

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**MODELAGEM DA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM
MONOCULTURA DE *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* E *Salmonella*
enterica SUBSP. *enterica* E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO EM COCULTURA
COM *Enterococcus faecalis***

ROBERTA BARBOSA TEODORO ALVES

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2018

ROBERTA BARBOSA TEODORO ALVES

**MODELAGEM DA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM
MONOCULTURA DE *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* E *Salmonella*
enterica SUBSP. *enterica* E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO EM COCULTURA
COM *Enterococcus faecalis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A474m
2018

Alves, Roberta Barbosa Teodoro, 1984-
Modelagem da adesão e formação de biofilme em
monocultura de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e
Salmonella enterica subsp. *enterica* e avaliação da interação em
cocultura com *Enterococcus faecalis* / Roberta Barbosa Teodoro
Alves. – Viçosa, MG, 2018.

1 tese eletrônica (ix, 96 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Pena.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 67-79.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.102>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Microbiologia. 2. Modelos matemáticos. 3. Biofilmes.
4. Interações microbianas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

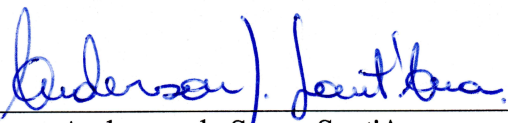
CDD 22. ed. 664.001579

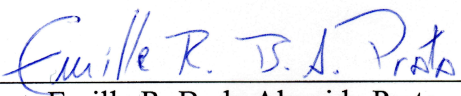
ROBERTA BARBOSA TEODORO ALVES


**MODELAGEM DA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM
MONOCULTURA DE *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* E *Salmonella*
enterica SUBSP. *enterica* E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO EM CO CULTURA
COM *Enterococcus faecalis***

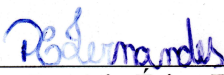
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

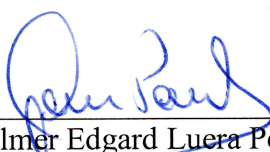
APROVADA: 24 de maio de 2018.


Anderson de Souza Sant'Ana


Emille R. B. de Almeida Prata


Nélio José de Andrade
(Coorientador)


Patrícia Érica Fernandes
(Coorientadora)


Wilmer Edgard Luera Peña
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade.

À Coordenação Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Professores Wilmer Edgar, Nélio José de Andrade e Patrícia Érica Fernandes pela orientação, paciência e ensinamentos.

À minha mãe pelo cuidado e carinho e por acreditarem na concretização deste trabalho. Ao meu pai, avós e demais familiares que torceram para a conclusão do curso.

À minha irmã Laís e meu cunhado Vinícius.

Aos meus colegas de Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos, Jaqueline, Adeline, Mirian, Alexandre e Paulo César, em especial Daiene, Carmelita pela grande ajuda e amizade.

Ao Departamento de Microbiologia e Aline Duarte Batista do Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Agradeço a ajuda na realização deste trabalho e anseio retribuir a todos.

BIOGRAFIA

ROBERTA BARBOSA TEODORO ALVES, filha de Fernando Antônio Teodoro Alves e Suely Rodrigues Barbosa Teodoro Alves, nasceu em Ipanema, Minas Gerais, em 22 de abril de 1984.

Em fevereiro de 2003, iniciou o curso de Farmácia na Universidade Vale do Rio Doce, tornando-se Farmacêutica Generalista em dezembro de 2006.

Em agosto de 2009, concluiu o curso de Pós-Graduação *Lato Sensu*, especialização em Farmácia Magistral Alopática pelo Centro Universitário Newton Paiva.

Atuou como Farmacêutica Magistral de 2007 até setembro de 2010. Também atuou como consultora na indústria de cosméticos.

Em agosto de 2011, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concentrado seus estudos na linha de Biotecnologia e Microbiologia de Alimentos, submetendo-se à defesa da dissertação em 13 de dezembro de 2013.

Em março de 2014, iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, dedicando-se seus estudos na mesma área. Submeteu-se à defesa de tese em 24 de maio de 2018.

RESUMO

ALVES, Roberta Barbosa Teodoro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2018. **Modelagem da adesão e formação de biofilme em monocultura de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e avaliação da interação em cocultura com *Enterococcus faecalis*.** Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña. Coorientadores: Nélio José de Andrade e Patrícia Érica Fernandes.

A adesão e formação de biofilmes por bactérias patogênicas e deteriorantes são indesejáveis na indústria de alimentos devido aos problemas de contaminação e a difícil remoção no processo de higienização. Desta forma, é importante quantificar e minimizar o risco de adesão e fatores que o afeta, uma ferramenta para isso é utilizar a microbiologia preditiva, que permite prever as influências das condições ambientais no comportamento microbiano. Além disso, os biofilmes são formados por várias espécies bacterianas, e possíveis interações entre as espécies podem ocorrer, por exemplo, as interações sinérgicas podem tornar os membros desta comunidade mais tolerantes e resistentes aos sanitizantes, já nas interações competitivas ou antagônicas pode ocorrer a presença de micro-organismos inibidores de outros indivíduos nos biofilmes. Nesse contexto, a primeira parte do trabalho aborda o desenvolvimento de modelos matemáticos preditivos de adesão e formação de biofilmes das bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e *E. faecalis*, em função dos efeitos do pH e temperatura. Utilizou-se microplacas de poliestireno com 96 poços contendo caldo *Brain Heart Infusion* em pH ajustado para a adesão e formação de biofilmes, os ensaios foram conduzidos em diferentes combinações de pH (4, 5, 6, 7, 8, e 9) e temperatura (5 °C, 15°C, 25 °C, 25 °C e 45 °C). Com os dados experimentais, modelos de probabilidade de regressão logística foram construídos para cada bactéria, os modelos apresentaram bom ajuste com poder preditivo adequado e, verificou-se que com o aumento da temperatura o risco de o evento acontecer é maior. Na segunda parte do estudo os objetivos foram verificar as interações sinérgicas em cocultura entre as bactérias e avaliar a capacidade antagônica de *E. faecalis* em competir, excluir ou deslocar os patógenos durante a formação dos biofilmes em diferentes temperaturas e correlacionar essa inibição com as propriedades de autoagregação e coagregação. Finalmente, determinar a cinética de inativação dos micro-organismos patogênicos presentes nos biofilmes em monocultura e em cocultura com *E. faecalis* sob ação do sanitizantes dicloroisocianurato de sódio e cloreto de benzalcônio e avaliar se houve aumento da resistência para inativação dos biofilmes quando cultivados em cocultura. Poucas

ocorrências de efeitos sinérgicos foram encontradas na formação de biofilmes entre os isolados, em 144 combinações houve somente quatro efeitos sinérgicos que foram: *S. enterica* e *L. monocytogenes* nas temperaturas de 15 °C em pH 8 e 9, a 25 °C em pH 8 e também *E. coli* e *E. faecalis* na temperatura de 35 °C e pH 8. *E. faecalis* teve pouca capacidade em inibir a formação de biofilmes dos patógenos, promovendo baixas reduções decimais (≤ 1 ciclos log) pelos três mecanismos investigados: competição, exclusão ou deslocamento. A capacidade de coagregação de *E. faecalis* com os patógenos também foi baixa e, esta baixa porcentagem de coagregação ($< 20\%$) pode indicar porque houve pouca capacidade de inibir ou diminuir a adesão desses patógenos pelos mecanismos de inibição de biofilmes testados. As cinéticas de inativação dos biofilmes dos patógenos em monocultura ou cocultura com *E. faecalis* sob ação dos sanitizantes teve um bom ajuste ao modelo bifásico de Cerf, e permitiu informações detalhadas sobre as taxas de inativação correspondentes às subpopulações sensíveis e resistentes e com base nas análises dos parâmetros cinéticos f , k_{max1} , k_{max2} , e valores D, além do tempo de redução de 4 ciclos log ficou claro que não houve aumento da resistência do composto clorado na inativação de todos os patógenos nos biofilmes em cocultura. Nos biofilmes de *Salmonella* e *E. coli* em cocultura com *E. faecalis* também não apresentaram resistência ao cloreto de benzalcônio, entretanto, *Listeria* em biofilmes de cocultura com *E. faecalis*, demonstrou pelos parâmetros cinéticos que ocorreu um aumento da resistência ao cloreto de benzalcônio. As imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas para o biofilme em monocultura e cocultura mostraram que não houve diferença visual na arquitetura dos biofilmes para as espécies estudadas.

