não existente ou muito baixa (WHO, 1988). Este fato é resultado de uma complexa interação de diferentes fatores, como os progressos médicos que permitem uma sobrevida maior de pessoas imunodeficientes, expansão do uso de alimentos industrializados e sistema de armazenagem a frio, bem como mudança dos hábitos alimentares (ROCOURT, 1996).

No Brasil, a única legislação que exige o controle de *Listeria* em alimentos processados é destinada a queijos de média, alta e muito alta umidade, sendo adotada a tolerância zero (ausência) em 25g (BRASIL, 2001). Alguns trabalhos já comprovaram a ocorrência deste patógeno em outros alimentos no Brasil incluindo:

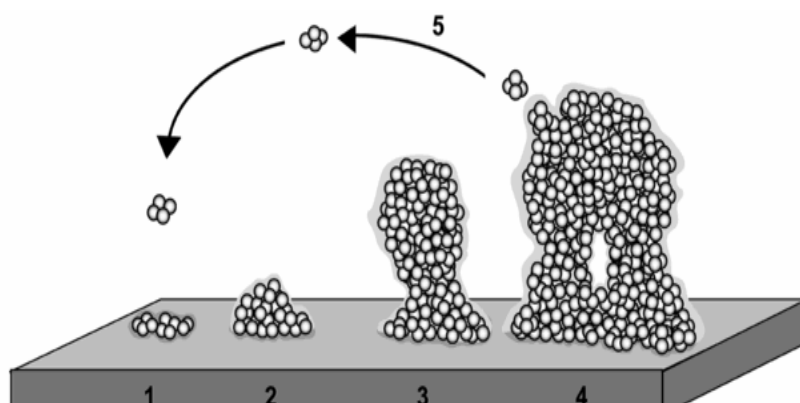
mussarela e presunto (RATTI, 2006), salame (SAKATE et al., 2003), camarão (DESTRO; LEITA; FARBER, 1996), hortaliças (FRÖDER et al., 2007), peixe surubim (ALVES et al. 2005).

## 1.2 Biofilmes

A percepção de bactérias como organismos unicelulares baseia-se essencialmente no conceito de culturas puras que podem ser diluídas e estudadas. Entretanto, a maioria das bactérias encontradas na natureza ou nas infecções crônicas vivem em comunidades, de maior ou menor estruturação, aderidas em alguma superfície na forma de biofilmes (BOLES; SINGH, 2008; HARRISON et al., 2005; RIGANO et al., 2007).

Um biofilme pode ser definido como uma comunidade de células bacterianas embutidas em uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) produzidas por elas mesmas, aderidas a uma superfície abiótica ou biótica (DUNNE, 2002; PAP; KISKÓ, 2008). Para o processo de aderência bacteriana são variáveis importantes: a espécie bacteriana, as propriedades físico-químicas da superfície de adesão, fatores ambientais e a expressão de genes responsáveis pela formação do biofilme (CHMIELEWSKI; FRANK, 2006; Di BONAVENTURA et al. 2008; DUNNE, 2002). O processo de aderência do biofilme ocorre em duas etapas: a uma distância mínima da superfície de aderência, células planctônicas são atraídas (dependendo das forças de atração e repulsão da superfície de aderência e da superfície da célula), e ficam aderidas a esta superfície. Esta é a aderência primária, que é uma etapa reversível, onde fatores físico-químicos definem a interação entre a superfície da célula bacteriana com a superfície de interesse. Após adesão primária e diante de condições favoráveis, a bactéria consolida seu processo de aderência com a

produção de exopolissacarídeos. Esta é a etapa secundária, sendo um processo irreversível. Depois da aderência, o biofilme passa por processo de crescimento e maturação (DUNNE, 2002).



**Figura 1.** Representação esquemática da formação do biofilme bacteriano. Etapa 1: aderência inicial à superfície; etapa 2: produção de matriz de exopolissacarídeos; etapa 3: início do desenvolvimento do biofilme; etapa 4: maturação do biofilme; etapa 5: dispersão das células do biofilme (Fonte: LASA, 2006).

A formação de biofilmes parece ser influenciada pelo processo de sinalização célula-célula, conhecido como *quorum sensing*, que envolve a produção e detecção de moléculas sinalizadoras extracelulares chamadas autoindutores (GANDHI; CHIKINDAS, 2007; SIFRI, 2008). Os resultados de um estudo com *Staphylococcus aureus* (BALABAN et al., 2005) sugeriram que uma maneira promissora de se prevenir formação de biofilmes, está na interferência com esta comunicação entre as bactérias. Foi demonstrado que em *S. aureus* há dois sistemas *quorum sensing*: i) composto de um peptídeo autoindutor de ácido ribonucléico III (RAP) e tem como alvo a proteína TRAP (envolvida na produção de toxinas, na adesão e na formação do biofilme) e ii) sistema formado por um peptídeo autoindutor (AIP). A virulência de *S. aureus* parece ser inibida pelo peptídeo inibidor da RNA III (RIP), que age como antagonista da TRAP inibindo a fosforilação desta proteína levando à redução da

adesão celular e suprimindo a síntese de toxinas. Um RIP sintético vem sendo desenvolvido e tem se mostrado eficaz na prevenção das infecções causadas por *S. aureus* (BALABAN et al., 2005). Diante destas informações, estudos similares envolvendo *L. monocytogenes*, parecem interessantes, já que esta bactéria forma biofilme e tem grande importância clínica.

Do ponto de vista da microbiologia médica, os biofilmes podem contaminar vários equipamentos médicos como implantes venosos e urinários, cateteres, e até mesmo tecidos vivos, além de promover a cárie dental (BALABAN et al., 2005; MEYER, 2003; PAP; KISKÓ, 2008; SCHILLACI et al., 2008;). Desta forma, os biofilmes podem gerar infecções no hospedeiro e dificultar o tratamento, pois a maioria dos microrganismos responsáveis por infecções nosocomiais graves são resistente a antibióticos convencionais (BALABAN et al., 2005; SCHILLACI et al., 2008).

### **1.2.1 Biofilmes na indústria de alimentos**

A contaminação dos alimentos por microrganismos patogênicos e deteriorantes durante seu processamento tem despertado grande preocupação para Saúde Pública. A contaminação de equipamentos nas indústrias de alimentos foi um dos fatores relevantes em 59% dos surtos de doenças de origem alimentar investigados na França, no ano de 2001 (MIDELET; CARPENTIER, 2004).

*L. monocytogenes* é amplamente distribuída na natureza e suporta condições variáveis de estresse comuns nas indústrias de alimentos como desidratação, calor, baixa temperatura e agentes antimicrobianos (MAUKONEM et al., 2003; ROMANOVA et al., 2007; TRACHOO, 2003; ZHAO; DOYLE; ZHAO, 2004).

A capacidade de formar biofilmes em fábricas de processamento de alimentos torna *L. monocytogenes* uma bactéria com grande potencial de contaminação (SANDASI et al.; 2008; TIDE et al., 1999; TRACHOO, 2003). Além de aumentar os riscos de toxinfecções alimentares, os biofilmes comprometem a sanitização de superfícies em contato com os alimentos e ocasionam prejuízos financeiros à indústria, em virtude da diminuição da vida de prateleira dos produtos alimentícios, danos a equipamentos e diminuição da eficiência das operações dentro da indústria (Di BONAVENTURA et al., 2008; FLASH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005; FUSTER-VALLS et al., 2008; JESSEN; LAMMERT, 2003; KUMAR; ANAND, 1998; MAUKONEM et al., 2003; SHARMA; ANAND, 2002; TRACHOO, 2003).

As falhas nos procedimentos de higienização de equipamentos propiciam o acúmulo de resíduos de materiais orgânicos, condicionando para o início do processo de adesão, e conseqüente formação de biofilmes, em diversos tipos de materiais como aço inoxidável, vidro, poliestireno, borracha e polipropileno (KUDA; YANO; KUDA, 2008; LUNDÉN et al., 2000; MACÊDO, 2000; PAP; KISKÓ, 2008; RIEU et al., 2008; RIVAS; DYKES; FEGAN, 2007; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). O material mais usado na indústria de alimentos é o aço inoxidável por ser de fácil higienização, ser estável química e fisicamente em amplas faixas de temperatura e ser resistente à corrosão (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Acredita-se que o biofilme seja uma estratégia de sobrevivência e proteção dos microrganismos frente a condições diversas encontradas no ambiente (HARVEY; KEENAM; GILMOUR, 2007; TRACHOO, 2003). Algumas bactérias podem adaptar-se rapidamente a diferentes ambientes, por meio da modulação da expressão de seus genes, produzindo diferentes proteínas de acordo com as condições

encontradas (ROMBY; VANDENESCH; WAGNER, 2006; SCHAIK; ABEE, 2005; SLEATOR; CLIFFORD; HILL, 2007).

O biofilme também parece favorecer uma diversidade genética muito grande na população bacteriana mesmo sem a presença de uma condição de estresse (BOLES; SINGH, 2008). Estudo realizado por Boles e Singh, (2008), foi observado uma mudança na morfologia de colônias, na motilidade e necessidades nutricionais de *Pseudomonas aeruginosa* quando se apresentava na forma de biofilmes.

Estudos demonstraram que *L. monocytogenes* pode contaminar e persistir em linhas de produção de alimentos por vários anos (HARVEY; KEENAM; GILMOUR, 2007; LUNDÉN et al., 2000). Miettinen; Björkroth e Korkeala (1999) ao pesquisar a ocorrência de *L. monocytogenes* nas superfícies e nos produtos acabados de uma indústria de sorvetes relataram que cepas com um mesmo perfil em gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE, do inglês “*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*”) estavam presentes em amostras coletadas em um período de até sete anos.

Os microrganismos em biofilmes podem ser até 500 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos quando comparados com células planctônicas (TRACHOO, 2003). A resistência aos agentes antimicrobianos é atribuída a várias propriedades intrínsecas do biofilme como a difusão reduzida, mudanças fisiológicas, taxas de crescimento, produção de enzimas que degradam substâncias antimicrobianas e transferência de genes de resistência devido à proximidade das células (BREDHOLT et al., 1999; CHAE et al., 2006; JESSEN; LAMMERT, 2003; RIGANO et al., 2007; TRACHOO, 2003).

Para o controle e prevenção de biofilmes nas superfícies de contaminação com alimentos, são importantes medidas de higiene da indústria, escolha do modelo

adequado de equipamento, tipo de material da linha de produção dos alimentos e a seleção correta dos detergentes e desinfetantes em associação com métodos físicos para remoção mecânica (AMMOR et al., 2006; JESSEN; LAMMERT, 2003; MAUKONEM et al., 2003). Alguns trabalhos vêm demonstrando que os agentes desinfetantes mais utilizados na higienização das linhas de produção das indústrias de alimentos são ineficientes para células que estão em biofilmes (BYUN et al., 2007; CHAE; SCHRAFT, 2001; LANGSRUD et al., 2003, MINEI et al., 2008; RYU; BEUCHAT, 2005;).

Em estudo recente realizado por Byun et al., 2007, foi observado que a irradiação gama foi mais efetiva na redução de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*, e *Escherichia coli* se comparado com o hipoclorito de sódio, desinfetante bastante utilizado devido efeito bactericida. A irradiação tem a capacidade de reduzir microrganismos patogênicos e deteriorantes, e tem sido reconhecida por prolongar o tempo de prateleira de produtos alimentícios (BYUN et al., 2007; LEE; LEVIN, 2008; NIEMIRA, 2007).

As bactérias lácticas (BAL) podem produzir uma série de compostos com ação antimicrobiana como: ácido lático e outros ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil e bacteriocinas (DROSINOS; MATARAGAS; METAXOPOULOS, 2006; GALVEZ et al., 2008; SIT; VEDERAS, 2008). As bacteriocinas são peptídeos que tem a capacidade de inibir a multiplicação de certos patógenos de origem alimentar como *L. monocytogenes* e *S. aureus* (DROSINOS; MATARAGAS; METAXOPOULOS, 2006; GALVEZ et al., 2008).

Em vários estudos foi avaliada a ação de bacteriocinas contra *L. monocytogenes*. Drosinos; Mataragas; Metaxopoulos, (2006) observaram que *Leuconostoc mesenteroides* isolado de salsichas fermentadas produziu bacteriocina

efetiva contra *L. monocytogenes*. Ghrairi et al. (2008) isolaram *Enterococcus faecium* de queijo, com capacidade de produzir bacteriocina com atividade contra vários patógenos entre eles: *Enterococcus faecalis*, *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *S. aureus*. De Martinis; Franco, (1997) também observaram que *Leuconostoc mesenteroides* A11 e *Lactobacillus sakei* 1 isoladas de lingüiça frescal tinham atividade contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

A utilização destes peptídeos antimicrobianos denominados bacteriocinas também tem apresentado grande potencial para o controle de biofilmes na indústria de alimentos (AMMOR et al., 2006). Zhao, Doyle e Zhao (2004) demonstraram que bacteriocinas produzidas por *Enterococcus durans* e *Lactococcus lactis* reduziram em cerca de 5 ciclos log o número de unidades formadoras de colônias (UFC) em biofilmes produzidos por *L. monocytogenes* em lâminas de aço inoxidável. Em trabalho publicado por Minei et al. (2008) também foi observado que *Enterococcus faecium* bac+ reduziu a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em até 5,9 ciclos log, indicando que cepas bacteriocinogênicas têm potencial de uso na indústria de alimentos para o controle de contaminação por *L. monocytogenes*. A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* e pode exercer papel importante no controle da colonização de *L. monocytogenes* em superfícies de contato com os alimentos, sendo a única bacteriocina permitida para uso em alimentos no Brasil (AMMOR et al., 2006; FRANCO; LANDGRAF, 2004; GANDHI; CHIKINDAS, 2007; LERICHE; CHASSAING; CARPENTIER, 1999).

### 1.3 Viabilidade celular

A exposição de *L. monocytogenes* a estresse sub-letal pode conferir proteção cruzada a outros fatores de estresse e uma resistência maior a condições adversas



(FALEIRO; ANDREW; POWER, 2003; GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Faleiro; Andrew; Power, (2003) realizaram um estudo em que foi observado que cepas de *L. monocytogenes* isoladas de fábrica de processamento de queijo estavam adaptadas a condições de alta acidez e osmolaridade, provavelmente devido à sua exposição prévia a um ambiente ácido seguido da presença de altas concentrações de cloreto de sódio.

As bactérias respondem de forma variada quando os níveis destes fatores de estresse ultrapassam sua capacidade de adaptação (FALEIRO; ANDREW; POWER, 2003; MAUKONEM et al., 2003). Alguns trabalhos realizados com o intuito de observar a alteração da morfologia celular bacteriana em situações de estresse evidenciaram que células de *L. monocytogenes*, quando expostas a elevadas temperaturas e concentrações de NaCl, alteraram a morfologia de suas células, apresentando-se de 4 a 10 vezes mais alongadas do que as células que não foram expostas a tais condições (CHAE; SCHRAFT, 2001; PERNI et al., 2006,). Característica semelhante foi observada por Ratti (2006), ao analisar biofilmes de *L. monocytogenes* em co-cultura com *Leuconostoc mesenteroides* 11 produtor de bacteriocina em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) modificado pela adição de sacarose 2%.

Além disso, em resposta ao estresse, algumas bactérias podem sofrer transição para o estado viável mas não cultivável (VBNC do inglês “*Viable But Non-Culturable*”). Neste estado, a bactéria é ativa metabolicamente, mas é incapaz de fazer a divisão celular e formar colônias em meio de cultivo, provavelmente, como um mecanismo de sobrevivência a condições adversas enfrentadas (BAFFONE et al., 2003; BESNARD; FEDERIGHI; CAPPELIER, 2000; CRÉACH et al. 2003 SKOVGAARD, 2007).