ABSTRACT

ALVES, Roberta Barbosa Teodoro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2018. **Modeling of adhesion and biofilm formation in monoculture of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* and evaluation of the interaction in co-culture with *Enterococcus faecalis*.** Adviser: Wilmer Edgard Luera Peña. Co-Advisers: Nélio José de Andrade and Patrícia Érica Fernandes.

Adhesion and formation of biofilms by pathogenic and spoilage bacteria are undesirable in the food industry due to food contamination problems and difficult removal in the sanitation process. Thus, it is important to quantify and minimize the risk of adhesion and factors that affect it, a tool for this is to use predictive microbiology, which allows predicting the influence of environmental conditions on microbial behavior. In addition, biofilms are formed by several bacterial species, and possible interactions between species can occur, for example, synergistic interactions can make members of this community more tolerant and resistant to sanitizers, whereas in competitive or antagonistic interactions the presence may occur of inhibiting microorganisms from other individuals in biofilms. In this context, the first part of the work addresses the development of predictive mathematical models of adhesion and biofilm formation of the bacteria *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *E. faecalis*, as a function of the effects of pH and temperature. Polystyrene microplates with 96 wells containing Brain Heart Infusion broth at pH adjusted for adhesion and biofilm formation were used, the assays were conducted in different combinations of pH (4, 5, 6, 7, 8, and 9) and temperature (5 °C, 15 °C, 25 °C, 25 °C and 45 °C). With the experimental data, logistic regression probability models were built for each bacterium, the models showed a good fit with adequate predictive power, and it was found that with increasing temperature the risk of the event happening is greater. In the second part of the study, the objectives were to verify the synergistic interactions in coculture between bacteria and to evaluate the antagonistic capacity of *E. faecalis* to compete, exclude or displace pathogens during the formation of biofilms at different temperatures and to correlate this inhibition with the properties of self-aggregation and co-aggregation. Finally, to determine the inactivation kinetics of pathogenic microorganisms present in biofilms in monoculture and in coculture with *E. faecalis* under the action of sanitizers sodium dichloroisocyanurate and benzalkonium chloride and to evaluate if there was an increase in resistance to inactivation of biofilms when cultivated in co-culture. Few occurrences of synergistic effects were found in the

formation of biofilms among the isolates, in 144 combinations there were only 4 synergistic effects which were: *S. enterica* and *L. monocytogenes* at temperatures from 15 °C at pH 8 and 9, to 25 °C at pH 8 and also *E. coli* and *E. faecalis* at a temperature of 35 °C and pH 8. *E. faecalis* had little capacity to inhibit the formation of pathogen biofilms, promoting low decimal reductions (≤ 1 log cycles) by the three mechanisms investigated: competition, exclusion or displacement. The coaggregation capacity of *E. faecalis* with pathogens was also low, and this low percentage of coaggregation ($< 20\%$) may indicate why there was little capacity to inhibit or decrease the adhesion of these pathogens by the biofilm inhibition mechanisms tested. The biofilm inactivation kinetics of pathogens in monoculture or coculture with *E. faecalis* under the action of sanitizers had a good fit to the Cerf biphasic model, and allowed detailed information on the inactivation rates corresponding to sensitive and resistant subpopulations and based on the analysis from the kinetic parameters f , k_{max1} , k_{max2} , and D values, in addition to the reduction time of 4 log cycles, it was clear that there was no increase in the resistance of the chlorinated compound to the inactivation of all pathogens in biofilms in coculture. In biofilms of *Salmonella* and *E. coli* co-cultured with *E. faecalis* also did not show resistance to benzalkonium chloride, however, *Listeria* in biofilms co-cultured with *E. faecalis*, demonstrated by the kinetic parameters that there was an increase in resistance to benzalkonium chloride. Scanning electron microscopy images obtained for biofilm in monoculture and coculture showed that there was no visual difference in the architecture of the biofilms for the studied species.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
Efeito do pH e temperatura na modelagem da adesão e formação de biofilme em monocultura de <i>Escherichia coli</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	3
1. Introdução	3
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Microbiologia preditiva.....	4
2.2. Biofilmes por patógenos de origem alimentar	5
3. Materiais e métodos	6
3.1. Estirpes bacterianas	7
3.2. Adesão e formação de biofilmes em superfície	7
3.3. Desenvolvimento dos modelos na adesão e formação de biofilmes	8
3.3.1. Modelo de parâmetro cardinal de Rosso	9
3.3.2. Modelagem probabilística de regressão logística.....	10
3.3.3. Análises experimentais do desempenho dos modelos preditivos.....	11
4. Resultados e Discussão	12
4.1. Modelo de parâmetro cardinal de Rosso	12
4.2. Modelagem probabilística de regressão logística	13
5. Conclusão.....	24
CAPÍTULO 2	25
Interações sinérgicas e antagônicas em biofilmes cocultura de <i>Escherichia coli</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> com <i>Enterococcus faecalis</i>.....	25
1. Introdução	25
2. Revisão Bibliográfica	26
2.1. Biofilmes e as interações entre multiespécies.....	26
2.2. <i>Enterococcus</i> sp. como biocontrole	28
2.3. Resistência dos biofilmes a sanitizantes	29
3. Materiais e Métodos.....	29
3.1. Estirpes bacterianas	29

3.2. Formação de biofilmes em cocultura e verificação da interação sinérgica entre diferentes espécies.....	30
3.3. Controle da formação dos biofilmes patogênicos por interações antagônicas de <i>Enterococcus faecalis</i>	31
3.3.1. Competição.....	32
3.3.2. Exclusão competitiva	32
3.3.3. Deslocamento	32
3.3.4. Remoção e quantificação das células nos biofilmes	33
3.4. Ensaio de autoagregação e coagregação.....	33
3.5. Cinética de inativação dos biofilmes patogênicos em monoculturas e em cocultura com <i>Enterococcus faecalis</i>	35
3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes em monocultura de <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> e cocultura com <i>Enterococcus faecalis</i>	36
4. Resultados e Discussão	37
4.1. Formação de biofilmes em cocultura e verificação da interação sinérgica entre diferentes espécies.....	37
4.2. Controle da formação dos biofilmes patogênicos por interações antagônicas de <i>Enterococcus faecalis</i>	38
4.2.1. Competição.....	38
4.2.2. Exclusão Competitiva.....	41
4.2.3. Deslocamento	43
4.3. Ensaio de autoagregação e coagregação.....	45
4.4. Cinética de inativação dos biofilmes patogênicos em monocultura e em cocultura com <i>Enterococcus faecalis</i>	49
4.4.1. <i>Escherichia coli</i>	51
4.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	54
4.4.3. <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	58
4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes em monocultura de <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	62
5. Conclusão.....	64
CONCLUSÕES GERAIS.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	80

INTRODUÇÃO GERAL

Modelos matemáticos preditivos podem ser usados como ferramentas adequadas para quantificar o comportamento bacteriano na segurança de alimentos. Porém, os modelos disponíveis são, na maior parte das vezes, baseados no crescimento ou na inativação de micro-organismos na forma planctônica e poucos trabalhos abordam a modelagem da formação ou inativação de biofilmes.

A adesão e formação de biofilmes por bactérias patogênicas e deteriorantes é indesejável em superfícies que entram em contato com alimentos, uma vez que, podem levar a uma contaminação dos produtos alimentares, podendo ocasionar doenças associadas ao consumo de alimentos. Além disso, as células sésseis presentes nos biofilmes são mais resistentes aos sanitizantes em comparação às células planctônicas, desta forma, os sanitizantes muitas vezes não conseguem erradicar as células do biofilme. Esta alta resistência pode ser potencializada em biofilmes de espécies mistas, dificultando o processo de higienização e aumentando o risco de falhas na sanitização, levando a graves problemas de saúde e perdas econômicas.

Devido à importância que os biofilmes têm como fenômeno microbiano, a maioria das investigações concentra-se em estudos com uma única espécie, porém os biofilmes são compostos por várias espécies bacterianas e relativamente pouco se sabe sobre as interações que ocorrem. Portanto, enfatiza-se a importância de compreender as interações sinérgicas e antagônicas das espécies ocorrentes na indústria de alimentos, a fim de entender a adesão microbiana e auxiliar na escolha de estratégias de higienização mais eficazes.