A existência de células no estado VBNC tem sido observada há cerca de três décadas. Xu et al. (1982) apud Besnard; Federighi e Cappelier (2000) foram os primeiros autores a evidenciar a existência deste estado em bactérias patogênicas e desde então outros estudos foram realizados a fim de observar a viabilidade celular<sup>1</sup>. Kogure et al. (1979) apud Chae e Schraft (2001) observaram que cerca de 5-10% do total da população bacteriana de amostras de água do mar eram viáveis e destas, apenas 0,1% eram cultiváveis em meios de cultivo sólidos<sup>2</sup>. Leriche e Carpentier (1995) apud Chae e Schraft (2001) demonstraram que tratamentos de desinfecção também podem induzir o estado VBNC em células presentes em biofilmes<sup>3</sup>. Foi observado que 50% das células *Salmonella typhimurium* presentes em biofilmes estavam no estado VBNC após serem tratadas com cloro. Já Yu et al. (1993) apud Chae e Schraft (2001) obtiveram 85% de células VBNC em biofilmes de *Klebsiella* após tratamento com cloro, sendo que antes do tratamento o valor encontrado era cerca de 57% de células VBNC<sup>4</sup>.

Este último dado encontrado por Yu et al. (1993), ilustrou que a presença de células VBNC pode ser espécie dependente, ocorrendo em biofilmes mesmo sem nenhum tipo de tratamento prévio com desinfetantes ou alterações dos parâmetros de cultivo (CHAE; SCHRAFT, 2001).

Cappelier et al. (2005) demonstraram que a patogenicidade de microrganismos como *Campylobacter jejuni* diminui à medida que se observa a perda da habilidade das células se multiplicarem em meios de cultivo. Porém, não se pode dizer ao certo

---

<sup>1</sup> Xu, H. S., Robert, N., Singleton, F. L., Attwel, R.W., Crimes, D. J. and Colwell, R. R. (1982) Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. **Microbial Ecol.** 8, 313-323.

<sup>2</sup> Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N. (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. **Can. J. Microbiol.** 25, 451-420.

<sup>3</sup> Leriche, V. and Carpentier, B. (1995) Viable but non culturable *Salmonella typhimurium* in single and binary species biofilms in response to chlorine treatment. **J. Food Prot.** 58, 1186-1191.

<sup>4</sup> Yu, F. P., Pyle, B. H. and McFeters, G. A. (1993) A direct viable count method for the enumeration of attached bacteria and assessment of biofilm disinfection. **J. Microbiol. Methods.** 17, 167-180.

se esta diminuição da patogenicidade é permanente ou transiente, podendo estas bactérias tornarem-se potencialmente infectantes em condições favoráveis (BESNARD; FEDERIGHI; CAPPELIER, 2000).

Diante do exposto e devido à ampla ocorrência de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos, principalmente na forma de biofilmes, a existência da mesma no estado VBNC deve ser levado em consideração nas técnicas de quantificação desta bactéria em biofilmes.

#### **1.4 Técnicas de quantificação de células em biofilmes**

Por muitas décadas, o método mais tradicional para a quantificação de células viáveis foi a técnica de enumeração em placas. Entretanto, este método pode subestimar o número de células viáveis presentes na amostra, já que muitos destes microrganismos podem encontrar-se no estado VBNC, não sendo capazes de formar colônias em meios de cultivo. Este fato é mais evidente nos microrganismos presentes em biofilmes, um ambiente heterogêneo e complexo (LAFLAMME et al., 2004; SKOVGAARD, 2007; YU; McFETERS, 1994).

Neste contexto, métodos alternativos para quantificação de microrganismos em biofilmes e avaliação de sua atividade celular são altamente promissores. Dentre estes métodos pode-se destacar a microscopia de varredura, microscopia confocal a laser e de fluorescência com o uso de corantes fluorescentes, bem como diversas técnicas de biologia molecular (GUILDBAUD et al., 2005; LAFLAMME et al., 2004; SKOVGAARD, 2007; YU; McFETERS, 1994).

### 1.4.1 Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência é uma técnica bastante utilizada na análise da ecologia microbiana, sendo considerada rápida, fácil e fornecem dados sobre a distribuição das células (MAUKONEM; MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEM, 2000; MAUKONEM et al., 2003; MESA et al., 2003).

A contagem direta por microscopia de fluorescência tem sido um dos métodos de escolha na quantificação de células, em alternativa ao tradicional método de contagem em placa que depende da culturabilidade dos microrganismos (MESA et al., 2003; PARIZZI et al., 2004; RIVAS; DYKES; FEGAN, 2007; YU; McFETERS, 1994). Vários métodos de coloração têm sido desenvolvidos para este tipo de técnica, sendo a maioria baseada na detecção do metabolismo e em diferenças da integridade na membrana de células viáveis e não viáveis (TAKEUCHI; FRANK, 2001).

No caso de biofilmes, a microscopia de fluorescência, permite a visualização do processo de aderência, crescimento e formação dos mesmos (MESA et al., 2003; PARIZZI et al., 2004; RIVAS; DYKES; FEGAN, 2007; YU; McFETERS, 1994). Além disso, o uso combinado de corantes fluorogênicos tem se mostrado de grande utilidade na quantificação e diferenciação de células viáveis e não viáveis, tanto em células individuais quanto em comunidades microbianas aderidas (MAUKONEM et al., 2003; YU; McFETERS, 1994). Um tipo de associação de corantes bastante utilizada é o cloreto de 5-ciano-2,3-di-(p-tolil) tetrazólio (CTC) que avalia a atividade celular, evidenciando as células viáveis e o 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) que se liga a moléculas de DNA da célula não coradas com CTC, fornecendo dessa forma a contagem de células não viáveis (BESNARD; FEDERIGHI; CAPPELIER; 2000; LAFLAMME et al., 2004; MAUKONEM et al., 2003).

#### 1.4.1.1 Coloração CTC-DAPI

Rodriguez et al. (1992) foram os primeiros autores a utilizar CTC em conjunto com o DAPI para determinar contagem total e a quantidade de células viáveis em amostras de água do ambiente. Na coloração com CTC, os microrganismos que apresentam atividade celular, são capazes de reduzir o corante a cristais de formazano. O CTC é uma corante fluorescente com comprimento de onda de excitação máxima de 450nm e de emissão máxima de 630nm, que atua como acceptor de elétrons na cadeia respiratória e determina a atividade de enzimas oxidativas intracelulares, como as desidrogenases. Os cristais de CTC formazano são visualizados no interior da célula na forma de um precipitado vermelho fluorescente quando analisado em microscópio de fluorescência, fornecendo a contagem de bactérias viáveis (BHUPATHIRAJU et al., 1999; CRÉACH et al., 2003; MAUKONEM; MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEM, 2000; SEVERIN; STELLMACH; NACHTIGAL, 1985). Por outro lado, o DAPI é um corante fluorescente que se liga à molécula de DNA das células e tem comprimento de onda de excitação máxima de 358nm e de emissão máxima de 461nm. As células coradas com o DAPI se revelam azuis ou verdes quando observadas em microscópio de fluorescência. Este corante fornece uma contagem do número de células não viáveis presentes na amostra (BESNARD; FEDERIGHI; CAPPELIER, 2000; MAUKONEM; MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEM, 2000).

#### 1.5 Reação da polimerase em cadeia em tempo real

Os métodos clássicos para identificação de *L. monocytogenes* envolvem métodos de cultivo que são baseados em enriquecimentos em caldos seletivos, semeadura em placas contendo meio seletivo e diferencial com posterior seleção de

colônias típicas, testes de fermentação de carboidratos e análise de atividade hemolítica (Administração de Alimentos e Medicamentos – EUA, do inglês “*Food and Drug Administration*” (FDA), 2003; GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; LIU 2008; ORAVCOVÁ; KUČHTA; KACLÍKOVA, 2007).

Diante da necessidade de testes rápidos e sensíveis, para a identificação e quantificação de microrganismos que não expressam suas propriedades fenotípicas e ou estão nos estado de VBNC, métodos de detecção baseado em técnicas moleculares tem sido desenvolvidos, sendo uma das mais promissoras a reação da polimerase em cadeia em tempo real (RTi PCR do inglês “*Real Time Polimerase Chain Reaction*”) (DE MARTINIS; DUVALL; HITCHINS, 2007; GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; MAUKONEM et al., 2003; ROSSMANITH et al., 2006; SKOVGAARD, 2007; WOLFFS; NORLING; RADSTRÖM, 2005).

A PCR possibilita uma amplificação do material genético, apresentando boa sensibilidade e rapidez (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996; LIU, 2008; WOLFFS; NORLING; RADSTRÖM, 2005). Apesar da sua grande utilidade, a PCR apresenta limitações quando usada como ferramenta analítica no controle da segurança microbiológica dos alimentos, uma vez que o método não distingue células viáveis das células mortas, impedindo desta forma, a análise do potencial de risco à saúde por parte destes microrganismos (CAWTHORN; WITTHUHN, 2008; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; PISZ et al., 2007; WANG; LEVIN, 2006).

Após a morte celular, o DNA pode permanecer íntegro por até 3 semanas. Dessa forma os diagnósticos baseados em quantificação molecular de material genético tendem a estimar valores maiores de células vivas do que realmente há nas amostras (GUY et al., 2006; JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; RUDI et al., 2005). Trabalhos recentes têm utilizado o

corante intercalante de DNA, o Brometo de Etídio Monoazídico (EMA), acoplado à técnica de PCR em tempo real com grande êxito na determinação e quantificação rápida de microrganismos viáveis (CAWTHORN; WITTHUHN, 2008; GUY et al., 2006; LEE; LEVIN, 2008; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; PISZ et al., 2007; RUDI et al., 2005). O mecanismo de ação do EMA envolve a penetração seletiva do corante nas membranas de células danificadas. A ativação do EMA após sua exposição à luz visível (máximo de absorvância de 460nm) promove sua ligação química covalente com a molécula de DNA, impedindo a sua amplificação genética por meio da PCR (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006 PISZ et al., 2007). As células viáveis não se ligam ao corante e sua amplificação ocorre normalmente (CAWTHORN; WITTHUHN, 2008; NOCKER; CAMPER, 2006; WANG; LEVIN, 2006).

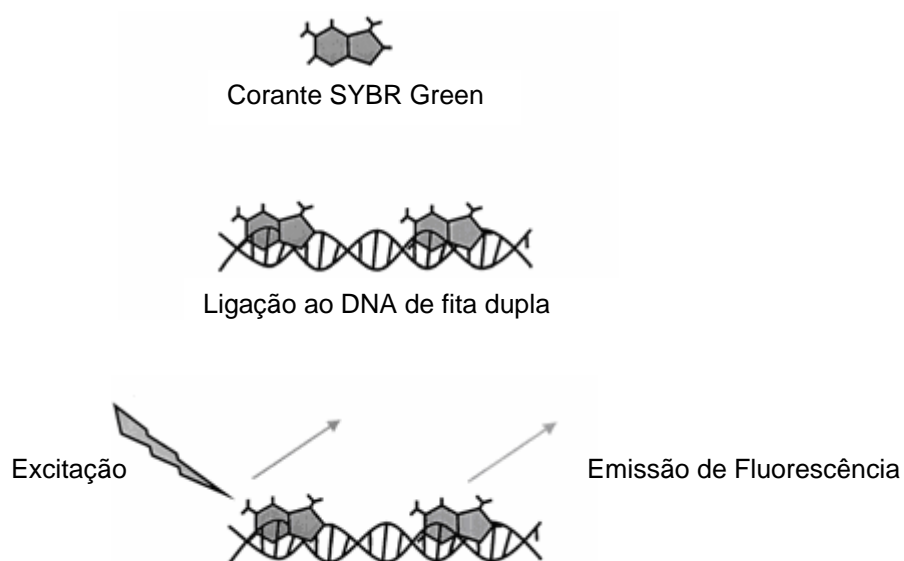
RTi PCR é uma técnica molecular, bastante usada no diagnóstico rápido de vírus e quantificação da expressão gênica (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996; GIULIETTI et al., 2001; GUO et al., 2008; WOLFFS; NORLING; RADSTRÖM, 2005; YANG et al., 2008). Entretanto, o uso na quantificação de bactérias patogênicas relacionadas com alimentos é recente (HEIN et al., 2006; LAMBERTZ et al., 2008; MALORNY et al., 2008; TANABE et al., 2007).

A técnica de PCR em tempo real consiste em uma amplificação convencional de DNA, porém a detecção e monitoramento dos produtos de amplificação são feitos ao longo dos ciclos em tempo real, baseado na emissão e quantificação de um sinal fluorescente captado por um sistema óptico que é convertido em dados no *software* ligado ao aparelho (GINZINGER, 2002; MACKAY, 2004; McKILLIP; DRAKE, 2004; NOVAIS; ALVES, 2004).

A PCR em tempo real apresenta vantagens como: alta sensibilidade, menor tempo de análise, risco reduzido de contaminação e a possibilidade de automatizar a quantificação e o processamento de uma amostra (LAMBERTZ et al., 2008; ORAVCOVÁ; KUCHTA; KACLÍKOVA, 2007; ROSSMANITH et al., 2006).

Uma variedade de fluoróforos e sondas podem ser utilizados na detecção e quantificação por RTi PCR, como o corante intercalante SYBR Green e as sondas *Taqman*, *Beacons* e *Scorpions* (GINZINGER, 2002; GIULIETTI et al., 2001; MACKAY, 2004). No presente trabalho foi utilizado o SYBR Green, um corante que se liga ao DNA de fita dupla, emitindo fluorescência em proporção direta com a quantidade do produto final de cada amplificação (Fig. 2) (BURGOS et al., 2002; DHAR; ROUX; KLIMPEL, 2001; GIULIETTI et al. 2001). Este corante apresenta vantagem por poder ser utilizado com qualquer conjunto de *primers* e DNA, diminuindo os custos para realização do método, entretanto, esta falta de especificidade faz com que ele seja capaz de se ligar a produtos não específicos da reação e dímeros de *primers* (GIULIETTI et al., 2001).





**Figura 2.** Representação esquemática da ação do SYBR Green na molécula de DNA (Fonte: GINZINGER, 2002).

Recentemente, Guilbaud et al. (2005), Bruhn et al. (2006) e Kindaichi et al. (2006) quantificaram bactérias aderidas em biofilmes, com o emprego de RTi PCR. Os autores declararam que este método foi rápido, de fácil execução e apresentava potencial aplicação para o estudo da ecologia bacteriana de biofilmes.

Considerando-se a importância da garantia da segurança e qualidade dos alimentos, há necessidade de desenvolvimento e de padronização de técnicas rápidas para a quantificação de células viáveis *L. monocytogenes*, em alimentos e biofilmes, bem como a análise de sua interação com outros microrganismos.

*Objetivos*

---

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a formação e viabilidade celular em biofilmes de *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável, por meio da semeadura em placa, contagem direta por microscopia de fluorescência e realização de ensaios preliminares com EMA-RTi PCR.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o método de semeadura em placa para quantificar biofilmes de *L. monocytogenes*.
- Avaliar o método de contagem de *L. monocytogenes* em biofilmes através de microscopia de fluorescência com o uso dos corantes CTC-DAPI.
- Avaliar a influência de cloreto de sódio, sacarose e bacteriocinas na viabilidade celular e na formação de biofilmes por *L. monocytogenes*.
- Avaliar a aplicabilidade da PCR em tempo real para quantificação seletiva de células viáveis de *L. monocytogenes*, com a utilização de EMA.
- Comparar a eficiência das técnicas de semeadura em placa e microscopia de fluorescência na quantificação de células viáveis de *L. monocytogenes* em biofilmes.

## *Material e Métodos*

---

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Culturas bacterianas

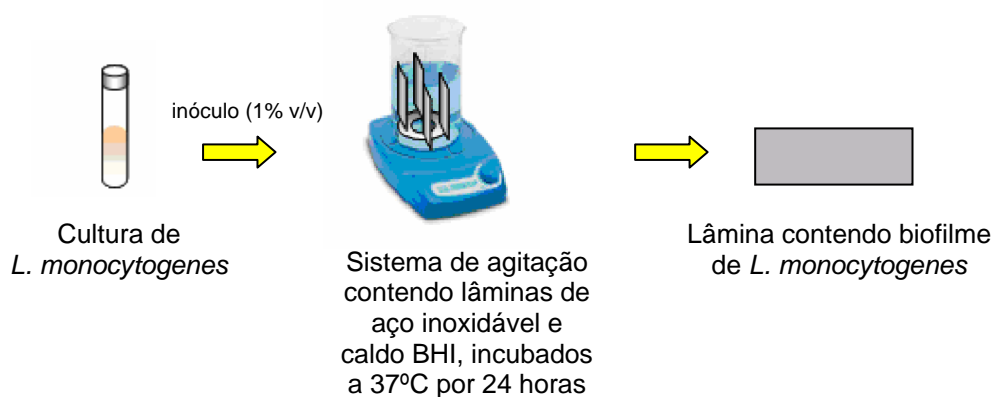
Foram utilizadas as cepas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b), *Lactobacillus sakei* 1 e *Leuconostoc mesenteroides* A 11 (produtores de bacteriocinas) e *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 e *Leuconostoc mesenteroides* A 13 (não produtores de bacteriocina), pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP).

#### 3.2. Formação de biofilme por *L. monocytogenes* com agitação

Para formação de biofilmes por *L. monocytogenes* foram utilizadas lâminas de aço inoxidável (AISI 304) com 15cm<sup>2</sup> de superfície e dimensões de 7,5cm x 2,0cm x 0,2cm. Estas lâminas foram tratadas de acordo com protocolo de Marsh; Luo e Wang (2003), com modificação. As lâminas foram lavadas com esponja embebida em uma solução de Extran MA02, fervidas durante 5 minutos em solução a 1% (v/v) de lauril sulfato de sódio (Vetec, Brasil). Em seguida, as lâminas foram enxaguadas em água corrente de torneira e em água destilada, imersas em álcool etílico 95% por 5 minutos e novamente enxaguadas com água destilada.

As células de *L. monocytogenes* foram reativadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, 8 mL foram inoculados (1% v/v) em um béquer contendo 800mL de caldo BHI e um suporte circular de aço inoxidável, com diâmetro de 4,5cm para acomodar seis lâminas de aço inoxidável em posição vertical, previamente esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos. A

agitação foi realizada com barra magnética em agitador magnético (Fisatom 752, 15 rpm). O sistema foi mantido a 37°C por 24 horas, conforme a figura 3.



**Figura 3.** Representação esquemática da formação de biofilme em lâmina de aço inoxidável sob agitação.

### 3.2.1. Formação de biofilme de *L. monocytogenes* em condições de estresse

Para avaliação da formação de biofilme de *L. monocytogenes* foi também utilizado caldo BHI suplementado com NaCl 5% e sacarose 2% em ocasiões diferentes.

### 3.2.2. Estudos com bacteriocinas semi-purificadas

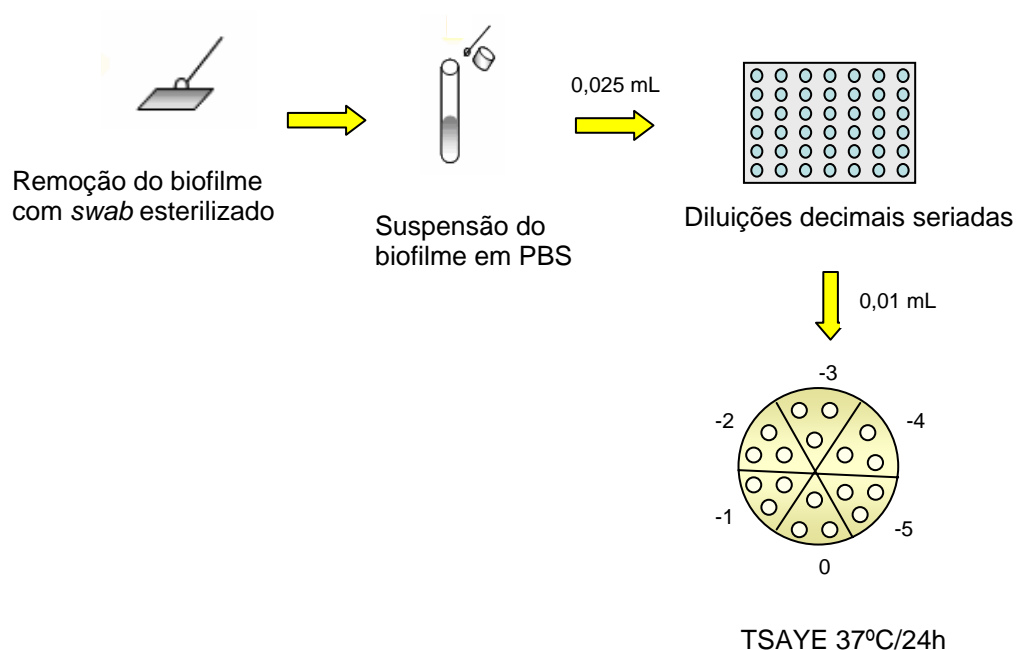
Foi avaliada a formação de biofilme de *L. monocytogenes* na presença de bacteriocina semi-purificada de *L. sakei* 1 e *L. mesenteroides* A 11. Para obtenção das bacteriocinas, *L. sakei* foi reativado em MRS, por 24 horas a 25°C, e *L. mesenteroides* foi reativado em caldo BHI, por 24 horas a 37°C. Após esse período, cada uma das culturas foi inoculada a 1% v/v em erlenmeyers diferentes contendo caldo MRS e incubado por 24 horas com as temperaturas já descritas. Cada cultura foi centrifugada a 6720g (Centrífuga Sorvall RC Plus, Du Pont, EUA) por 20 minutos

a 4°C. O sobrenadante foi filtrado a vácuo em membrana 0,22µm (Millipore, USA) para obtenção da bacteriocina semi-purificada. Este filtrado foi neutralizado com NaOH 4mol/L e utilizado na proporção de 1:1 v/v com caldo BHI para estudos de formação de biofilmes. Antes do uso para formação de biofilmes, foram feitos ensaios com o filtrado de cultura de *L. sakei* e *L. mesenteroides* produtores e não produtores de bacteriocinas para a avaliação da inibição da bacteriocina frente a *L. monocytogenes* segundo metodologia descrita por Lewus; Kaiser e Montville (1991).

### **3.3. Enumeração de *L. monocytogenes* em biofilmes**

#### **3.3.1. Semeadura em placa**

A enumeração de *L. monocytogenes* aderida à superfície abiótica (15 cm<sup>2</sup>) foi realizada de acordo com a técnica descrita por Chae e Schraft (2000) com algumas modificações. As bactérias aderidas à superfície das lâminas de aço inoxidável foram removidas por fricção manual (100 vezes) com o auxílio de um *swab* esterilizado. A amostra assim obtida foi transferida para um tubo contendo 10 mL de solução salina fosfatada tamponada pH 7,0 (PBS do inglês "*Phosphate buffered saline*"), constituída por cloreto de sódio (0,8%) (Synth, Brasil), cloreto de potássio (0,020%) (Merk, Alemanha), fosfato de sódio dibásico (0,115%) (Vetec, Brasil) e fosfato de potássio monobásico (0,020%) (Synth, Brasil). O tubo foi agitado vigorosamente para que as bactérias ficassem suspensas na solução tamponante. Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas em PBS e o número de células foi determinado por meio de semeadura de 0,01 mL de cada diluição em superfície de ágar soja tripticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSAYE, Oxoid) em triplicata, conforme ilustra a Figura 4.



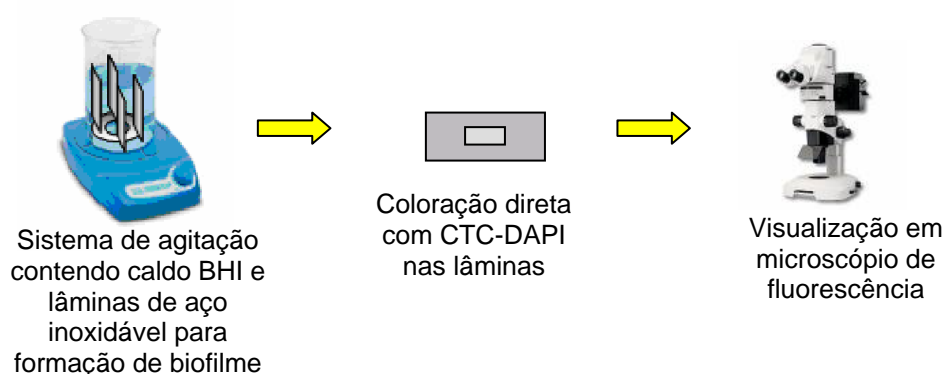
**Figura 4.** Representação esquemática da enumeração das células bacterianas aderidas às lâminas de aço inoxidável por sementeira em placa.

### 3.3.2. Contagem direta com microscopia de fluorescência

Foi seguida a metodologia usada por Bredholt et al. (1999) com modificações e todos os experimentos foram realizados sem exposição direta à luz para não comprometer a estabilidade dos corantes. A lâmina contendo o biofilme de *L. monocytogenes* foi recoberta em toda sua extensão com 2mL de cloreto de 5-ciano-2,3-di-(p-tolil) tetrazólio (CTC) 5mM (Polysciences, EUA) e incubada por 2 horas a 30°C. O corante foi removido e a lâmina foi coberta com 2 mL de solução de formaldeído (Synth, Brasil) 4% por 30 minutos em temperatura ambiente. A solução de formaldeído foi retirada e 2 mL de solução de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA), foi adicionada e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. A lâmina foi lavada com PBS, coberta com lamínula, em seguida, foram realizadas contagens em 10 campos aleatórios de  $1,9 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$  e foi



calculada a média das contagens. A observação das lâminas foi feita em microscópio de fluorescência Axioskop (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) modelo 1021795868 1/1 em objetiva com aumento de 1000x e filtro 05 (absorção: 395nm e emissão: 440nm). Foi utilizada uma câmera fotográfica modelo AxioCam HRc (Zeiss) e o programa AxionVision Release 4.7 05-2008 (Zeiss) para captura das imagens (Figura 5).



**Figura 5.** Representação esquemática da técnica de coloração CTC-DAPI em lâminas de aço inoxidável.

### 3.3.3. Ensaios preliminares com PCR em tempo real

#### 3.3.3.1. Extração de DNA

##### 3.3.3.1.1. Cultura pura de *L. monocytogenes*

A extração de DNA foi feita por aquecimento segundo Jothikumar; Wang; Griffiths, (2003) com algumas modificações. Amostras de culturas puras de *L. monocytogenes* em caldo BHI e incubadas por 24 horas a 37°C, foram centrifugadas a 12.000 x g por 2 minutos (Centrífuga Sorvall Pico, Alemanha). O sedimento foi ressuspensionado em 100µL de água deionizada esterilizada e em seguida levado à

fervura por 10 minutos. Após o aquecimento, a amostra foi resfriada em banho de gelo por 2 minutos e em seguida centrifugada em 12.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi usado como *template* na PCR.

A absorbância dos extratos obtidos foi determinada por espectrofotometria na faixa de ultravioleta (UV) com o aparelho SHIMADZU UV-mini 1240 (Kyoto, Japão) para quantificação de DNA de fita dupla, considerando que 50ng de DNA por microlitro fornecia densidade ótica de 1,0 a 260nm (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Os extratos de DNA com concentrações estimadas, obtidos da cultura de *L. monocytogenes* foram utilizados como padrões na quantificação por PCR em tempo real.

#### **3.3.3.1.2. Extração de DNA de biofilmes de *L. monocytogenes***

Biofilmes de *L. monocytogenes* em lâminas de aço inoxidável foram obtidos segundo o item 3.2. As bactérias aderidas às lâminas de aço inoxidável (parte superior e inferior, em um total de 30 cm<sup>2</sup>) foram removidas por fricção manual por 100 vezes em cada lado da lâmina com o auxílio de um *swab* esterilizado. A amostra assim obtida foi transferida para um tubo contendo 4 mL de solução salina fosfatada tamponada. O tubo foi agitado vigorosamente e 1 mL desta suspensão foi utilizado para extração de DNA conforme item 3.3.3.1.1.

#### **3.3.3.2. Tratamento de culturas puras de *L. monocytogenes* com brometo de etídio monoazídico (EMA)**

Amostras de cultura pura de *L. monocytogenes* em caldo BHI foram submetidas a tratamento com brometo de etídio monoazídico antes da extração de DNA, empregando-se células viáveis e células mortas.

Para o tratamento de células viáveis foram utilizadas alíquotas de cultura pura de *L. monocytogenes* em caldo BHI 24h/37°C com solução de brometo de etídio monoazídico-EMA (Sigma-Aldrich, EUA) em diferentes concentrações (sem EMA, 1, 5, 10, 25, 50 µg/mL), conforme descrito por Lee e Levin, (2006) com algumas modificações.

Para avaliar a capacidade do EMA inibir a amplificação de DNA de células mortas foi utilizada uma alíquota da amostra de cultura pura de *L. monocytogenes* ATCC 19115 empregada previamente para avaliar o tratamento de EMA em células viáveis. Antes do tratamento com EMA esta amostra foi levada à fervura por 10 minutos para a morte das células. Após o tratamento térmico, EMA foi adicionada nas mesmas concentrações previamente descritas para o tratamento com células viáveis.

As amostras de células viáveis e mortas tratadas ou não com EMA foram incubadas no escuro por 5 minutos e em seguida expostas por 5 minutos à luz de lâmpada de halogênio de 550 W (FLC) a uma distância de 20 cm em banho de gelo.

### 3.3.3.3. Quantificação por PCR em tempo real

Após a extração do DNA, foi realizada a PCR em tempo real para amplificação e quantificação do gene *hly* utilizando os *primers* descritos na tabela 1. Para otimização da PCR em tempo real foram realizados testes com diferentes quantidades de *primers*, DNA e água Milli-Q, além de diferentes temperaturas de ciclagem.

O volume total de reação de 25µL para extratos de DNA obtidos a partir de cultura pura foi composto de 4 µL de amostra de DNA, 12,5 µL do mix ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, Reino Unido), 6 µL de água Milli-Q (Millipore, EUA) e 1,25 µL de cada *primer hly* (LR e LF) (Invitrogen, EUA) com concentração final de 0,25 µM.

Para a análise do DNA extraído de amostra de biofilme também foi utilizado volume total de reação de 25µL, composto de 10 µL de amostra de DNA, 12,5 µL do mix ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, Reino Unido) e 1,25 µL de cada *primer hly* (LR e LF) (Invitrogen, EUA) com concentração final de 0,25 µM.

O protocolo de amplificação consistiu de uma etapa inicial de 15 min a 95 °C, seguida de 45 ciclos de repetições com desnaturação de 95°C por 02 segundos, anelamento a 55°C por 10 segundos e extensão por 72 °C por 10 segundos.

Após amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a curva de dissociação (do inglês “*melting curve*”) a temperatura crescente (0,3°C/s) de 60 °C até 95 °C, para se obter a temperatura de fusão do *amplicon*. As reações foram realizadas em termociclador Mini-Opticon (Bio-Rad Laboratories, EUA). Os resultados das curvas de amplificação e dos valores do Ct (do inglês “*cycle threshold*”) obtidos foram analisados através do *software* MJOpticon Monitor 3.1 (Bio-Rad Laboratories, EUA).

**Tabela 1** - Especificações do *primer hly* previamente descrito por Jothikumar; Wang; Griffiths (2003).

Primer	Gene	Seqüência 5'-3'	Pares de base
LR	<i>hly</i>	ACT CCT GGT GTT TCT CGA TT	20
LF	<i>hly</i>	TCC GCA AAA GAT GAA GTT C	19

A especificidade do *primer hly* foi avaliada frente ao DNA de *L. innocua* ATCC 33090 e *L. sakei* ATCC15521. Para avaliação do limite de detecção foi realizada extração do DNA de cultura pura de *L. monocytogenes* ATCC 19115 obtidas em caldo BHI 24h/37°C. O DNA da cultura foi quantificado em µg/mL por espectrofotometria (conforme item 3.3.3.1.1). Para cálculo do número de cópias de DNA de *L. monocytogenes* presentes no extrato, foi considerado que cada célula continha uma

cópia de DNA, e cerca de  $6 \times 10^{23}$  moléculas de DNA ou UFC de *L. monocytogenes* corresponde a  $2 \times 10^9$  g (De MARTINIS; DUVALL; HITCHINS, 2007).