O trabalho proposto abrange aspectos importantes para a microbiologia de alimentos, pois estudos sobre a modelagem da adesão e formação de biofilmes e cinéticas de inativação de micro-organismos presentes em biofilmes em cocultura são escassos. Além disso, os efeitos dessas interações em biofilmes ainda são limitados na literatura e pouco explorados.

Considerando esses aspectos, os objetivos deste trabalho foram:

1. Ajustar modelos matemáticos preditivos para a descrição dos efeitos do pH e temperatura sobre a capacidade da adesão e formação de biofilmes das bactérias *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* subsp. *enterica* e *E. faecalis*.
2. Verificar as interações sinérgicas entre as bactérias *E. coli*, *L. monocytogene*, *S. enterica* subsp. *enterica* e *E. faecalis* em diferentes combinações em cocultura.
3. Avaliar a capacidade antagônica de *E. faecalis* em controlar a formação de biofilmes de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. enterica* subsp. *enterica* pelos

mecanismos de competição, exclusão ou deslocamento em diferentes temperaturas.

4. Avaliar as propriedades de autoagregação e coagregação das bactérias selecionadas.
5. Determinar os parâmetros cinéticos de inativação dos micro-organismos patogênicos presentes nos biofilmes em monocultura e em cocultura com *E. faecalis* sob ação do sanitizante dicloroisocianurato de sódio e cloreto de benzalcônio. Em adição, avaliar se houve aumento da resistência para inativação dos biofilmes quando cultivados em cocultura.
6. Avaliar por microscopia eletrônica de varredura os biofilmes formados em cupons de poliestireno com as bactérias patogênicas em monocultura e cocultura com *E. faecalis*.

CAPÍTULO 1

Efeito do pH e temperatura na modelagem da adesão e formação de biofilme em monocultura de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e *Enterococcus faecalis*

1. Introdução

Nos ambientes de processamento de alimentos, diferentes bactérias podem aderir às superfícies, sobreviver, crescer e formar biofilmes. Esses são definidos como uma comunidade de micro-organismos formada por células sésseis que estão incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), incluindo, polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (ELHARIRY, 2011; FLEMMING; WINGENDER, 2010; JAHID; HA, 2014; KUMAR et al., 2017; LOURENÇO, MACHADO, BRITO, 2011; MAKOVCOVA et al., 2017).

Vários fatores podem influenciar a adesão de micro-organismos às superfícies, tais como: espécies microbianas, temperatura, pH, presença de sais e nutrientes (MAFU et al., 2011). Condições ambientais, como, por exemplo, temperatura e pH, desempenham um papel importante na mudança fenotípica de células planctônicas para a forma sésbil (LEE, KANG, 2016). Estruturas da superfície bacteriana, tais como, flagelos, fimbrias, pili, curli e lipopolissacarídeos são afetadas por estes fatores ambientais, e podem resultar em uma modificação das propriedades físico-químicas das superfícies celulares, afetando a adesão e a formação do biofilme (GARRETT, BHAKOO, ZHANG, 2008; VAN HOUTT; MICHIELS, 2010; NGUYEN, YANG, YUK, 2014).

Nos biofilmes, devido às substâncias que compõem a matriz, as células estão protegidas contra estresses ambientais como forças de cisalhamento, dessecação, pH ácidos, pressão osmótica, temperaturas elevadas, radiação ultravioleta e sanitizantes (DI BONAVENTURA et al., 2008; AL-SHABIB et al., 2017; KIM et al., 2018). Portanto, devido às alterações fisiológicas e modificação da forma planctônicas para sésbil, os micro-organismos nos biofilmes têm a capacidade em resistir e persistir em uma variedade de fatores ambientais (COLAGIORGI et al., 2017).

A formação de biofilmes constitui uma preocupação para a indústria de alimentos, pois esses são uma importante fonte de contaminação de micro-organismos deteriorantes e patógenos (AL-SHABIB et al., 2017; COUGHLAN et al., 2016; GIAOURIS et al.,

2013; GIAOURIS, CHORIANOPOULOS, NYCHAS, 2005; STEPANOVIĆ et al., 2003).

Dentre as bactérias patogênicas, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*, são comumente envolvidos em surtos de doenças veiculadas por alimentos, e todas são conhecidas por serem capazes de formar biofilmes em superfícies de processamento de alimentos e interagir com outras espécies nos biofilmes (BLANA, GEORGOMANOU, KOCOT, OLSZEWSKA, 2017; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, CABO, 2017; GIAOURIS et al., 2015). Desta forma, os biofilmes são importantes do ponto de vista da segurança de alimentos (LI et al., 2018), uma vez que sua formação pode acarretar risco à saúde do consumidor e prejuízo financeiro à indústria em alimentos.

Uma melhor compreensão dos fatores que influenciam a adesão e a formação dos biofilmes pode ser útil na melhoria de modelos preditivos e, também fornecer informações para avaliações de risco (AL-ZEYARA; JARVIS; MACKEY, 2011; DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLU; LIANOU, KOUTSOUMANIS, 2016). Desta forma, o objetivo deste estudo foi prever a adesão e formação de biofilme bactérias, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. enterica* subsp. *enterica* e *E. faecalis* utilizando modelos matemáticos preditivos, em diferentes condições de temperatura e valores de pH.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva pode ser utilizada como uma ferramenta para avaliar e gerir os riscos na indústria de alimentos e tornou-se um campo importante na pesquisa em segurança dos alimentos, sendo no desenvolvimento de novos produtos ou em todo o processo industrial (FORSYTHE, 2013). Os modelos matemáticos construídos são derivados de estudos quantitativos sob condições experimentais, que geram curvas de multiplicação e inativação microbiana ou probabilidade de ocorrência e permitem estimar ou prever o efeito das condições ambientais sobre o comportamento microbiano (OLIVEIRA et al., 2013). Existem vários modelos matemáticos disponíveis para aplicação, em exemplo, os modelos empíricos de probabilidade são usados para prever a ocorrência de um dado evento, indicam apenas a probabilidade e não a velocidade com que ocorrem (FAKRUDDIN et al., 2011). Os modelos de regressão logística são utilizados nas avaliações de risco, com o modelo de Ratkowsky e Ross (1995) que o propuseram para fornecer informações de crescimento/ausência de crescimento para

diversas condições, incluindo temperatura e pH. Também o modelo cardinal de Rosso et al (1995) podem ser aplicados para determinar as condições limitantes e ótimas de crescimento, bem como a probabilidade de crescimento em certas combinações de fatores ambientais (GRECO; POSE; PARDO, 2020). Este tipo de modelagem também pode ser aplicado na estimativa do risco de adesão e formação de biofilmes por patógenos e outros micro-organismos de interesse.

2.2. Biofilmes por patógenos de origem alimentar

Em decorrência dos avanços e aprimoramentos nos estudos sobre os biofilmes, torna-se difícil estabelecer uma definição estrita sobre estas estruturas. A cada nova pesquisa e descoberta, novos aspectos relevantes acrescentam conhecimentos e questionamentos a respeito dessa comunidade de células. Entretanto, pelo que já foi disposto e consolidado até o presente momento, pode-se dizer que biofilmes formados na natureza consistem em um agregado de células de várias espécies microbiana, incluindo bactérias, fungos, algas e protozoários. Estas células são provenientes de células planctônicas que aderem irreversivelmente sobre uma superfície biótica ou abiótica. Além disso, aderem-se umas às outras e produzem substâncias poliméricas extracelulares (EPS's) formando estruturas tridimensionais complexas (ELHARIRY, 2011; JAHID et al., 2014; LOURENÇO et al., 2011).

Vários fatores podem influenciar a adesão de micro-organismos às superfícies, como as características do micro-organismo (genes, espécie); da superfície (rugosidade e hidrofobicidade) e do meio que envolve o micro-organismo (fatores como pH, temperatura, atividade de água, concentração de íons). Isto indica que a bactéria é capaz de alterar as características da superfície celular, como a hidrofobicidade, em função das mudanças no ambiente externo (ANDRADE, 2008).

Salmonella enterica, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são importantes bactérias patogênicas comumente envolvidas em surtos de doenças veiculadas por alimentos, e todas são conhecidas por serem capazes de formar biofilmes em ambas as superfícies bióticas e abióticas (GIAOURIS et al., 2015). Nestes surtos, os micro-organismos mais frequentemente isolados foram Estafilococos coagulase positivo (33,2%), *E. coli* (29,3%), enterotoxinas estafilocócicas (12,5%) e *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp com percentuais iguais (8,2%) (FAÚLA; SOARES; DIAS, 2015). Porém, segundos dados da Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, no

período de 2000 a 2014 no Brasil, *Salmonella* spp foi o patógeno mais isolado (38,2%), seguido de *S. aureus* (19,5%) e *E. coli* (13,3%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Desta forma, os biofilmes são importantes do ponto de vista da segurança dos alimentos, pois sua formação pode acarretar risco à saúde do consumidor e prejuízo financeiro à indústria em alimentos. A aplicação regular de procedimentos de limpeza e desinfecção é uma estratégia comum utilizada para evitar a adesão e formação de biofilmes de micro-organismos patogênicos e deterioradores na indústria de alimentos (JAHID, HA, 2014). No entanto, tais procedimentos podem não ser totalmente eficazes sobre estruturas de biofilmes e, assim, induzir a seleção de fenótipos resistentes (SIMÕES et al., 2010).

A persistência de *Salmonella* spp na cadeia alimentar é um importante problema de saúde, pois sua capacidade em formar biofilmes nos ambientes de processamento de alimentos serve como um reservatório e pode ocasionar um risco potencial na contaminação de produtos alimentares (GIAOURIS et al., 2015).

L. monocytogenes é um importante patógeno que pode ser encontrado em diferentes alimentos e, esta bactéria é uma das principais preocupações na indústria de alimentos, uma vez que pode sobreviver e multiplicar nas condições ambientais que existem na produção, processamento e armazenamento de produtos alimentares. As interações com a microbiota das plantas de processamento de alimentos podem incluir bactérias com o potencial de aumentar ou diminuir a colonização e formação de biofilme por *L. monocytogenes* (FOX et al., 2014).

E. coli também é capaz de interagir com outros micro-organismos e formar biofilmes multiespécies nas superfícies de processamento de alimentos, incluindo tanto bactérias gram-negativas, como *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. e gram-positivas como *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. (PÉREZ IBARRECHE, CASTELLANO, VIGNOLO, 2014). *Enterococcus* spp. são bactérias do ácido lático (BAL), ubiqüitárias gram-positivas, catalase-negativa e podem sobreviver em condições adversas em vários tipos de alimentos e deteriorar os mesmos.

3. Materiais e métodos

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA), do Departamento de Tecnologia de Alimentos, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia e no Núcleo de Microscopia e Microanálise, da Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa – MG.

3.1. Estirpes bacterianas

As estirpes utilizadas fazem parte do banco de culturas do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos e foram isoladas de fontes alimentares e identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S/DNA (Tabela 1).

Tabela 1 – Estirpes estudadas

Espécie	Fonte do isolado	Referência
<i>Escherichia coli</i>	Alface	ANTUNES, 2009
<i>Listeria monocytogenes</i> sorovar 1/2b (UFV_02)	Melão	SOUZA, 2014
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	Alface	SILVA, 2013
<i>Enterococcus faecalis</i>	Leite	PERIN, NERO, 2014

Antes de cada experimento, as estirpes mantidas em microtubos de 1,0 mL contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol na proporção 80:20 à temperatura de -18 °C foram ativadas por duas repicagens consecutivas em BHI a 37 °C por 24 h. A absorbância foi ajustada para 0,100 a 625 nm utilizando espectrofotômetro (Kazuaki IL-227), o que corresponde ao padrão McFarland 0,5, que contém, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹. A partir desta solução padronizada realizou-se diluições seriadas até uma concentração de, aproximadamente, $1,0 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹.

3.2. Adesão e formação de biofilmes em superfície

Para a adesão e formação dos biofilmes foram utilizadas placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços. Alíquotas de 1,0 µL em uma concentração de, aproximadamente, $1,0 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹ de cada estirpe em suspensão bacteriana foram inoculadas nos poços contendo 200 µL de caldo BHI com pH ajustado. O pH do BHI (valor inicial de $7,1 \pm 0,2$) foi ajustado para valores acima ou abaixo com HCL ou KOH e medido em pHmetro digital antes e após a autoclavagem para garantir o valor desejado fosse atingido. As placas foram incubadas estaticamente durante 48 h em diferentes temperaturas e pH.

O delineamento do tipo fatorial completo foi utilizado, com 6 níveis de pH (4, 5, 6, 7, 8 e 9) e 5 níveis de temperaturas diferentes (5 °C, 15 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C) em delineamento inteiramente casualizado (Tabela 2).

Tabela 2 – Delineamento de tratamentos aplicados para avaliação da formação de biofilmes sob efeitos do pH e temperatura.

Tratamento	T °C	pH	Tratamento	T °C	pH
1	5	4	16	5	7
2	15	4	17	15	7
3	25	4	18	25	7
4	35	4	19	35	7
5	45	4	20	45	7
6	5	5	21	5	8
7	15	5	22	15	8
8	25	5	23	25	8
9	35	5	24	35	8
10	45	5	23	45	8
11	5	6	24	5	9
12	15	6	25	15	9
13	25	6	26	25	9
14	35	6	27	35	9
15	45	6	28	45	9

Após o tempo de incubação (48 h), as densidades ópticas (DO) foram lidas a 600 nm. Em seguida, o meio de cultura de cada poço foi removido e os poços foram lavados uma vez com tampão fosfato de sódio (PBS) 0,05 mol L⁻¹, pH 6,8 a 7,2 para remover as células planctônicas. Os poços com os biofilmes foram corados com 200 µL de uma solução a 0,1 % (p/v) de cristal violeta (CV) durante 30 min à temperatura ambiente. As placas foram lavadas duas vezes com água destilada esterilizada para remover o excesso de corante, e após isto foram secas em temperatura de 25 °C. O cristal violeta aderido ao biofilme formado na placa foi solubilizado com 200 µL de etanol. A densidade óptica (DO) da solução obtida foi medida a 590 nm usando leitor de placas de microtitulação (*Thermo Scientific*). O controle negativo (DOc), contendo apenas caldo BHI, foi realizado da mesma maneira e o experimento foi conduzido em triplicata em 4 repetições para cada estirpe e combinação do delineamento. O valor de ΔDO foi obtido pela diferença entre as medidas de densidade e o controle negativo.

3.3. Desenvolvimento dos modelos na adesão e formação de biofilmes

3.3.1. Modelo de parâmetro cardinal de Rosso

A fim de descrever os efeitos individuais do pH e da temperatura sobre a adesão e formação de biofilme, os valores de ΔDO obtidos nas várias condições de pH (4, 5, 6, 7, 8 e 9) e temperatura (5 °C, 15 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C), foram utilizados os modelos de parâmetro cardinal de Rosso (ROSSO et al., 1995; DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLU, LIANOU, KOUTSOUMANIS, 2016) para pH (Equações 1 e 2) e temperatura (Equações 3 e 4).

$$\Delta DO = \Delta DO_{otm} \cdot \rho(\text{pH}) \quad (1)$$

$$\rho(\text{pH}) = \begin{cases} 0, & \text{pH} \leq \text{pH}_{\min} \\ \frac{(\text{pH} - \text{pH}_{\max}) \cdot (\text{pH} - \text{pH}_{\min})}{(\text{pH}_{otm} - \text{pH}_{\min}) \cdot (\text{pH} - \text{pH}_{otm}) - (\text{pH}_{otm} - \text{pH}_{\max}) \cdot (\text{pH}_{\min} - \text{pH})}, & \text{pH}_{\min} < \text{pH} < \text{pH}_{\max} \\ 0, & \text{pH} \geq \text{pH}_{\max} \end{cases} \quad (2)$$

Em que pH_{\min} , pH_{otm} e pH_{\max} correspondem a valores cardinais e ΔDO_{otm} e ΔDO corresponde a $\text{pH} = \text{pH}_{otm}$.

$$\Delta DO = \Delta DO_{otm} \cdot \rho(T \text{ } ^\circ\text{C}) \quad (3)$$

$$\rho(T) = \begin{cases} 0, & T \leq T_{\min} \\ \frac{(T - T_{\max}) \cdot (T - T_{\min})^2}{(T_{otm} - T_{\min})[(T_{otm} - T_{\min})(T - T_{otm}) - (T_{otm} - T_{\max})(T_{otm} + T_{\min} - 2T)]}, & T_{\min} < T < T_{\max} \\ 0, & T \geq T_{\max} \end{cases} \quad (4)$$

Em que: $T \text{ } ^\circ\text{C}_{\min}$, $T \text{ } ^\circ\text{C}_{otm}$ e $T \text{ } ^\circ\text{C}_{\max}$ correspondem a valores cardinais e ΔDO_{otm} e ΔDO é o correspondente a $T \text{ } ^\circ\text{C} = T \text{ } ^\circ\text{C}_{otm}$.