Durante a padronização das técnicas, os produtos de amplificação foram também caracterizados por eletroforese em gel de agarose. Para isso, 5  $\mu$ L da mistura de reação contendo o *amplicon* obtido por PCR em tempo real foi acrescida de 3  $\mu$ L de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) e foram aplicados no gel de agarose 3% (Invitrogen, EUA), contendo brometo de etídio 0,5 $\mu$ g/mL (Vetec, Brasil). O tampão de desenvolvimento da eletroforese foi TAE 1X (Tris-base 0,04M, EDTA, 0,001M, acetato de sódio, 0,04M) pH 8,5. O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 110V a 1,81A pela fonte FB 200 (Fisher Scientific, EUA) durante 1 hora e 15 minutos. Após a eletroforese, o gel de agarose foi colocado sobre transiluminador ultravioleta para fotodocumentação (MiniBis UV, DNR Bio-Imaging Systems, Israel). O peso molecular dos produtos de PCR (98pb) foi avaliado pela comparação com o marcador de DNA (50pb DNA *ladder*-Invitrogen, EUA), também submetido a eletroforese no mesmo gel.

### 3.4. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas e as análises estatísticas dos resultados foram realizadas com o software SigmaStat 3.2 (Jandel Scientific, Alemanha). Para verificar se houve diferenças significativas entre a contagem de bactérias em biofilme por microscópio de fluorescência em relação a contagem padrão em placa foi realizado o t-test considerando  $p < 0,05$ . Os dados obtidos a partir de biofilmes formados com meio de cultura BHI e em diferentes condições foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni ao nível de 0,05 ou 5 % de significância para verificar diferenças entre os grupos.

*Resultados*

---

---

## 4. RESULTADOS

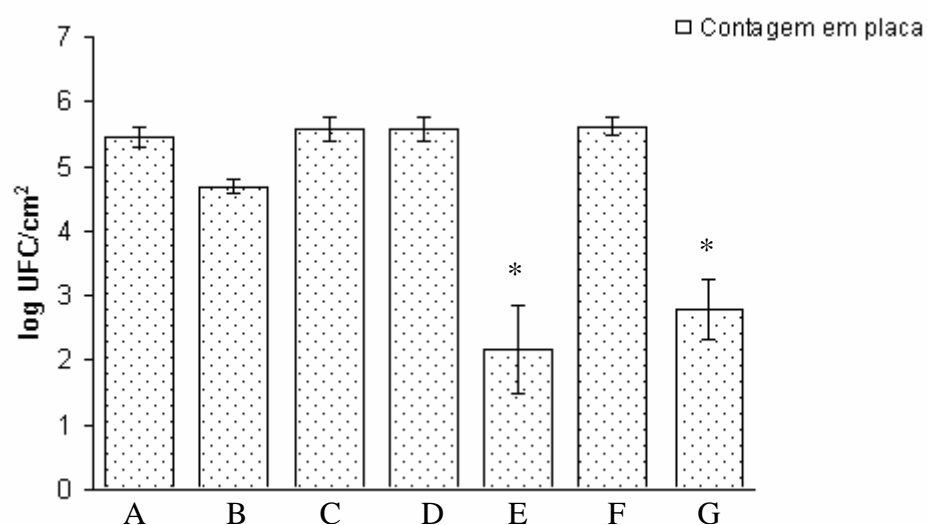
Neste trabalho, foram estudadas técnicas para a enumeração de células em biofilmes, considerando formação de biofilme como a presença de um número maior ou igual a  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> aderidas às lâminas de aço inoxidável (3,0 log de UFC por cm<sup>2</sup>) (WIRTANEN; HUSMARK; MATTILA-SANDHOLM, 1996).

### 4.1. Semeadura em placa

Foi avaliada a capacidade de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em caldo BHI e em caldo BHI adicionado de 5% de NaCl, 2% de sacarose e extratos de culturas de *L. sakei* e *L. mesenteroides* produtoras e não produtoras de bacteriocinas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (Apêndice A).

Quando cultivada em caldo BHI, a população de *L. monocytogenes* aderida às lâminas de aço inoxidável, determinada em ágar TSAYE, foi de 5,5 log de UFC/cm<sup>2</sup> (Figura 6).

Os resultados obtidos com a avaliação da formação de biofilmes de *L. monocytogenes* na presença de bacteriocina produzida por *L. sakei* 1 (6400 UA/mL) e *L. mesenteroides* 11A (3200 UA/mL), demonstraram que não houve formação de biofilmes (populações de 2,2 e 2,8 log de UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente). Entretanto, na presença de sobrenadante das culturas não produtoras de bacteriocinas, *L. monocytogenes* foi capaz de aderir às lâminas, com média de 5,6 log de UFC/cm<sup>2</sup> para sobrenadante de *L. sakei* ATCC 15521 e 5,7 log de UFC/cm<sup>2</sup> para sobrenadante de *L. mesenteroides* 13A. Em caldo BHI adicionado de 5% de NaCl foi observada população média de 4,6 log de UFC/cm<sup>2</sup> de células aderidas e de 5,6 log de UFC/cm<sup>2</sup> quando cultivados com 2% sacarose.



**Figura 6.** População de *L. monocytogenes* aderidas às lâminas de aço inoxidável determinada pelo método de semeadura em placa após cultivo em diferentes condições: **A)** Caldo BHI (controle), **B)** Caldo BHI + NaCl 5%, **C)** Caldo BHI + Sacarose 2%, **D)** Caldo BHI + Bac- (*L. sakei* ATCC15521), **E)** Caldo BHI + Bac+ (*L. sakei* 1), **F)** Caldo BHI + Bac- (*L. mesenteroides* 13), **G)** Caldo BHI + Bac+ (*L. mesenteroides* 11).

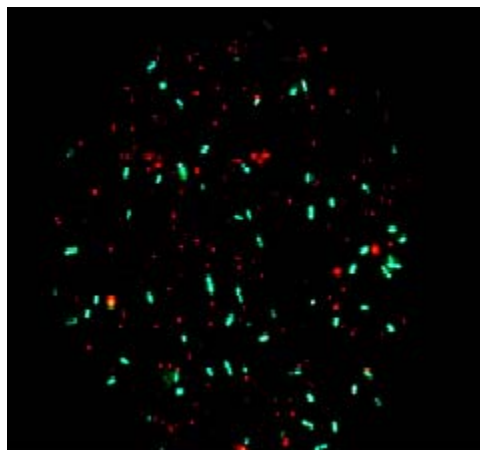
\* Diferença estatística em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni para verificar diferenças entre a formação de biofilme no meio de cultura BHI e as condições aplicadas. Considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), houve diferença significativa somente na avaliação da formação de biofilme na presença das preparações contendo bacteriocinas de *L. sakei* 1 ( $p < 0,001$ ) e de *L. mesenteroides* 11 ( $p < 0,001$ ).



#### 4.2. Determinação das populações de *L. monocytogenes* por coloração CTC-DAPI em microscopia de fluorescência

A formação de biofilme por *L. monocytogenes* foi avaliada por microscopia de fluorescência nas mesmas condições utilizadas para a semeadura em placa (Apêndice B). A figura 7 ilustra resultado obtido pelo método de microscopia de fluorescência. A média dos números de células viáveis coradas com CTC quando cultivadas em caldo BHI foi de 5,10 log de UFC/cm<sup>2</sup> (Figura 8).



**Figura 7.** Fotomicrografia de lâmina de aço inoxidável contendo células de *L. monocytogenes* aderidas e coradas com CTC-DAPI após cultivo em caldo BHI (24h/37°C) e observadas sob microscopia de fluorescência (Filtro 05 - absorção: 395nm e emissão: 440nm, aumento 1000x): células verdes = células não viáveis coradas com DAPI e células vermelhas = células viáveis coradas com CTC.

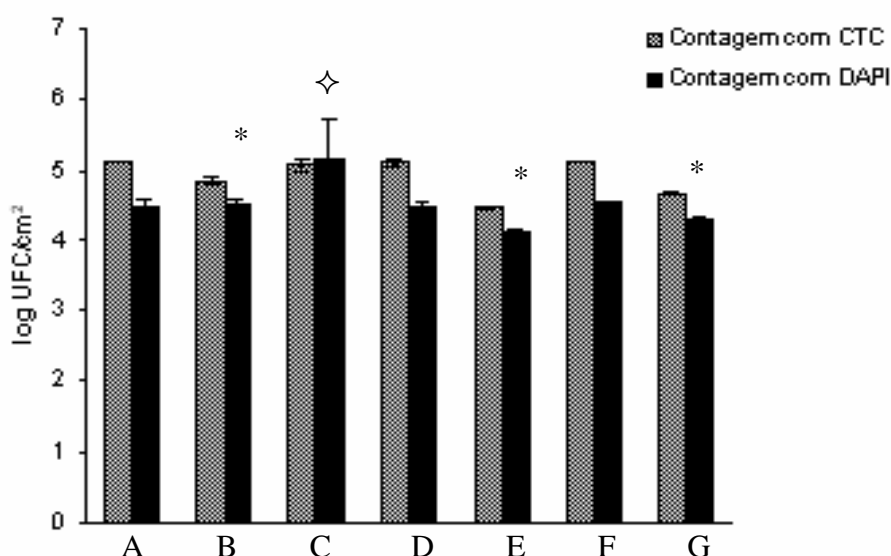
Em presença de NaCl 5% e sacarose 2% no meio de cultivo, as médias das populações de células viáveis de *L. monocytogenes* determinadas com CTC foram respectivamente, 4,8 e 5,1 log de UFC/cm<sup>2</sup>.

Foi demonstrado também que as médias das populações de *L. monocytogenes* viáveis coradas com CTC foram de 4,5 log de UFC/cm<sup>2</sup> na presença de bacteriocina de *L. sakei* 1 e 4,7 log de UFC/cm<sup>2</sup> na presença de bacteriocina de *L. mesenteroides* 11.

Na avaliação da formação de biofilmes em caldo BHI adicionado de extratos de culturas de *L. sakei* ATCC15521 e *L. mesenteroides* 13 (não produtores de

bacteriocinas) foram encontradas populações médias de *L. monocytogenes* de 5,1 e 5,1 log de UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

Os valores das contagens de células de *L. monocytogenes* não viáveis coradas com DAPI ficaram entre 4,1 log de UFC/cm<sup>2</sup> e 5,2 log de UFC/cm<sup>2</sup> para as condições estudadas.



**Figura 8.** Populações de *L. monocytogenes* aderidas às lâminas de aço inoxidável determinada pela coloração CTC-DAPI após cultivo em diferentes condições: **A)** Caldo BHI (controle), **B)** Caldo BHI + NaCl 5%, **C)** Caldo BHI + Sacarose 2%, **D)** Caldo BHI + Bac- (*L. sakei* ATCC 15521), **E)** Caldo BHI + Bac+ (*L. sakei* 1), **F)** Caldo BHI + Bac- (*L. mesenteroides* 13), **G)** Caldo BHI + Bac+ (*L. mesenteroides* 11).

\* Diferença estatística em relação às células do controle coradas com CTC (p<0,05).

◇ Diferença estatística em relação às células do controle coradas com DAPI (p<0,05)

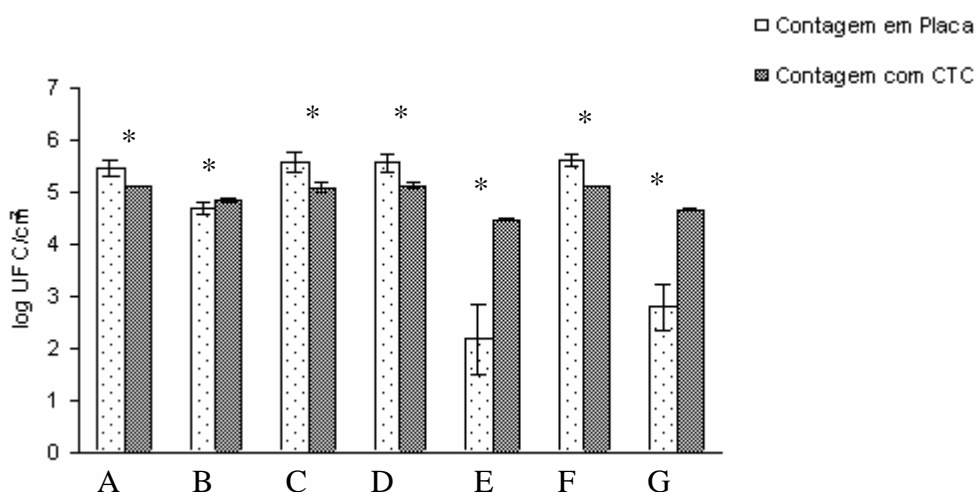
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni para verificar diferenças entre a formação de biofilme no meio de cultura BHI e nas condições aplicadas.

Considerando o nível de significância de 5% (p<0,05), houve diferença significativa na avaliação da formação de biofilme (células viáveis coradas com CTC) em presença de bacteriocina de *L. sakei* 1 (p<0,001), bacteriocina de *L.*

*mesenteroides* 11 ( $p < 0,001$ ) e na presença de NaCl 5% ( $p < 0,001$ ), enquanto que na enumeração de *L. monocytogenes* corada com o DAPI, só houve diferença significativa em presença de sacarose 2% ( $p = 0,007$ ).

#### 4.3. Comparação entre as populações de *L. monocytogenes* determinadas por semeadura em placa e por coloração com CTC-DAPI em microscopia de fluorescência

Segundo análise estatística dos dados, foi encontrada diferença o método de semeadura e microscopia em todas as condições testadas (Figura 9) (Apêndice C). A maior diferença entre as contagens de células viáveis entre os métodos foi observada na presença de bacteriocinas, sendo cerca de 2 log UFC/cm<sup>2</sup> maior na determinação por microscopia.

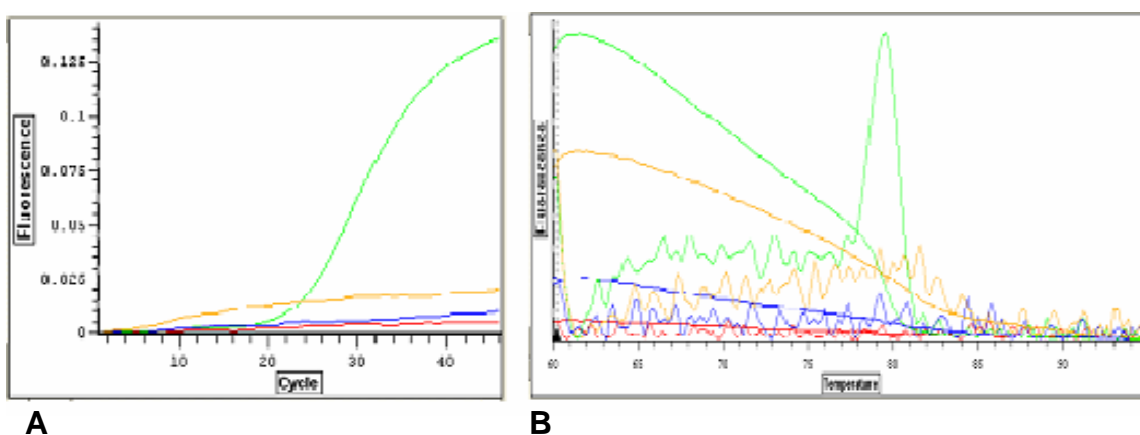


**Figura 9.** Comparação das populações de células viáveis de *L. monocytogenes* aderidas a lâminas de aço inoxidável, determinada pelo método de semeadura em placas de TSAYE e coloração com CTC-DAPI em diferentes condições: **A)** Caldo BHI (controle), **B)** Caldo BHI + NaCl 5%, **C)** Caldo BHI + Sacarose 2%, **D)** Caldo BHI + Bac- (*L. sakei* ATCC 15521), **E)** Caldo BHI + Bac+ (*L. sakei* 1), **F)** Caldo BHI + Bac- (*L. mesenteroides* 13), **G)** Caldo BHI + Bac+ (*L. mesenteroides* 11).