Para efeitos de validação do modelo cardinal de Rosso, o efeito combinado de pH e temperatura na ΔDO foi previsto usando a seguinte equação:

$$\Delta DO = \Delta DO_{otm} \cdot \rho(\text{pH}) \cdot \rho(T \text{ } ^\circ\text{C}) \quad (5)$$

Para a média de ΔDO_{otm} a estimativa dos valores de ΔDO_{otm} as equações (1-4) foram usadas.

3.3.2. Modelagem probabilística de regressão logística

No presente estudo, o índice relativo da formação de biofilme (IRFB) foi introduzido como uma medida para a quantificação do efeito do meio ambiente na medida da formação do biofilme. O IRFB é definido como a razão entre o valor ΔDO proveniente a partir do ensaio de cristal violeta a uma determinada condição ambiental e o valor máximo ΔDO observado na condição ideal para a formação de biofilme:

$$\text{IRFB} = \Delta DO / \Delta DO_{\text{otm}} \quad (6)$$

Os dados obtidos de densidade óptica (ΔDO) correspondentes às diferentes condições ambientais foram classificados em dados binário: (0) não adesão e formação de biofilme, (1) com adesão e formação de biofilme, usando um valor de IRFB limiar igual a 0,1 (10 % ΔDO_{otm} observada em condições ótimas). Em seguida, um modelo de regressão polinomial logística foi ajustado para os dados binários usando Sigma Plot versão 11, com base na abordagem descrita por Ratkowsky e Ross (1995).

As expressões 8 e 9 descrevem o modelo de regressão logística.

$$P(x) = \frac{e^{(\beta_0 + \sum \beta_i x_i)}}{1 + e^{(\beta_0 + \sum \beta_i x_i)}} \quad (7)$$

Em que:

$P(x)$ é a probabilidade de adesão e formação do biofilme;

β_0 e β_i são os coeficientes do modelo;

x_i são as variáveis independentes.

A transformação de $P(x)$, essencial para o estudo da regressão logística é dado pela transformação logit. (Equação 8).

$$\text{Logit}(P) = f(x) = \ln \left[\frac{P(x)}{1 - P(x)} \right] \quad (8)$$

Dessa forma a equação 9 representa o modelo logit que foi detalhado:

$$\text{Logit}(P) = \beta_0 + \beta_1 \cdot \text{pH} + \beta_2 \cdot T + \beta_3 \cdot \text{pH} \cdot T + \beta_4 \cdot \text{pH}^2 + \beta_5 \cdot T^2 \quad (9)$$

Em que:

Logit (P) é uma abreviatura de $\ln [P / (1P)]$, P é a probabilidade de adesão e formação de biofilme (na gama de 0-1);

β_0, \dots, β_5 são os coeficientes do modelo;

T: Temperatura (°C);

pH: pH.

3.3.3. Análises experimentais do desempenho dos modelos preditivos

Para verificar o desempenho e confiabilidade dos modelos preditivos de probabilidades gerados com dados de quantificação indireta pela técnica de coloração de biomassa do biofilme com cristal violeta, foi realizado em alguns tratamentos a quantificação indireta pelo método tradicional de contagem em placas e comparados com as previsões geradas. Para análise dos dados, considerou-se como acerto do modelo adesão e formação de biofilme (1) quando as probabilidades preditas foram acima de $p=0,45$, associadas às contagens acima de $3 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ e não adesão e formação de biofilme (0) o inverso dos parâmetros.

Para isso, realizou-se a adesão e formação dos biofilmes em placas de 24 poços de poliestireno, os poços continham caldo BHI em pH ajustado (4 ou 8) com o inóculo das suspensões bacterianas (concentração de $1,0 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) as placas foram incubadas em temperaturas à $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ou $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h. Após o tempo de incubação, o meio de cultura de cada poço foi removido e os poços foram lavados uma vez com tampão fosfato de sódio (PBS) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,8 a 7,2 para remover as células planctônicas, em seguida, as células foram coletadas dos poços utilizando um *swab* esterilizado. O *swab* foi transferido para um tubo de ensaio contendo água peptonada 0,1 % e agitado em vórtex durante 90 segundos. Em seguida, diluições apropriadas foram feitas e $20 \text{ } \mu\text{L}$ de cada diluição foram inoculadas pela técnica de microgotas em meios seletivos adequados. Para tanto, foram utilizados ágar Sorbitol Mackonkey (Oxoid®), ágar Oxford (Merck®) e Hecktoen (Acumedia®) para as contagens de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* e, respectivamente. As placas foram incubadas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12-24 h para enumeração das bactérias. Os resultados foram calculados em $\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ de acordo com a Equação 10 e expressos em $\log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. Os experimentos foram realizados em duas repetições.

$$\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2} = \frac{N.D. \left(\frac{V}{P} \right)}{A} \quad (10)$$

Em que:

N = média da contagem de colônias após o tempo de incubação;

D = inverso da diluição decimal;

V = volume de solução salina para retirada das células salinas;

P = alíquota plaqueada;

A = área das superfícies dos poços (cm²).

Além da contagem de colônias em placas também foi realizada a adesão das estirpes em cupons de poliestireno (1 cm x 1cm) para a visualização em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e comparadas as predições com as imagens obtidas. A técnica de microscopia é um método direto de detecção de biofilmes e contam com a observação da colonização microbiana, deste modo a presença de células aderidas foi considerado como acerto do modelo.

Os cupons foram previamente limpos por lavagem com detergente neutro líquido e água, enxaguados com água destilada e em seguida imersos em álcool etílico a 70% durante 1 h para remover a gordura. Os cupons foram novamente rinsados com água destilada, secos à temperatura ambiente e esterilizados por radiação ultravioleta (UV), por 20 min de cada lado. Após este procedimento, os cupons foram acondicionados em placas de 24 poços e imersos em caldo BHI com pH ajustado (4 e 8) com o inóculo das suspensões bacterianas (concentração de $1,0 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹) e incubados em temperatura (5 °C e 35 °C) durante 48 h. Os cupons foram lavados com tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 6,8 a 7,2 para remoção das células não aderidas. A etapa de fixação foi realizada com glutaraldeído 2,5 % por duas horas a 25 °C. Em seguida, foi lavado com tampão PBS 0,05 mol L⁻¹, pH 6,8 a 7,2. A etapa da desidratação foi realizada com o tratamento seriado em etanol nas concentrações de 30 %, 50 %, 70 %, 80 % e 95 % por 10 minutos cada e três tratamentos de 10 min, em etanol 100%. Os cupons foram transferidos para o secador de ponto crítico (Balzers CPD 020) para a desidratação total. Os cupons foram, em seguida, metalizados com liga de ouro em metalizador (Quorum Q150R S) e observados no microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430, ZEISS), disponível no núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

4. Resultados e Discussão

4.1. Modelo de parâmetro cardinal de Rosso

O parâmetro cardinal de Rosso é um importante modelo secundário empírico e, muito utilizado na microbiologia preditiva, entretanto, para modelar a adesão e formação de biofilmes para as bactérias *E. coli*, *S. enterica* e *E. faecalis* os resultados encontrados não se ajustaram ao modelo proposto, em razão que o pH_{max} correspondeu ao valor cardinal igual ao pH_{otm} .

Para *L. monocytogenes* o modelo cardinal de Rosso é apresentado na Figura 1. Os efeitos individuais de pH e temperatura na adesão e formação de biofilmes mostraram que *L. monocytogenes* tende a aderir em condições favoráveis de crescimento microbiano. No caso do pH, um valor ótimo é observado em condições básicas (pH = 8), e em relação à temperatura observou-se um aumento nos valores de DO acima de 15 °C, com valor ótimo entre 25 e 35 °C. A modelagem de extensão também não foi apropriada pois não ajustou bem os dados.

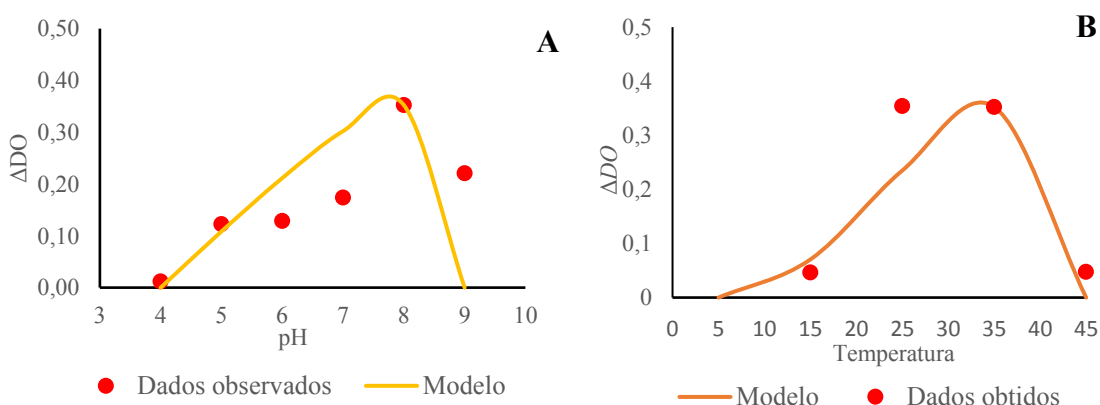


Figura 1- A) Modelo de parâmetro cardinal para o efeito do pH (Equação 1), expresso em valores ΔOD a 35 °C de *L. monocytogenes*. B) Modelo de parâmetro cardinal para o efeito da temperatura (Equação 2) em pH 8.

4.2. Modelagem probabilística de regressão logística

O modelo de probabilidade de regressão logística é muito utilizado na microbiologia preditiva por diversos autores, geralmente para prever o crescimento microbiano/não crescimento em variáveis independentes como pH, temperatura, atividade de água e ácidos (BELESSI et al., 2011; VERMEULEN et al., (2009), porém para descrever a probabilidade de adesão ou formação de biofilme ainda há poucos trabalhos publicados até o momento.

A fim de utilizar a modelagem probabilística primeiramente calculou-se o índice relativo da adesão e formação de biofilme, as Tabelas do Anexo A apresentam as respostas de adesão e formação de biofilmes obtidas em função das variáveis

independentes de temperatura e pH. Os dados binários foram ajustados a um modelo polinomial usando regressão logística. Os parâmetros não significativos ($P < 0.05$) foram removidos do modelo. Os parâmetros estimados do modelo de regressão logística para cada bactéria são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística de adesão e formação do biofilme para as diferentes bactérias.

Coefficiente	Variável	Coefficiente	Desvio padrão	P value
<i>L. monocytogenes</i>				
β_0	Constante	-20,677	5,104	<0,001
β_1	pH	4,386	1,501	0,003
β_2	Temperatura	0,499	0,105	<0,001
β_3	pH ²	-0,288	0,115	0,012
β_4	Temperatura ²	-0,00802	0,001	<0,001
<i>E. coli</i>				
β_0	Constante	-12,432	2,520	<0,001
β_1	pH	0,735	0,198	<0,001
β_2	Temperatura	0,731	0,145	<0,001
β_3	Temperatura ²	-0,0127	0,002	<0,001
<i>S. enterica</i>				
β_0	Constante	-34,707	8,653	<0,001
β_1	pH	6,011	1,849	0,001
β_2	Temperatura	1,143	0,289	<0,001
β_3	pH ²	-0,404	0,136	0,003
β_4	Temperatura ²	-0,0189	0,00481	<0,001
<i>E. faecalis</i>				
β_0	Constante	-13,415	2,764	<0,001
β_1	pH	0,710	0,193	<0,001
β_2	Temperatura	0,777	0,164	<0,001
β_3	Temperatura ²	-0,0129	0,00277	<0,001

Conforme mostrado na Tabela 3, verificou-se que o pH linear, pH quadrático, temperatura e temperatura quadrática afetaram significativamente ($P < 0,05$) os limites de adesão e formação de biofilme de *L. monocytogenes* e *S. enterica* e nenhuma interação significativa entre pH e temperatura foi encontrada, enquanto para *E. coli* e *E. faecalis* o pH quadrático não foi significativo e, também nenhuma interação significativa entre pH e temperatura foi encontrada.

O índice de concordância e a estatística de ajuste de Hosmer-Lemeshow foram usados como medidas da qualidade do ajuste do modelo desenvolvido. As porcentagens globais acertadas foram 82,9 %, 88,9 %, 82,3 % e 81,4 % para, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* e *E. faecalis*, respectivamente. O teste Hosmer e Lemeshow testa a validade

preditiva do modelo de regressão logística, comparando os dados observados e os preditos, e, indica um ajuste ruim se o valor de significância for menor que 0,05. A estatística de adequação ao ajuste de Hosmer-Lemeshow foi de 6,427 ($P = 0,574$) para *E. coli*; 11,998 ($P = 0,151$) para *L. monocytogenes*; 8,139 ($P = 0,420$) para *S. enterica* e 11,249 ($P = 0,188$) para *E. faecalis*. Os valores P encontrados foram acima de 0,05, o que significa que o modelo prevê os dados de forma adequada. Segundo Vermeulen et al., (2009) na estatística de Hosmer-Lemeshow quando se exibe um valor pequeno ou se seu valor P correspondente for alto, o modelo ajusta bem os dados.

As probabilidades foram calculadas de acordo com a Equação 8 e as previsões dos modelos de regressão logística desenvolvidos para a adesão e formação de biofilmes foram comparados com os dados das experimentações de contagens de colônias em placa e MEV, os resultados correspondentes à verificação encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Verificação do desempenho dos modelos preditivos em comparação com as análises experimentais observadas nas contagens em placas ($\text{LogUFC}\cdot\text{cm}^{-2} \pm$ desvio padrão) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Ensaio		<i>Escherichia coli</i>			<i>L. monocytogenes</i>			<i>S. enterica</i>		
T	pH	Predito	Observado ($\text{Log UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$)	MEV	Predito	Observado ($\text{Log UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$)	MEV	Predito	Observado ($\text{Log UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$)	MEV
5 °C	4	0	0 ND	0	0	0 ND	0	0	0 ND	0
5 °C	8	0	1 (6,4±0,6)	0	0	1 (4,7±0,8)	1	0	1 (5,2±0,3)	0
35 °C	4	0,45	1 (4,5±0,4)	1	1	1 (5,0±0,6)	1	1	1 (4,1±1,8)	1
35 °C	8	1	1 (5,2±0,3)	1	1	1 (5,6±0,2)	1	1	1 (5,9±0,5)	1

Os valores preditos pelos modelos apresentaram boa concordância com os resultados experimentais e isso mostra a confiabilidade e desempenhos dos mesmos. A porcentagem de concordância entre os modelos preditos com dados das observações experimentais foi de 91,6 % acertos, sendo os erros ocorridos falsos negativos (adesão observada, mas sem adesão prevista). Assim, os modelos apresentados podem ser considerados adequados para avaliação da adesão e formação de biofilmes sob influência dos fatores temperatura e pH. Desta forma, métodos indiretos de quantificação de biofilmes utilizando técnica de coloração de biomassa podem ser utilizados para construção de modelos matemáticos.

Devido a fisiologia e características de cada bactéria, temperatura e pH são fatores que irão influenciar diferentemente a adesão e formação de biofilme nas espécies. Em análises aos resultados de probabilidades de adesões das espécies testadas verificam-se

que com o aumento da temperatura o risco de o evento acontecer é maior. É conhecido que a temperatura é um fator extrínseco que influencia o crescimento e a adesão bacteriana, uma vez que variações de temperatura são críticas na atividade enzimática e afetam as estruturas das superfícies celulares como flagelos, fimbrias, pili, curli e lipopolissacarídeos de superfície responsáveis pela adesão inicial das células às superfícies, além disso baixas temperaturas podem afetar a produção de EPS (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Além da temperatura, outro fator importante na adesão e desenvolvimento dos biofilmes é o pH do meio, visto que este tem efeito no metabolismo microbiano e apresenta valores de pH ótimos de crescimento e limites de pH para sobrevivência dos micro-organismos. O pH afeta a formação dos biofilmes principalmente durante a fixação inicial nas superfícies, condições de pH mais baixo diminuem a taxa de adesão (NGUYEN; YANG; YUK, 2014), e mudanças nas propriedades superficiais dos micro-organismos devido a alterações de pH podem aumentar ou diminuir a repulsão eletrostática entre as superfícies e, deste modo, interferir no processo de adesão (CHAVES 2014).

Observou-se maiores probabilidades de adesão de *E. coli* quando a temperatura está nas condições ótimas de crescimento (25 °C a 35 °C) (Figura 2A).