\* Diferença estatística entre os dois métodos ( $p < 0,05$ ).

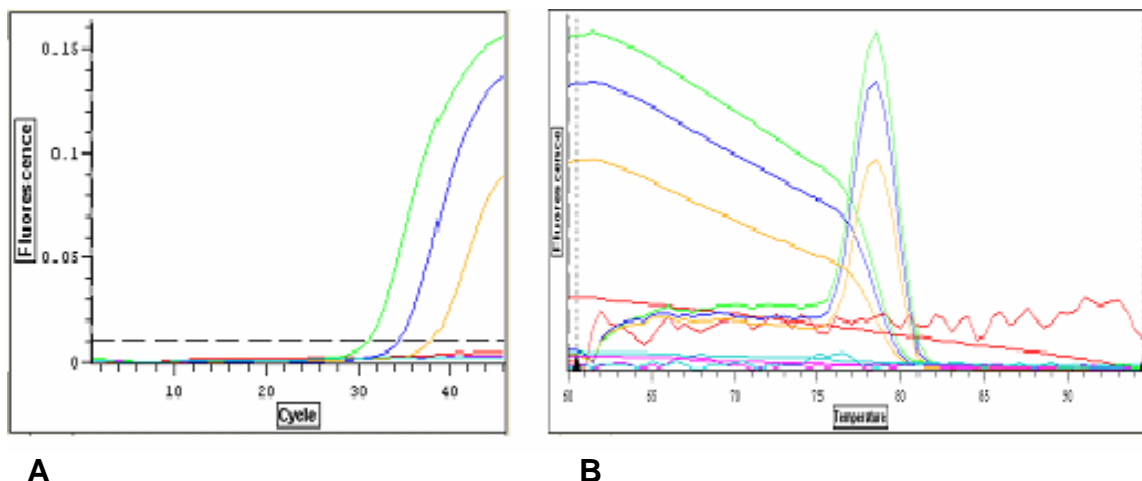
#### 4.4. Ensaios preliminares com PCR em tempo real

Nas condições testadas, houve amplificação do DNA de *L. monocytogenes* (Figura 10 A) e a temperatura de fusão ( $T_m$  do inglês “*melting temperature*”) do amplicon encontrada na curva de dissociação foi de 78,9°C (Figura 10 B). Não houve amplificação do DNA de *L. innocua* ATCC 33090 e nem de *L. sakei* ATCC15521 na presença do primer *hly*.



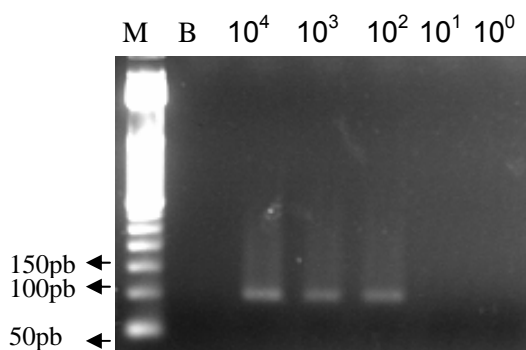
**Figura 10.** Curva de amplificação de PCR em tempo real (A) e curva de dissociação (“*melting curve*”) (B) da análise da especificidade do primer para o gene *hly* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003): ■ Branco, ■ *L. monocytogenes* ■ *L. sakei* ATCC15521, ■ *L. innocua* ATCC33090.

Um extrato de DNA foi obtido a partir de cultura pura de *L. monocytogenes* e foi determinada a presença de cerca de  $1,6 \times 10^{11}$  cópias de DNA por mL. Foram preparadas diluições decimais da amostra de DNA e foi realizada detecção por PCR em tempo real. Foram utilizadas amostras de  $10^0$  a  $10^4$  cópias de DNA (Figura 11) em 25 $\mu$ L de volume final de reação. Nas condições estudadas, foi observado que a amplificação ocorreu na presença de no mínimo  $10^2$  cópias de DNA de *L. monocytogenes* por reação, sendo obtida uma temperatura de fusão do amplicon ( $T_m$ ) de 78,4°C (Figura 11 B).



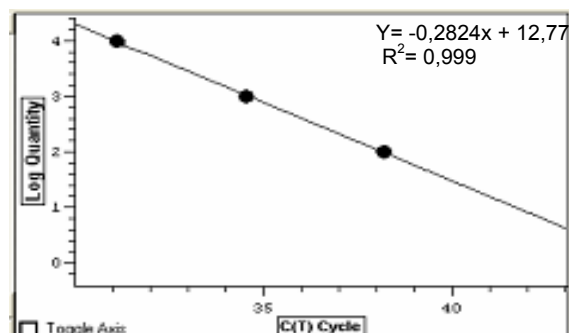
**Figura 11.** Resultados de análises para determinação do limite de detecção do método (A) Curva de amplificação de PCR em tempo real obtidas com o *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003) e (B) curva de dissociação (“*melting curve*”): ■ Branco ■  $10^4$  cópias de DNA por reação ■  $10^3$  cópias de DNA por reação, ■  $10^2$  cópias de DNA por reação, ■  $10^1$  cópias de DNA por reação, ■  $10^0$  cópias de DNA por reação.

O *amplicon* da reação também foi analisado por eletroforese em gel de agarose (Figura 12) e os dados obtidos demonstraram que não houve formação de produtos inespecíficos, confirmando que o tamanho do fragmento de DNA amplificado (98pb) era semelhante ao descrito na literatura para o mesmo *primer* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003).



**Figura 12.** Fotografia de gel de agarose do *amplicon* obtido previamente por PCR em tempo real com *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003) e diluições seriadas da amostra: M) marcador de 50pb, B) branco, e na seqüência, diluição seriada de  $10^4$   $10^3$   $10^2$   $10^1$   $10^0$  cópias de DNA por reação.

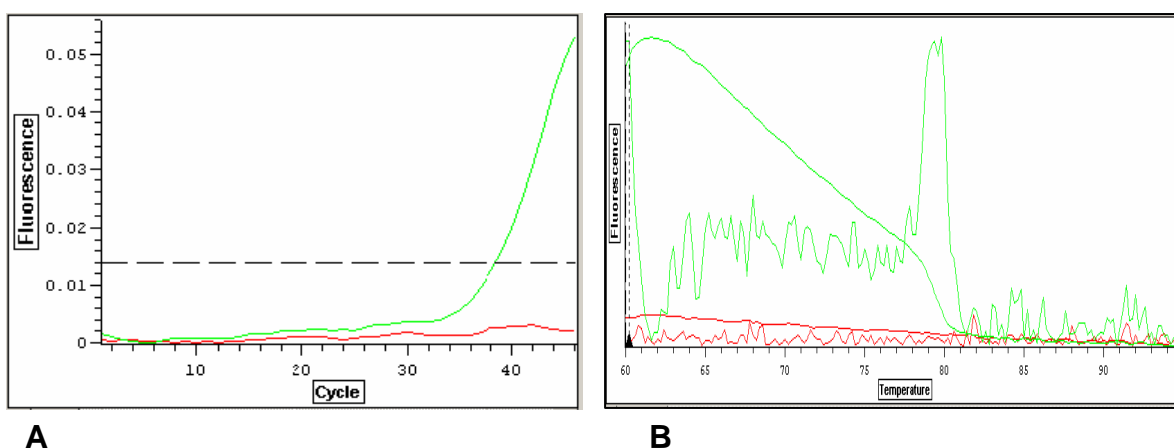
A linearidade do método também foi avaliada com a amplificação das amostras de  $10^0$  a  $10^4$  cópias de DNA e foi obtido coeficiente de correlação de  $R^2 = 0,999$  (Figura 13).



**Figura 13.** Curva de linearidade do método de PCR em tempo real obtida com diluições decimais seriadas de DNA extraído de *L. monocytogenes* e amplificado com *primer* para o gene *hly* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003), mostrando a equação da reta e o coeficiente de correlação.

#### 4.4.1. Análise da amostra de biofilme de *L. monocytogenes*

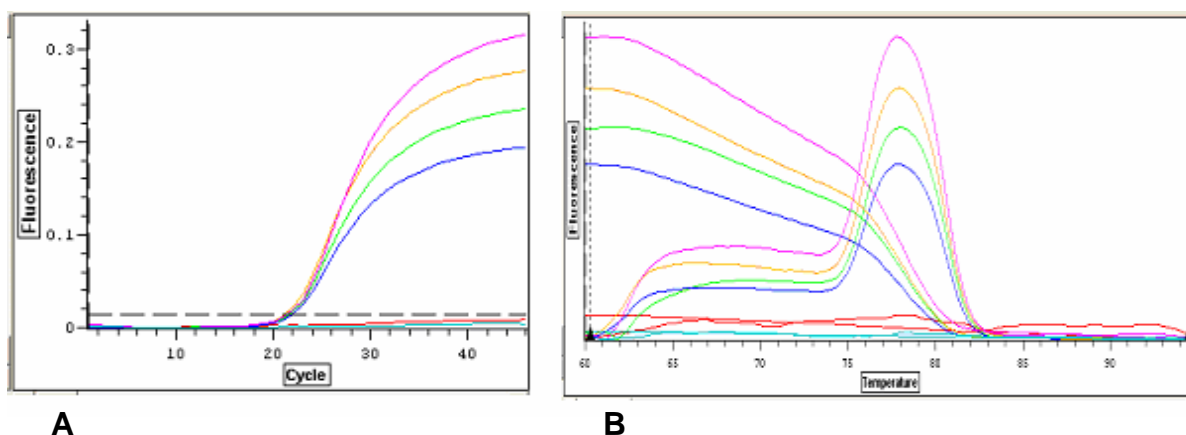
Foi observada a amplificação do DNA de amostra de biofilme de *L. monocytogenes* com PCR em tempo real (Figura 14 A) e foi encontrada a temperatura de fusão ( $T_m$  do inglês “melting temperature”) para o *amplicon* de  $79,1^\circ\text{C}$  (Figura 14 B).



**Figura 14.** Resultados de análises obtida da amostra de biofilme de *L. monocytogenes* (A) Curva de amplificação do DNA por PCR em tempo real obtidas com o *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003) e (B) curva de dissociação (“melting curve”): ■ Branco ■ amostra de biofilme de *L. monocytogenes*.

#### 4.4.2. Tratamento com Brometo de Etídio Monoazídico (EMA)

Na Figura 15A está mostrado que houve inibição completa da amplificação do DNA, quando as células viáveis de *L. monocytogenes* foram tratadas com 50µg/mL de EMA. Para as amostras sem tratamento com EMA e com EMA nas concentrações de 1, 5, 10 µg/mL, não houve interferência na etapa de amplificação, sendo obtidos valores de Ct próximos (Tabela 2). Estes resultados demonstraram que o tratamento das amostras com EMA nas concentrações de 1 a 10 µg/mL não interferiu na amplificação de células viáveis (Tabela 2). Na curva de dissociação (Figura 15B) foi obtido um  $T_m$  de 78,30°C para todas as amostras.



**Figura 15.** Resultados de experimentos para avaliação da interferência de diferentes concentrações de brometo de etídio monoazídico (EMA) na amplificação por PCR em tempo real com o *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003), a partir de culturas em caldo Infusão Cérebro Coração, 37°C/24h: (A) Curva de amplificação e (B) curva de dissociação (“*melting curve*”). Amostras tratadas com ■ EMA 1 µg/mL, ■ EMA 5 µg/mL, ■ EMA 10 µg/mL, ■ EMA 50 µg/mL ■ amostra sem tratamento com EMA, ■ branco, sem *L. monocytogenes*.

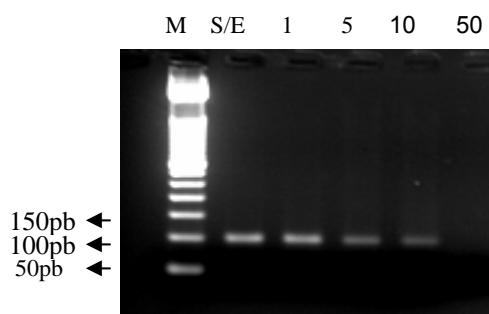
**Tabela 2** - Valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos em amplificação por PCR em tempo real com o *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003) e número de cópias de DNA calculados\*.

Tratamento da amostra <sup>1</sup>	Ct	Número de cópias de DNA, calculado com por meio de reações de PCR em tempo
Sem EMA	21,66	4,96 x 10 <sup>7</sup>
EMA 1 µg/mL	21,96	4,37 x 10 <sup>7</sup>
EMA 5 µg/mL	21,25	4,65 x 10 <sup>7</sup>
EMA 10 µg/mL	21,53	5,89 x 10 <sup>7</sup>
EMA 50 µg/mL	-	-

<sup>1</sup>EMA = brometo de etídio monoazídico

\* DNA obtido por extração a quente (fervura/10 minutos) de *Listeria monocytogenes* cultivada em caldo Infusão Cérebro Coração (24h/37°C).

Os *amplicons* resultantes das reações de PCR de *L. monocytogenes* viáveis na presença ou ausência de EMA, também foram analisados por eletroforese em gel de agarose e os dados obtidos confirmaram que não houve amplificação inespecífica e estava presente o *amplicon* de 98 pb (Figura 16).

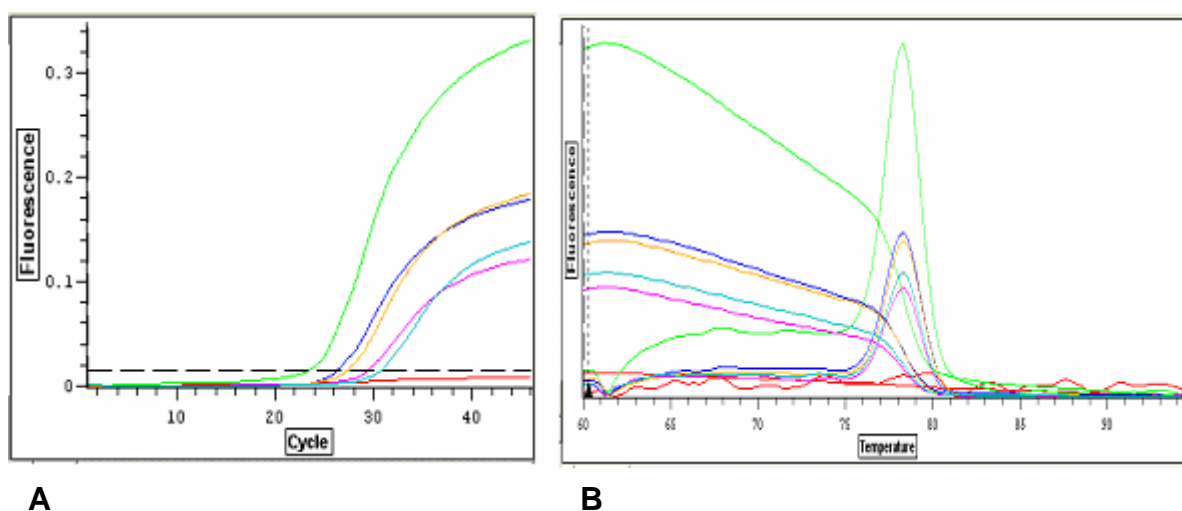


**Figura 16.** Fotografia de gel de agarose de mostrando bandas relativas aos *amplicons* obtidos com por amplificação do DNA de amostras de *L. monocytogenes*, tratadas ou não com diferentes concentrações do brometo de etídio monoazídico (EMA): M = marcador de 50pb; S/E = amostra sem EMA e amostras tratadas com 1, 5, 10 e 50 µg/mL de EMA.

Também foi avaliada a capacidade de EMA inibir a amplificação de DNA de células mortas. Conforme a Figura 17, os resultados demonstraram que a amplificação da amostra de *L. monocytogenes* tratada termicamente sem a adição



de EMA ocorreu normalmente, mas houve inibição da amplificação das amostras tratadas com EMA (Tabela 3). Quando os valores de Ct foram convertidos para números de cópias de DNA, foi observado que o tratamento com o EMA foi capaz de reduzir cerca de 1 ciclo log UFC oriundas do DNA de células mortas (Tabela 3). A  $T_m$  obtida com a curva de dissociação foi de 78,30°C (Figura 17B).



**Figura 17.** Resultados de experimentos para avaliação da interferência de diferentes concentrações de brometo de etídio monoazídico (EMA) na amplificação por PCR em tempo real com o *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003), a partir de culturas obtidas em caldo Infusão Cérebro Coração, 37°C/24h e submetidas à fervura: amostras tratadas com ■ EMA 1 µg/mL, ■ EMA 5 µg/mL, ■ EMA 10 µg/mL, ■ EMA 50 µg/mL ■ amostra sem EMA; ■ Branco sem *L. monocytogenes*.

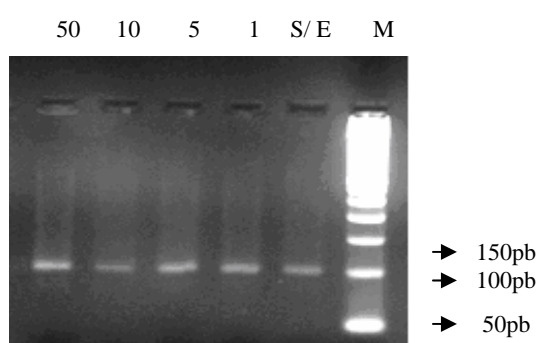
**Tabela 3** - Valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos por PCR em tempo real com *primer* para o gene *hly* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003) e de *L. monocytogenes* em caldo Infusão Cérebro Coração (37°C/24h), tratadas termicamente (fervura/10 minutos) antes da adição do brometo de etídio monoazídico (EMA), e número de cópias de DNA calculados\*.

Tratamento da amostra <sup>1</sup>	Ct	Número de cópias de DNA, calculado com por meio de reações de PCR em tempo
Sem EMA	23,30	2,47 x 10 <sup>7</sup>
EMA 1 µg/mL	26,28	7,02 x 10 <sup>6</sup>
EMA 5 µg/mL	27,26	4,65 x 10 <sup>6</sup>
EMA 10 µg/mL	29,34	1,93 x 10 <sup>6</sup>
EMA 50 µg/mL	30,60	1,31 x 10 <sup>6</sup>

<sup>1</sup>EMA = brometo de etídio monoazídico

\* DNA obtido por extração a quente de *Listeria monocytogenes* cultivada em caldo Infusão Cérebro Coração (24h/37°C).

O *amplicon* obtido a partir da PCR em tempo real do DNA de células mortas de *L. monocytogenes* com o *primer* para o gene *hly* e tratadas com brometo de etídio monoazídico foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Figura 18). Foi determinado o tamanho do *amplicon* (98pb) e não foram observadas bandas inespecíficas.



**Figura 18.** Fotografia de gel de agarose do *amplicon* obtido por PCR em tempo real com *primer* para o gene *hly* de *Listeria monocytogenes* (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003), a partir de culturas obtidas em caldo Infusão Cérebro Coração (37°C/24 h), submetidas à fervura e tratadas com diferentes concentrações de brometo de etídio monoazídico (EMA): M) marcador de 50 pb, S/E) amostra sem tratamento com EMA e na seqüência amostras tratadas com concentrações de 1, 5, 10 e 50 µg/mL de EMA.

*Discussão*

---

---

## 5. DISCUSSÃO

Foi estudada a formação de biofilmes em lâminas de aço inoxidável por *L. monocytogenes* quando cultivada em caldo BHI, caldo BHI adicionado de NaCl 5%, sacarose 2% e extratos de bactérias lácticas produtoras e não produtoras de bacteriocinas.

Na presença das bacteriocinas de *L. mesenteroides* 11 e de *L. sakei* 1 houve redução de cerca de 3 ciclos log de UFC/cm<sup>2</sup> na formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, determinada pelo método de semeadura em placa em placa. Em trabalho recente realizado por Minei et al. (2008) foi observado que *Enterococcus faecium* 130 (bac+) reduziu a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em até 5,9 ciclos log, indicando que cepas bacteriocinogênicas têm potencial de uso para o controle de contaminação por *L. monocytogenes*.

Outros trabalhos também demonstraram o amplo espectro de atividade antilisteriana de algumas bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas e seu potencial de uso na redução de patógenos em alimentos e formação de biofilmes (AMMOR et al., 2006; GHRAIRI et al., 2008; MINEI et al., 2008; TRIAS et al., 2008; ZHAO; DOYLE; ZHAO, 2004).

Além do uso de bacteriocinas, novas formas de se evitar a formação de biofilmes por bactérias patogênicas têm sido estudadas. Cabo et al. (2008) concluíram que a bacteriocina nisina utilizada em conjunto com água ozonizada apresentou grande potencial na prevenção da formação de biofilmes de *S. aureus*. Já Byun et al. (2007) estudaram biofilmes formados por *Acetobacter* e *Gluconobacter* e observaram que radiação gama reduziu grande número de células aderidas, sendo mais efetivo que o tratamento com hipoclorito de sódio. Em outros trabalhos foi demonstrado que alguns óleos essenciais possuíam efeito inibidor para

bactérias em biofilmes, como *Salmonella enteritidis*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* (LEBERT et al., 2007; SANDASI et al., 2008).

*L. monocytogenes* é reconhecida por sobreviver em ambientes hostis como refrigeração, presença de NaCl, ácidos e atmosfera modificada (FALEIRO; ANDREW; POWER, 2003; GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Neste trabalho, a capacidade de adaptação de *L. monocytogenes* também foi observada, pois na presença de NaCl 5% houve redução de apenas cerca de 1 log de UFC/cm<sup>2</sup> nas contagens de células aderidas à superfície de aço inoxidável, conforme determinado por semeadura em placa.

Em estudo realizado por Moretro et al. (2003) com *Staphylococcus* sp., na presença de glicose foi observada maior capacidade de formação de biofilmes para todas as sete cepas analisadas, enquanto que a presença de NaCl estimulou a formação de biofilmes em quatro das cepas estudadas. Aqueles autores sugeriram que houve influência da presença dos solutos na expressão de genes relacionados com a formação de biofilmes. Efeito semelhante pode ter ocorrido neste trabalho, onde não foi observada redução na formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em presença de sacarose 2%, determinada por semeadura em placa. No entanto, mecanismos de sobrevivência de *L. monocytogenes* em condições de estresse físico e químico não são completamente conhecidos (HARVEY; KEENAM; GILMOUR, 2007).

No presente trabalho também foi avaliado a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* com o uso dos corantes CTC-DAPI e microscopia de fluorescência. Foi observada a formação de biofilmes em todas as condições estudadas (Figura 8), indicando maior sensibilidade da técnica, que permite detectar a presença de

bactérias no estado VBNC, não quantificadas pelo método de contagem padrão em placa.

O número de células de *L. monocytogenes* no estado VBNC nos biofilmes foi maior na presença de bacteriocinas de *L. mesenteroides* 11 e *L. sakei* 1, sendo observada uma diferença de cerca de 2 log UFC/cm<sup>2</sup> entre as contagens em placa e por microscopia de fluorescência (Figura 9).

Estes resultados foram semelhantes àqueles relatados por Bredholt et al. (1999), que obtiveram populações de *Pseudomonas fragi* VTT E-86249, *L. monocytogenes* VTT E-94328, *Bacillus thuringiensis* VTT E-86245 aderidas às lâminas de aço inoxidável após tratamento com soluções desinfetantes, com valores de 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup> menores pelo método de semeadura em placa, comparado com a coloração com CTC-DAPI.

Parizzi et al. (2004) também realizaram a contagem direta de células de *Listeria innocua* L6a e de *S. aureus* ATCC 6538 em biofilmes em lâmina de aço inoxidável, por de microscopia de fluorescência, utilizando o corante laranja de acridina. Aqueles autores obtiveram pela contagem direta, populações cerca de 10 a 100 vezes maiores (4,5 x 10<sup>4</sup> e 4,5 x 10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) em comparação com o resultado de contagem em placa.

Yoshida e Hiraishi (2004) observaram que cerca de 8,7% da população de bactérias (*Comamonas testosteroni* e *Paracoccus pantotrophus*) obtidas de amostras de esgoto eram viáveis (contagem em placa), enquanto que, na análise microscópica com CTC este valor foi de 54%. Mesa et al. (2003) também obtiveram resultados parecidos ao analisar *Acetobacter aceti* (CECT 298), *Acetobacter pasteurianus* (CECT 474), e *Gluconobacter oxydans* ssp. *suboxydans*, obtidas em fermentação de vinagre, sendo que a contagem em placa forneceu um valor quatro

vezes menor que a contagem de bactérias metabolicamente ativas reveladas com o corante CTC.

As variações encontradas nos resultados de estudos de biofilmes com a técnica de CTC-DAPI em microscopia de fluorescência, pode ser atribuída em parte à falta de padronização do método, o que dificulta comparação de resultados. As maiores variações observadas nos estudos descritos na literatura sobre a aplicação desta técnica estão relacionadas à concentração e ao tempo de incubação utilizados, sendo que a concentração de CTC pode variar de 0,5mM até 10mM. A concentração de CTC mais amplamente empregada é de 5 mM, conforme foi selecionado para a realização do presente trabalho (CRÉACH et al., 2003; SERVAIS et al., 2001).

Dependendo do protocolo seguido e da atividade celular, os precipitados de CTC-formazano nas células, podem ocupar um espaço variado, desde uma pequena porcentagem até mesmo todo o volume celular (CRÉACH et al., 2003; EPSTEIN; ROSSEL, 1995; RODRIGUEZ et al., 1992; SONDERGAARD; DANIELSEN, 2001).

Na literatura, há relatos de alguns fatores que poderiam causar uma subestimativa do número real de células viáveis determinadas por coloração com CTC, pois seriam coradas somente as células mais ativas e, além disso, há possibilidade de ocorrer toxicidade para as células quando o corante é utilizado em altas concentrações (CRÉACH et al., 2003; SERVAIS et al., 2001; SONDERGAARD; DANIELSEN, 2001; YOSHIDA; HIRAISHI, 2004; ULLRICH et al., 1996).

Outro possível fator interferente na coloração com CTC é a ocorrência da redução não biológica do corante, que parece ser incomum, mas pode ser observada se houver utilização de protocolos experimentais inadequados (EPSTEIN; ROSSEL, 1995; SONDERGAARD; DANIELSEN, 2001).

Maukonem et al. (2000) observaram que presença de agentes redutores no meio de cultura poderia provocar a redução inespecífica do CTC. Além disso, outros pesquisadores sugeriram que temperatura, pH, concentração de nutrientes, presença de fosfatos, compostos de enxofre e agentes redutores também poderiam influenciar na taxa de redução do CTC, dificultando a detecção de células viáveis (BHUPATHIRAJU et al., 1999; BOULOS et al. 1999; CRÉACH et al. 2003). Outro aspecto que deve ser considerado na análise de amostras com corantes de viabilidade celular é o tempo decorrido desde a coloração até a observação microscópica, pois a fluorescência do CTC decai rapidamente pela exposição à luz ultravioleta e na presença de óleo de imersão (MAUKONEM et al., 2000).

Para permitir a melhor detecção de microrganismos presentes em biofilmes, métodos baseados em técnicas moleculares têm sido desenvolvidos, sendo uma das mais promissoras a reação da polimerase em cadeia com detecção em tempo real - RTi PCR (DE MARTINIS; DUVALL; HITCHINS, 2007; GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005;).

A técnica de RTi PCR foi utilizada em vários trabalhos para detecção de patógenos em alimentos, demonstrando rapidez, especificidade, sensibilidade e precisão, em comparação com métodos clássicos (BERRADA; SORIANO, 2006; DE MARTINIS; DUVALL; HITCHINS, 2007; JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008; KIM, J. S. et al., 2008; LAMBERTZ et al., 2008).

Durante a padronização da técnica de RTi PCR para detecção de *L. monocytogenes* neste estudo, os produtos de amplificação também foram submetidos a eletroforese em gel de agarose para confirmação avaliação da especificidade da amplificação, pela análise do tamanho do *amplicon* e também para



verificação da presença ou ausência de bandas inespecíficas, de acordo com Mckillip; Drake, 2004.

As características do *amplicon* obtido na amplificação do DNA de *L. monocytogenes* com o *primer hly* estavam de acordo com dados de Jothikumar; Wang; Griffiths (2003), que relataram um *amplicon* de 98pb determinado por análise em gel de agarose e  $T_m$  de 80°C na curva de dissociação por RTi PCR. *L. innocua* ATCC 33090 e *L. sakei* ATCC 15521 foram utilizados nos experimentos do presente trabalho para confirmar a especificidade de amplificação de *L. monocytogenes* com o *primer hly* nas condições utilizadas.

Os resultados preliminares deste estudo relativos às análises por RTi PCR revelaram que o método permitiu a detecção de até  $10^2$  cópias de DNA de *L. monocytogenes* por reação. Entretanto, há relatos da detecção de até 1,5 cópias moléculas de DNA por reação por RTi PCR (BERRADA; SORIANO, 2006; KIM, J. S. et al. 2008; SANDHYA; CHEN; MULCHANDANI, 2008).

Os ensaios preliminares de nosso estudo demonstraram potencial de aplicação da técnica de PCR em tempo real para o estudo de bactérias em biofilmes (figura 14). Conforme previamente sugerido por Guilbaud et al. (2005), Bruhn et al. (2006) e Kindaichi et al. (2006) a quantificação bactérias aderidas em biofilmes com o emprego de RTi PCR foi rápido e de fácil execução.

O sucesso da amplificação nas técnicas de biologia molecular depende em grande parte da eficiência dos protocolos de extração que devem permitir a recuperação de DNA de alta quantidade e qualidade (MAFRA et al., 2008 LIU 2008 PEANO et al. 2004). Além disso, uma variedade de agentes inibidores como reagentes utilizados para a extração do DNA, sais biliares, hemoglobina e componentes da matriz alimentícia podem estar presentes nas amostras e

influenciar os resultados obtidos por PCR em tempo real (GUESCINI et al., 2008; LIU, 2008; PEANO et al., 2004).

É importante ainda destacar que apesar do grande potencial da PCR para análise de microrganismos em alimentos e biofilmes, esta técnica apresenta limitações, uma vez que o método não distingue células viáveis de células mortas (CAWTHORN; WITTHUHN, 2008; PISZ et al., 2007; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; WANG; LEVIN, 2006).

O benefício do uso do EMA como corante intercalante de DNA de células mortas foi indicado por vários trabalhos como uma ferramenta promissora para enumeração seletiva da população viável de microrganismos presentes em uma amostra (LEE; LEVIN, 2006; NOCKER; CAMPER, 2006; RUDI et al., 2005).

Neste estudo, na análise de células de *L. monocytogenes* mortas e tratadas com EMA, foi observada redução de 1 log UFC em comparação com células sem tratamento (Tabela 3). Foi também determinado que o tratamento com EMA 50 µg/mL inibiu a amplificação de células viáveis (Tabela 2). Estes resultados indicam que a amplificação de células mortas de *L. monocytogenes* pode ser inibida com EMA, mas a técnica necessita ser melhor otimizada para permitir uma remoção de células mortas e não interferir a amplificação de células viáveis.

Nocker; Cheung e Camper (2006) demonstraram que embora para *E. coli* O157:H7 a interferência do DNA genômico de células mortas tenha sido eliminada pelo EMA, o tratamento também resultou em perda de aproximadamente 60% do DNA genômico de células viáveis na fase log. O mecanismo proposto para a perda parcial do DNA genômico provocado pelo EMA, foi a inibição metabólica, responsável por um menor efluxo de substâncias das células bacterianas. *S. typhimurium* e *S. marcescens* parecem ser as únicas espécies estudadas até o

momento em que tratamento com EMA não resultou em perda de DNA, provavelmente, por terem um mecanismo de efluxo mais eficiente e apresentarem uma menor taxa de penetração do EMA na membrana (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006).