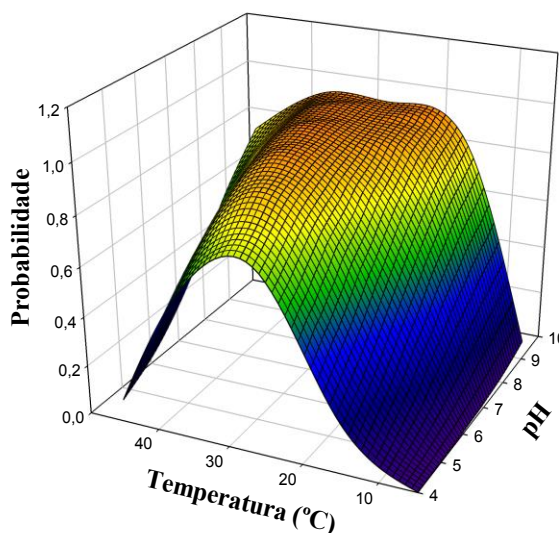


Figura 2 – Probabilidades de adesão e formação de biofilmes de *Escherichia coli* preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística.

No trabalho de Abdallah et al. (2019), também houve uma maior adesão das cepas de *E. coli* com o aumento da temperatura. A temperatura exerce uma forte influência na adesão, pois condições com pH 4,0, mas em temperatura a 35 °C permitirá *E. coli* aderir a uma probabilidade de 63 %, essa adesão é confirmada pela microscopia (Figura 3C) e corroborou com os resultados obtidos por contagem em placas (cerca de $4,5 \pm 0,4$ log

UFC·cm⁻²), já na temperatura de 5 °C, o modelo previu que não há adesão, e a correta previsão foi confirmada por MEV, pois nenhuma célula de *E. coli* foi encontrada nos cupons (Figura 3A) e nenhuma colônia detectada nas contagens em placa (Tabela 4).

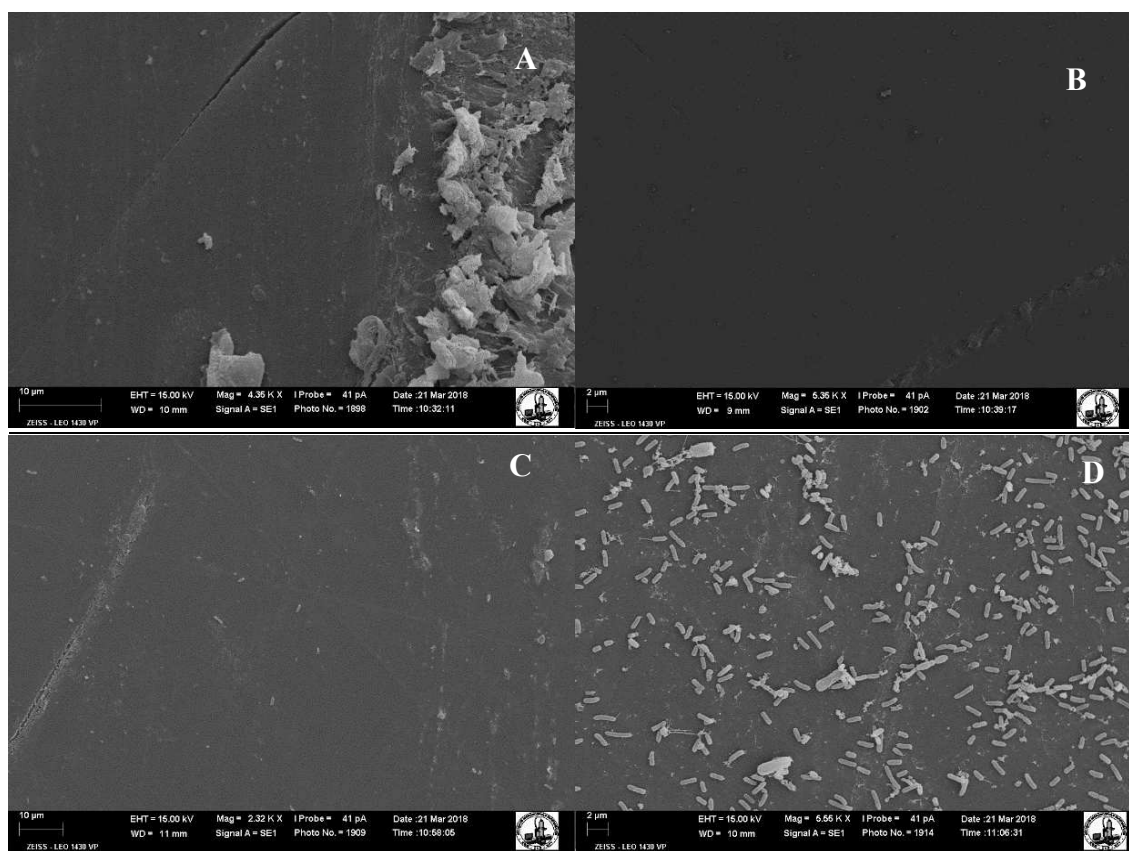


Figura 3 – Imagens por microscopia eletrônica de varredura de *Escherichia coli* aderidas à cupons de poliestireno. A) Temperatura de 5 °C em pH 4, B) Temperatura de 5 °C em pH 8. C) Temperatura de 35 °C em pH 4. D) Temperatura de 35 °C em pH 8.

Além do efeito do aumento da temperatura na adesão, constatou-se que, com aumento do pH houve uma maior adesão de *E. coli*, e observou-se maior probabilidade de adesão nos pHs alcalinos (8 e 9) em comparação a adesão nos pHs neutros (6,0 e 7,0), provavelmente condições alcalinas levam a um maior estresse nas células bacterianas e isso, pode favorecer maior adesão. Também no trabalho de Li, McLandsborough, (1999) e Costa et al., (2014) foi achado essa mesma tendência de maior adesão em condições alcalinas de *E. coli* O157:H7. Com temperaturas a 35 °C e em pH 8 a probabilidade de adesão pelo modelo é 97 %, nesta condição as contagens das células chegaram a $5,2 \pm 0,3 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, e pela microscopia foi possível visualizar a presença de exopolissacarídeo (Figura 3D), indicando que ocorreu a formação de biofilme, já em pH 6 a probabilidade de adesão ocorre a 88,1 %. Segundo Vatansever; Turetgen, (2018) quando o valor do pH cai para 3-5, as concentrações de polissacarídeos e proteínas

diminuem rapidamente, no entanto, em pH alcalino a diminuição destes são mais moderadas do que em pH ácido. Além disso, *E. coli* possui a capacidade de crescimento em uma ampla faixa de pH (4,4 a 9,2), e seu próprio metabolismo pode mudar ao pH externo. Foi demonstrado que enzimas em *E. coli* podem converter o ambiente circundante de alcalino em ácido pela produção de produtos ácidos a partir de aminoácidos (STANCIK et al., 2002).

A Figura 4 representa as probabilidades de adesão e possível formação de biofilmes de *L. monocytogenes*.

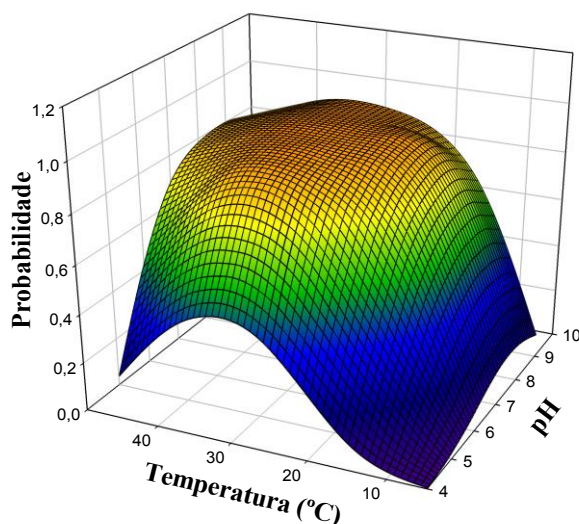


Figura 4 – Probabilidades de adesão e formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística.