Flekna et al. (2007) utilizaram EMA para estudo de viabilidade celular com PCR em tempo real e também relataram que este composto não atuou apenas em células danificadas, e que o seu uso poderia diminuir a população de células viáveis em 2 log UFC. Devido à interferência do EMA com a amplificação de células viáveis de alguns gêneros bacterianos, recentemente foram propostos estudos com propídio monoazídico como substituto do EMA. Propídio monoazídico é mais seletivo e não penetra nas células viáveis por ser mais carregado positivamente que o EMA (CAWTHORN; WITTHUHN, 2008; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006).

*Conclusões*

---

---

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode se concluir que:

- O método de semeadura em placa permitiu a enumeração somente de células viáveis de *L. monocytogenes* aderidas em lâminas de aço inoxidável.
- O método de enumeração de bactérias em biofilmes por coloração CTC-DAPI foi mais eficiente para a quantificação de células no estado viáveis mas não cultiváveis, apesar da técnica apresentar algumas limitações.
- A presença de bacteriocinas de *L. sakei* 1 e *L. mensenteroides* 11 causou diminuição na viabilidade de células de *L. monocytogenes* em biofilmes.
- Resultados preliminares em culturas puras de *L. monocytogenes* demonstraram que a técnica de PCR em tempo real tem potencial para aplicação no estudo de biofilmes.
- O brometo de etídio monoazídico (EMA) diminuiu em 1 log UFC a amplificação do DNA de células mortas, mas dependendo da concentração utilizada, este composto pode inibir também a amplificação de células viáveis de *L. monocytogenes*.

## *Referências*

---

---

## REFERÊNCIAS\*

ALVES, V.F.; De MARTINIS, E.C.P.; DESTRO, M.T.; VOGEL, B.F.; GRAM, L.; Antilisterial activity of a *Carnobacterium piscicola* isolated from brazilian smoked fish (Surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from Surubim. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2068-2077, 2005.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 2- Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. **Food Control**, v. 17, p. 462-468, 2006.

BAFFONE, W.; CITTERIO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; CAMPANA, R.; FALZANO, L.; DONELLI, G. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 31-39, 2003.

BALABAN, N.; STOODLEY, P.; FUX, C.A.; WILSON, S.; COSTERTON, J.W.; DELL'ACQUA, G. Prevention of Staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 437, p. 48-54, 2005.

BARBALHO, T.C.F.; ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, v. 16, p. 211-216, 2005.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.; CAPPELIER, M. Evidence of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. **Food Microbiology**, v.17, p. 697-704, 2000.

BERRADA, H.; SORIANO, J.M.; PICO, Y.; MAÑES, J. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 202-206, 2006.

---

\* De acordo com: Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas / Grupo diTeses. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. Vânia M. B. de Oliveira Funaro, coord. Et al. – São Paulo: SIBi/USP, 2004.

BHUPATHIRAJU, V. K.; HERNANDEZ, M., LANDFEAR, D. ALVAREZ-COHEN, L. Application of tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p. 231-243, 1999.

BOLES, B. R.; SINGH, P. K.; Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. **PNAS**, v. 105, p. 12503–12508, 2008.

BOULOS, L.; PRÉVOST, M.; BARBEAU, B.; COALLIER, J.; DESJARDINS, R. LIVE/DEAD. BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p. 77–86, 1999.

BRASIL, 1999, Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999. Acesso 27/10/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: < <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=> >. Acesso em: 19 junho 2005.

BREDHOLT, S.; MAUKONEN, J.; KUJANPÄÄ, K.; ALANKO, T.; OLOFSON, U.; HUSMARK, U.; SJÖBERG, A.M.; WIRTANEM, G. Microbial methods for assessment of cleaning and disinfection of food-processing surfaces cleaned in a low-pressure system. **European Food Research Technology**, v. 209, p. 145-152, 1999.

BRUHN, J.P.; HAAGENSEN, J.A.J.; BAGGE-RAVN, D.; GRAM, L. Culture conditions of *Roseobacter* strain 27-4 affect its attachment and biofilm formation as quantified by real-time PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3011-3015, 2006.

BURGOS, J. S.; RAMÓÑEZ, C.; TENORIO, R.; SASTRE, I.; BULLIDO, M. J. Influence of reagents formulation on real-time PCR parameters. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, p. 257-260, 2002.

BURLINGAME, B.; PINEIRO, M. The essential balance: risks and benefits in food safety and quality. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 139-146, 2007.

BYUN, M. W.; KIM, J. H.; KIM, D. H.; KIM, H. J.; JO, C. Effects of irradiation and sodium hypochlorite on the micro-organisms attached to a commercial food container. **Food Microbiology**, v. 24, p. 544-548, 2007.



CABO, M. L.; HERRERA J.J.; CRESPO, M. D.; PASTORIZA, L. Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. **Food Control**, doi:10.1016/j.foodcont.2008.08.002, 2008.

CAPPELIER, J.M.; BESNARD, V.; ROCHE, S.; GARREC, N.; ZUNDEL, E.; VELGE, P.; FEDERIGHI, M. Avirulence of viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* cells demonstrated by in vitro and in vivo models. **Veterinary Research**, v. 36, p. 589-599, 2005.

CAWTHORN, D. M.; WITTHUHN, R. C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1178–1185, 2008.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Foodnet surveillance report for 1999 (final report). Disponível em: <[http://www.cdc.gov/foodnet/annual/1999/FoodNet\\_1999\\_Annual\\_Report.pdf](http://www.cdc.gov/foodnet/annual/1999/FoodNet_1999_Annual_Report.pdf)>. Acesso em: 09/08/2006.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC) Disponível em: <[http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listing/listeriosis\\_gi.html](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html)>. Acesso em: 22/10/2008.

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.

CHAE, M.S.; SCHRAFT, H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Microbiology**, v. 18, p. 103-112, 2001.

CHAE, M.S., SCHRAFT, H.; HANSEN, L.T.; MACKERETH, R. Effects of physiochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, v. 23, p. 250-259, 2006.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. **LWT**, v. 39, p. 11-19, 2006.

CRÉACH, V.; BAUDOUX, A.-C.; BERTRU, G.; LEROUZIC, B.; Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 19–28, 2003.

DE MARTINIS, E.C.P.; DUVALL, R.E.; HITCHINS, A.D. Real time detection of 16 rRNA genes speeds most-probable-number enumeration of foodborne *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 1650-1655, 2007.

DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus sakei* isolated from "linguica frescal". **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 284-287, 1997.

DESTRO, M. T.; LEITA, M. F. F.; FARBER, J. M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v., p. 705–711, 1996.

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.

DHAR, A. K.; ROUX, M. M.; KLIMPEL, K. R. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR Green chemistry. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2835–2845, 2001.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, p. 173-175, 2003.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J. Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, v. 74, p. 690-696, 2006.

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

EPSETEIN, S.S.; ROSSEL, J. Methodology of *in situ* grazing experiments: evaluation of a new vital dye for preparation of fluorescently labeled bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v.128, p.143-150, 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) **Bacteriological Analytical Manual Online**, Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Chapter 10,

2003. Disponível em: < <http://www.foodsafety.gov/~ebam/bam-10.html>>. Acesso em: 27-10-2008.

FALEIRO, M.L.; ANDREW, P.W.; POWER, D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 207-216, 2003.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 476-511, 1991.

FLASH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com o leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 291-296, 2005.

FLEKNA, G.; STEFANIE, P.; WAGNER, M.; SMULDERS, F.J.M.; MOZINA, S.S.; HEIN, I. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/ real-time PCR. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 405-412, 2007.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, p.46-50, 2004.

FRODER, H.; MARTINS, C.G.; DE SOUZA, K. L. O.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M. T. Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 1277-1280, 2007.

FUSTER-VALLS, N.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; MARÍN-DE-MATEO, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 19, p. 308–314, 2008.

GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R. L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p.125 – 152, 2008.

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

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 851-875, 2005.

GHRAIRI, T.; FRERE, J.; BERJEAUD, J.M.; MANAI, M. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Food Control**, v. 19, p. 162-169, 2008.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 995-1001, 1996.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, p. 503–512, 2002.

GIULIETTI, A.P.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C.; An overview of Real-Time Quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386–401, 2001.

GOTTLIEB, S.L.; NEWBERN, E. C.; GRIFFIN, P. M.; GRAVES, L. M.; HOEKSTRA, R. M.; BAKER, N.L.; HUNTER, S.B.; HOLT, K. G.; RAMSEY, F.; HEAD, M.; LEVINE, P.; JOHNSON, G.; SCHOONMAKER-BOPP, D.; REDDY, D.; KORNSTEIN, L.; GERWEL, M.; NSUBUGA, J.; EDWARDS, L.; STONECIPHER, S.; HURD, S.; AUSTIN, D.; JEFFERSON, M.A.; YOUNG, S. D.; HISE, K.; CHERNAK, E. D.; SOBEL, J.; THE LISTERIOSIS OUTBREAK WORKING GROUP A MULTISTATE OUTBREAK OF LISTERIOSIS Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 29-36, 2006.

GUESCINI, M.; SISTI, D.; ROCCHI, M. B.L.; STOCCHI, L.; STOCCHI, V. A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. **BMC Bioinformatics**, v.9, n. 326, 2008.

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

GUO, N.; YU, L.; MENG, R.; FAN, J.; WANG, D.; SUN, G.; DENG, X. Global gene expression profile of *Saccharomyces cerevisiae* induced by dictamnine. **Yeast**, v. 25, p. 631–641, 2008.

GUY, R.A.; KAPOOR, A.; HOLICKA, J.; SHEPHERD, D.; HORGAN, P.A. A rapid molecular-based assay for direct quantification of viable bacteria in slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1265-1272, 2006.

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

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

HEIN, I.; FLEKNA, G.; KRASSNIG, B. M.; WAGNER, A. M. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: an alternative approach to a conventional PCR system suggested by the food PCR project. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 538–547, 2006.

JAWETZ, N.E.; MELRRICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. 21<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p.155-156.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 265-269, 2003.

JOTHIKUMAR, M.; WANG, X.; MANSEL, W.; GRIFFITHS, M.W. Real-Time multiplex SYBR Green I-based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes* **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 2141–2145, 2003.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B.P.H.J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, v.25, p. 745-761, 2008.

KINDAICHI, T.; KAWANO, Y.; ITO, T.; OKABE, S.; SATOH, H., Microbial population dynamics and kinetics of nitrifying bacteria in an autotrophic nitrifying biofilm determined by real-time quantitative PCR, **Biotechnology And Bioengineering**, v. 94, p. 1111–1121, 2006.

KIM, H.-J.; PARKA, S.-H.; LEE, T.-H.; NAHM, B.-H.; KIM, Y.-R.; KIM, H.-Y. Microarray detection of foodborne pathogens using specific probes prepared by comparative genomics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 238-246, 2008.

KIM, J. S.; LEE, G.G.; KIM, J.; KWON, J.Y.; KWON, S.T. The development of rapid real-time PCR detection system for *Vibrio parahaemolyticus* in raw oyster. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 649-654, 2008.

KISS, R.; TIRCZKAB, T.; SZITAC, G.; BERNÁTHD,S.; CSIKÓC,G. *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary, 2004. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p.71-74, 2006.

KLETER, G. A.; MARVIN, H. J. P. Indicators of emerging hazards and risks to food safety. **Food and Chemical Toxicology**, doi:10.1016/j.fct.2008.07.028, 2008.

KOSOLAPOV, D.B.; KOPYLOV, A.I. Enumeration of active cells in the bacterioplankton of the rybinsk reservoir using 5-cyano-2, 3-ditolyly tetrazolium chloride : a comparison with other methods. **Microbiology**, v. 70, p. 594-599, 2001.

KUDA, T.; YANO, T.; KUDA, M. T. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 988-993, 2008.

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

LAFLAMME, C.; LAVIGNE, S.; HO, J.; DUCHAINE, C. Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 684-692, 2004.

LAMBERTZ, S. T.; NILSSON, C.; HALLANVUO, S.; LINDBLAD, M. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 6060-6067, 2008.

LANGSRUD, S.; SIDHU, M.S.; HEIR, E.; HOLCK, A.L. Bacterial disinfectant resistance-a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, p. 183-290, 2003.

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

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, v. 24, p. 281–287, 2007.

LEE, J.-L.; LEVIN, R.E. Use of bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 456-462, 2006.

LEE, J.-L.; LEVIN, R. E. Discrimination of c-irradiated and non irradiated *Vibrio vulnificus* by using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p. 728–734, 2008.

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

LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1683-1688, 1991.

LIU, D. Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 229–242, 2008.

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

MACÊDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação na indústria farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**, v. 2, p. 19-24, 2000.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 190–212, 2004.

MAFRA, I.; SILVA, S. A.; MOREIRA, E. J. M. O.; SILVA, C. S. F.; BEATRIZ, M.; OLIVEIRA, P.P.; Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. **Food Control**, v.19, p. 1183-1190, 2008.

MAKITO, .I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, A.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 189-196, 2005.

MALORNY, B.; LÖFSTRÖM, C.; WAGNER, M.; KRÄMER, N.; HOORFAR, J. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 1299–1304, 2008.

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.

MAUKONEM, J.; MATTILA-SANDHOLM, T.; WIRTANEM, G. Metabolic indicators for assessing bacterial viability in hygiene sampling using in suspension and swabbed biofilm. **Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie = Food Science and technology**, v. 33, p. 225-233, 2000.

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

McKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Real-Time nucleic acid–based detection methods for pathogenic bacteria in food. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 823–832, 2004.

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

MESA, M.M.; MACÍAS, M. CANTERO, D. BARJA, F. Use of the direct epifluorescence filter technique for enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. **Journal of Fluorescence**, v. 13, p. 261-265, 2003.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 249-253, 2003.



MICHEL, E.; MENGAUD, J.; GALSWORTHY, S.; COSSART, P. Characterization of large motility gene cluster containing the *cheR*, *motAB* genes of *Listeria monocytogenes* and evidence that PrfA downregulates motility genes. **FEMS Microbiology Letters**, v.169, p. 341-347, 1998.

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

MIETTINEN, M.K; BJÖRKROTH, K.J; KORKEALA, H.J.; Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, p.187-92, 1999.

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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política nacional de alimentação e nutrição, 2003 2ª edição revista revisada, Brasília, D/F. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/nutricao/documentos/pnan.pdf>>. Acesso em: 09/08/2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS, 2005. Guia alimentar para a população brasileira, promovendo a alimentação saudável, Brasília – DF; 2005. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/familia/temasdocumentosdetalhe.cfm?id=60&iddoc=166>>. Acesso em 14/11/2008.

MØRETRØ, T.; HERMANSEN, L.; HOLCK, A. L.; SIDHU, M. S.; RUDI, K.; LANGSRUD, S. Biofilm formation and the presence of intercellular adhesion locus *ica* among Staphylococci from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.5648-5655, 2003.

NIEMIRA, B. A. Irradiation sensitivity of planktonic and biofilm-associated *Escherichia coli* O157:H7 isolates is influenced by culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3239–3244, 2007.

NOCKER, A.; CAMPER, A.K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1997-2004, 2006.

NOCKER, A.; CHEUNG, C.-Y.; CAMPER, A.K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiology Methods**, v. 67, p.310-320, 2006.

NOVAIS, C.M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

OKWUMABUA, O.; O'CONNOR, M.; SHULL, E.; STRELOW, K.; HAMACHER, M.; KURZYNSKI, T.; WARSHAUER, D. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from food animal clinical cases: PFGE pattern similarity to strains from human listeriosis cases. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, p. 275-281, 2005.

ORAVCOVÁ, K.; KUČHTA, T.; KACLÍKOVÁ, E. A novel real-time PCR-based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in food. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 568–573, 2007.

PAP, K.; KISKÓ, G. Efficacy of disinfectants against static biofilms on stainless steel surface. **Acta Alimentaria**, v. 37, p. 1–7, 2008.

PARIZZI, S.Q.F.; ANDRADE, N.J.D.; SILVA, C.A.D.S.; SOARES, N.D.F.F.; SILVA, E.A.M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77-83, 2004.

PEANO, C.; SAMSON, M. C.; PALMIERI, L.; GULLI, M.; MARMIROLI, N. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6962-6968, 2004.

PERNI, S.; JORDAN, S.J.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. Biofilm development by *Listeria innocua* in turbulent flow regimes. **Food Control**, v. 17, p. 875-883, 2006.

PETERKIN, P.I.; IDZIAK, E.S.; SHARPE, A.N. Detection of *Listeria monocytogenes* by direct colony hybridization on hydrophobic grid-membrane filters by using a chromogen-labeled DNA probe. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 586-591, 1991.

PISZ, J. M.; LAWRENCE, J. R.; SCHAFER, A. N.; SICILIANO, S. D. Differentiation of genes extracted from non-viable versus viable micro-organisms in environmental

samples using ethidium monoazide bromide. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 312–318, 2007.

RASPOR, P.; JEVSNIK, M. Good nutritional practice from producer to consumer. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 276–292, 2008.

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

REISSBRODF, R. New chromogenic plating media detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp – an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 83-89, 2004.

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

RIGANO, L.A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDÍN, L.; FILLIPONE, P.; TORRES, P.S.; QÜESTA, J.; DOW, J.M.; CASTAGNARO, A.P.; VOJNOV, A.A.; MARANO, M.R. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-microbe interactions**, v. 20, p. 1222-1230, 2007.

RIVAS, L.; DYKES, G.A.; FEGAN, N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. **Journal of Microbiology Methods**, v.69, p. 44-51, 2007.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, v. 7, p. 194-203, 1996.

RODRIGUEZ, G.G.; PHILIPS, D.; ISHIGURO, K.; RIDGWAY, H.F. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1801-1808, 1992.

ROMANOVA, N. A.; GAWANDE, P. V.; BROVKO, L. Y.; GRIFFITHS, M. W. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p.231-237, 2007.

ROMBY, P.; VANDENESCH, F.; WAGNER, E.G.H. The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 229-236, 2006.

ROSSMANITH, P.; KRASSNIG, M.; WAGNER, M; HEIN, I. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. **Research in Microbiology**, v.157, p. 763-771, 2006.

RUDI, K.; NATERSTAD, K.; CROMTORP, S.M.; HOLO, H. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 301-306, 2005.

RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 247-254, 2005.

SAKATE, R. I.; ARAGON, L. C.; RAGHIANTE, F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T.; Occurrence of *Listeria monocytogenes* in pre-sliced vacuum-packaged salami in Sao Paulo – Brazil. **Archivos Latinoamericanos De Nutricion**, v. 53, p. 184-187, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, W. D. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 3<sup>o</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANDASI, M.; LEONARD, C. M.; VILJOEN, A. M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, p. 1070–1075, 2008.

SANDHYA, S.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Molecular beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Escherichia coli* from fresh produce and water. **Analytica Chimica Acta**, v. 614, p. 208-212, 2008.

SCHAIK, W.V.; ABEE, T. The role of  $\sigma^B$  in the stress response of Gram-positive bacteria-targets for food preservation and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 218-224, 2005.

SCHILLACI, D.; MAGGIO, B.; RAFFA, D.; DAIDONE, G.; CASCIOFERRO, S.; CUSIMANO, M. G.; RAIMONDI, M. V. 4-Diazopyrazole derivatives as potential new antibiofilm agents. **Chemotherapy**; v. 54, p. 456–462, 2008.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS) Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004. **Boletim eletrônico epidemiológico**, ano 5, n. 6, 28/12/2005.

SERDELIDIS, D.; ABRAHIM, A. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. **Food Control** v. 20, p. 1-10, 2009.

SERVAIS, P.; AGOGUE, H.; COURTIES, C.; JOUX, F.; LEBARON, P. Are the actively respiring cells (CTC+) those responsible for bacterial production in aquatic environments? **FEMS Microbiology Ecology**, v.35, p. 171-179, 2001.

SEVERIN, E.; STELLMACH, S.; NACHTIGAL, H.M. Fluorimetric assay of redox activity in cells. **Analytica Chimica Acta**, v. 170, p. 341-346, 1985.

SIFRI, C. D. Quorum Sensing: Bacteria Talk Sense. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 1070–1076, 2008.

SIT, C. S.; VEDERAS, J. C. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. **Biochem. Cell Biol.**, v. 86, p. 116-123, 2008.

SHARMA, M.; ANAND, S.K., Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. **Food Control**, v. 13, p. 469-477, 2002.

SKOVGAARD, N. New trends in emerging pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 217–224, 2007.

SLEATOR, R.D.; CLIFFORD, T.; HILL, C. Gut osmolarity: A key environmental cue initiating the gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Medical Hypotheses**, v. 69, p. 1090-1092, 2007.

SPERBER, W.H. Hazard identification: from a quantitative to a qualitative approach. **Food Control**, v. 12, p. 223-228, 2001.

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

SØDERGAARD, M.; DANIELSEN, M. Active bacteria (CTC+) in temperate lakes: temporal and cross-system variations. **Journal of Plankton Research**, v. 23, p. 1195-1206, 2001.

TAKEUCHI, K.; FRANK, J.F. Confocal microscopy and microbial viability detection for food research. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 2088-2102, 2001.

TANABE, S.; HASE, M.; YANO, T.; SATO, M.; FUJIMURA, T.; AKIYAMA, H. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 3131-3135, 2007.

THAM, W.; ERICSSON, H.; LONCAREVIC, S.; UNNERSTAD, H.; DANIELSSON-THAM, M.-L. Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 173-175, 2000.

TIDE, C.; HARKIN, S. R.; GEESEY, G. G.; BREMER, P.J.; SCHOLZ, W. The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. **Journal of Food Engineering**, v. 42, p. 85-96, 1999.

TRACHOO, N. Biofilm and the food industry. **Journal of Science Technology** v. 25, p. 807-815, 2003.

TRIAS, R.; BADOSA, E.; MONTESINOS, E.; BAÑERAS, L. Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p. 91-98, 2008.

ULLRICH, S.; KARRASCH, B.; HOPPE, H.-G.; JESKULKE, K.; MEHRENS, D.M.; Toxic effects on bacterial metabolism of the redox Dye 5-Cyano-2,3-Ditoly tetrazolium chloride. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4587-4593, 1996.

WANG, S.; LEVIN, R.E. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. **Journal of Microbiology Methods**, v. 64, p. 1-8, 2006.

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

WOLFFS, P.; NORLING, B.; RADSTRÖM, P. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. **Journal of Microbiology Methods**, v. 60, p. 315-323, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Foodborne listeriosis. **Bulletin of World Health Organization**, v. 66, p. 421-428, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/haccp/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/haccp/en/index.html)> Acesso em: 25/10/2008.

YANG, M.; CHENG, A.C.; WANG, M. S.; XING, H. Y. Development and application of a one-step real-time Taqman RT-PCR assay for detection of Duck hepatitis virus type1. **Journal of Virological Methods**, v. 153, p. 55-60, 2008.

YOSHIDA, N.; HIRAISHI, A. An improved Redox dye-staining method using 5-cyano-2, 3-ditoyl tetrazolium chloride for detection of metabolically active bacteria in activated sludge. **Microbes and Environments**, v. 19, p. 61-70, 2004.

YU, F.P.; McFETERS, G.A. Physiological responses of bacteria in biofilms disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2462-2466, 1994.

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

ZOTTOLA, E.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry- Should they be a concern? **Food Microbiology**, v. 23, p. 125-148, 1994.

## *Apêndices*

---

---



## Apêndice A

Resultados dos experimentos de enumeração de células aderidas às lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em diferentes condições (presença cloreto de sódio, sacarose e bacteriocinas) pelo método de semeadura em placa e por coloração com cloreto de 5-ciano-2,3-di-(p-tolil) tetrazólio (CTC) e 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) em microscopia de fluorescência.

**Tabela 1** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI (Log UFC/cm<sup>2</sup>)

	Contagem Padrão em Placa	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - CTC	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - DAPI
Experimento 1	5,49	5,10	4,43
Experimento 2	5,30	5,10	4,44
Experimento 3	5,60	5,10	4,57
Média	5,46	5,10	4,48
Desvio Padrão	0,15	0	0,08

**Tabela 2** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + NaCl 5% (Log UFC/cm<sup>2</sup>)

	Contagem Padrão em Placa	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - CTC	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - DAPI
Experimento 1	4,60	4,79	4,54
Experimento 2	4,76	4,87	4,43
Experimento 3	4,60	4,89	4,54
Média	4,65	4,85	4,50
Desvio Padrão	0,09	0,05	0,06

**Tabela 3** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + Sacarose 2% (Log UFC/cm<sup>2</sup>)

	Contagem Padrão em Placa	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - CTC	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - DAPI
Experimento 1	5,39	5,11	4,56
Experimento 2	5,59	5,00	5,50
Experimento 3	5,75	5,17	5,46
Média	5,58	5,09	5,17
Desvio Padrão	0,18	0,09	0,53

**Tabela 4** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + extrato de cultura de *L. sakei* ATCC 15521 bac - (1% v/v) (Log UFC/cm<sup>2</sup>)

	Contagem Padrão em Placa	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - CTC	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - DAPI
Experimento 1	5,38	5,18	4,46
Experimento 2	5,59	5,07	4,56
Experimento 3	5,73	5,11	4,40
Média	5,57	5,12	4,47
Desvio Padrão	0,18	0,06	0,08

**Tabela 5** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + extrato de cultura de *L. sakei* 1 bac + (1% v/v) (Log UFC/cm<sup>2</sup>)

	Contagem Padrão em Placa	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - CTC	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - DAPI
Experimento 1	2,61	4,45	4,11
Experimento 2	1,40	4,49	4,16
Experimento 3	2,54	4,47	4,11
Média	2,18	4,47	4,13
Desvio Padrão	0,68	0,02	0,03

**Tabela 6** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + extrato de cultura de *L. mesenteroides* 13 bac - (1% v/v) (Log UFC/cm<sup>2</sup>)

	Contagem Padrão em Placa	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - CTC	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - CTC
Experimento 1	5,47	5,11	4,55
Experimento 2	5,69	5,11	4,54
Experimento 3	5,69	5,11	4,53
Média	5,66	5,11	4,54
Desvio Padrão	0,13	0	0,01

**Tabela 7** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + extrato de cultura de *L. mesenteroides* 11 bac + (1% v/v) (Log UFC/cm<sup>2</sup>)

	Contagem Padrão em Placa	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - CTC	Contagem Direta por Microscópio de Fluorescência - CTC
Experimento 1	3,32	4,69	4,27
Experimento 2	2,46	4,67	4,27
Experimento 3	2,60	4,67	4,32
Média	2,79	4,68	4,29
Desvio Padrão	0,46	0,01	0,03

## Apêndice B

Contagens de *L. monocytogenes* em 10 campos aleatórios no microscópio de fluorescência quando coradas com CTC-DAPI.

**Tabela 8** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	CTC	DAPI	CTC	DAPI	CTC	DAPI
Campo 1	263	52	233	61	258	81
Campo 2	281	57	241	58	241	72
Campo 3	279	64	239	58	229	69
Campo 4	272	49	234	52	250	77
Campo 5	269	61	245	49	245	73
Campo 6	266	65	249	55	261	56
Campo 7	259	47	231	48	257	61
Campo 8	283	42	234	51	242	79
Campo 9	279	45	240	57	245	76
Campo10	277	39	241	59	262	80
Média	272,8	52,1	238,7	54,8	249	72,4

**Tabela 9** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + NaCl 5%

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	CTC	DAPI	CTC	DAPI	CTC	DAPI
Campo 1	100	73	160	49	140	65
Campo 2	123	66	149	41	143	68
Campo 3	139	59	151	56	149	71
Campo 4	107	68	154	61	149	79
Campo 5	131	79	162	45	157	72
Campo 6	129	75	148	49	151	67
Campo 7	115	58	157	53	148	51
Campo 8	121	51	173	56	163	64
Campo 9	102	63	145	45	158	58
Campo10	109	64	151	59	161	59
Média	117,6	65,6	141,4	51,4	151,9	65,4

**Tabela 10** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + Sacarose 2%

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	CTC	DAPI	CTC	DAPI	CTC	DAPI
Campo 1	241	71	231	51	281	49
Campo 2	256	78	229	59	278	63
Campo 3	249	81	234	55	287	57
Campo 4	239	63	238	61	283	52
Campo 5	251	68	241	67	272	55
Campo 6	246	60	225	58	275	49
Campo 7	241	74	233	71	289	51
Campo 8	254	71	231	68	281	60
Campo 9	238	67	238	53	271	59
Campo10	243	69	221	57	269	65
Média	245,8	70,2	232,1	60	278,6	56

**Tabela 11** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + extrato de cultura de *L. sakei* ATCC 15521 bac - (1% v/v)

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	CTC	DAPI	CTC	DAPI	CTC	DAPI
Campo 1	290	51	220	69	251	57
Campo 2	281	63	231	74	264	41
Campo 3	285	67	219	79	259	49
Campo 4	279	71	224	61	261	46
Campo 5	284	49	234	64	249	53
Campo 6	271	31	226	57	251	58
Campo 7	278	51	219	71	258	56
Campo 8	284	63	234	78	259	60
Campo 9	291	57	229	63	247	48
Campo10	273	51	223	75	241	44
Média	281,6	55,4	225,9	69,1	254	51,2

**Tabela 12** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + extrato de cultura de *L. sakei* 1 bac + (1% v/v)

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	CTC	DAPI	CTC	DAPI	CTC	DAPI
Campo 1	70	21	53	25	67	19
Campo 2	51	19	58	32	61	20
Campo 3	45	27	64	29	44	26
Campo 4	39	19	71	21	58	29
Campo 5	59	26	51	23	47	31
Campo 6	63	21	69	25	65	30
Campo 7	56	29	57	33	67	35
Campo 8	52	31	49	19	45	26
Campo 9	63	22	61	27	63	22
Campo10	46	27	54	31	52	17
Média	54,4	24,2	58,7	26,5	56,9	25,5

**Tabela 13** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + extrato de cultura de *L. mesenteroides* 13 bac - (1% v/v)

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	CTC	DAPI	CTC	DAPI	CTC	DAPI
Campo 1	231	69	221	81	246	52
Campo 2	245	74	234	75	249	58
Campo 3	251	57	261	71	251	64
Campo 4	234	68	263	67	263	67
Campo 5	238	77	254	59	239	49
Campo 6	236	81	231	57	235	72
Campo 7	243	54	244	74	247	76
Campo 8	249	59	249	52	254	82
Campo 9	246	67	251	64	249	54
Campo10	251	70	254	68	240	63
Média	242,4	67,6	246,2	66,8	247,3	63,7

**Tabela 14** - Contagem das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas a lâminas de aço inoxidável quando cultivadas em caldo BHI + extrato de cultura de *L. mesenteroides* 11 bac + (1% v/v)

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	CTC	DAPI	CTC	DAPI	CTC	DAPI
Campo 1	231	69	221	81	246	52
Campo 2	245	74	234	75	249	58
Campo 3	251	57	261	71	251	64
Campo 4	234	68	263	67	263	67
Campo 5	238	77	254	59	239	49
Campo 6	236	81	231	57	235	72
Campo 7	243	54	244	74	247	76
Campo 8	249	59	249	52	254	82
Campo 9	246	67	251	64	249	54
Campo10	251	70	254	68	240	63
Média	242,4	67,6	246,2	66,8	247,3	63,7

## Apêndice C

Análise estatística entre os métodos de contagem padrão em placa e contagem por coloração fluorescente CTC-DAPI em microscopia de fluorescência para enumeração de células viáveis de *L. monocytogenes* aderidas a lâminas de aço inoxidável.

**Tabela 15** - Resultado do t-teste para análise estatística entre os dois métodos de contagem de células viáveis de *L. monocytogenes* em biofilmes, considerando diferença estatística quando  $p < 0,05$ .

Condições Aplicadas	Valor de p
BHI	0,014
NaCl 5%	0,033
Sacarose 2%	0,014
Bac – ( <i>L. sakei</i> ATCC15521)	0,014
Bac+ ( <i>L. sakei</i> 1)	0,004
Bac – ( <i>L. mesenteroides</i> 13)	0,002
Bac+ ( <i>L. mesenteroides</i> 11)	0,002