L. monocytogenes é uma bactéria patogênica que pode crescer em uma ampla faixa de temperatura, que varia de 0 °C a 45 °C, as temperaturas ótimas de crescimento encontram-se entre 30 °C a 37 °C (SWAMINATHAN et al., 2007), além disso, possui capacidade de aderir às superfícies de contato com alimentos na faixa de 4 °C a 45 °C (MAI; CONNER, 2007). Por essas razões, *L. monocytogenes* apresentou altas adesões tanto em baixas e altas temperatura, por exemplo, a 15 °C e 45 °C e pH 7, a probabilidade é acima de 82 % e 89 % respectivamente. Como esperado, principalmente nas temperaturas ótimas de crescimento, o aumento das temperaturas ocasionou maiores probabilidades de adesão de *L. monocytogenes* provavelmente devido ao maior crescimento das bactérias (Figura 4). Também nos trabalhos de Mai e Conner, (2007) e Fan et al. (2020), à medida que a temperatura aumentou (30 °C a 37 °C), maior adesão e formação de biofilme ocorreram, além disso, os autores relatam que o aumento da temperatura pode modificar as características de hidrofobicidade da bactéria e conseqüentemente maior adesão ocorrer, a alta hidrofobicidade foi correlacionada positivamente com a alta formação de biofilme de *L. monocytogenes* a 37 °C.

Outra característica importante de *L. monocytogenes* é a sobrevivência sob condições extremas de crescimento, como pH 3,0 ou 9,0 (DORTET; VEIGA-CHACON; COSSART, 2019). Devido a essa natureza fisiológica, a formação de biofilme por essa bactéria é estimulada para proteção contra as condições estressantes (LEE, 2017). Desta forma, a adesão ocorreu mesmo em condições extracelulares ácidas (pH 4,0), mas em uma temperatura ótima de crescimento (35 °C), a probabilidade pelo modelo é cerca de 50 %, nestas condições foi possível visualizar a adesão por MEV e as contagens chegaram a 5,0 log UFC·cm⁻² (Figura 5C).

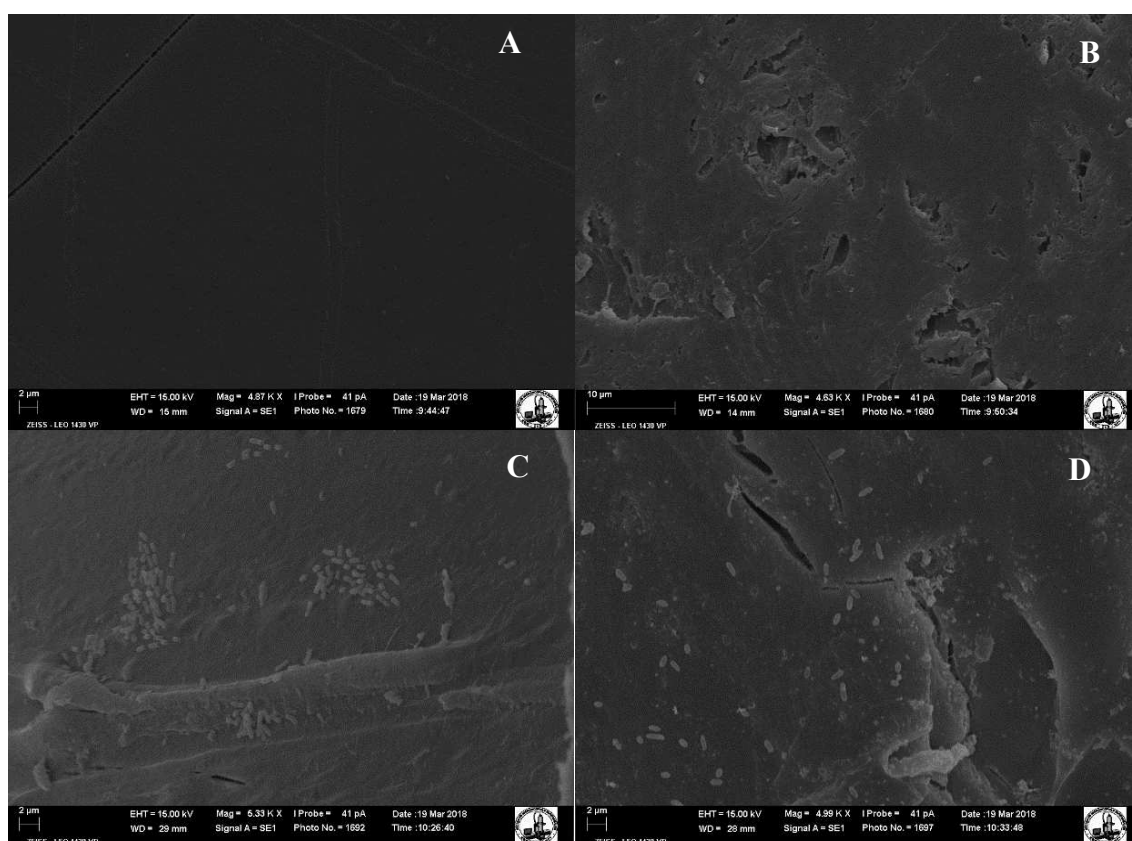


Figura 5— Imagens por microscopia eletrônica de varredura de *Listeria monocytogenes* aderidas à cupons de poliestireno. A) Temperatura de 5 °C em pH 4,0. B) Temperatura de 5 °C em pH 8,0. C) Temperatura de 35 °C em pH 4,0. D) Temperatura de 35 °C em pH 8,0.

Somente a combinação entre pH ácido (4,0) e temperatura baixa (5 °C) foi desfavorável para adesão desta bactéria e a menor probabilidade foi encontrada (0,4 %). Nestas condições, não foram encontradas nenhuma contagem em placas e também não foram visualizadas bactérias aderidas por microscopia (Figura 5A), mostrando que o modelo seguiu coerente com a previsões.

Em observação a Figura 4 e análise das probabilidades de adesão e formação de biofilmes de *L. monocytogenes*, verifica-se que devido as características psicrotróficas,

essa bactéria representa um grande perigo principalmente em ambientes refrigerados, uma vez que mesmo em baixas temperaturas como a 5 °C e condições de pH 8, a probabilidade de adesão foi de 15 % e experimentalmente as contagens neste tratamento chegaram a 4,7 Log UFC·cm⁻². Entretanto, não foi observada nenhuma célula aderida por MEV (Figura 5B), isto possivelmente ocorreu devido ao desprendimento das células durante a preparação dos cupons para a microscopia.

Segundo Borges et al. (2018) os fatores envolvidos na adesão e formação de biofilme têm respostas diferentes de acordo com a temperatura de incubação. Considerando a temperatura 37 °C ideal para o crescimento de *Salmonella*, uma diminuição na temperatura de incubação pode reduzir a adesão bacteriana. Os resultados do modelo preditivo de *S. enterica* (Figura 6) indicaram que temperaturas entre 15 °C e 45 °C e valores de pH 7,0 e 8,0 acarretam probabilidades acima de 60 % para adesão e formação de biofilme, já em relação as temperaturas baixas (5 °C e 10 °C) e níveis de pH baixos (4,0 a 5,0), as probabilidades de adesão e formação de biofilmes foram menores que 3 %, mostrando a interferência do ambiente na adesão.

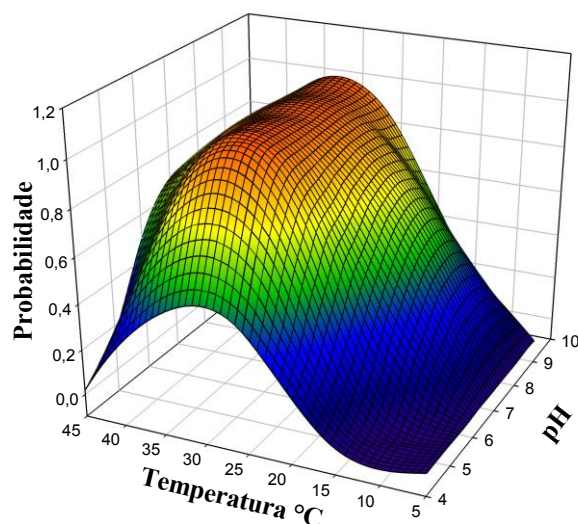


Figura 6 – Probabilidades de adesão e formação de biofilmes de *Salmonella enterica* preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística.

Comportamento no aumento da taxa de formação de biofilme em *S. enterica* em temperaturas mais elevadas e pHs neutros também são relatados nos trabalhos de Nguyen; Yang e Yuk, (2014), Moraes et al. (2018), Roy et al. (2021). Neste contexto, não houve crescimento e adesão de *S. enterica* na temperatura de 5 °C e pH 4,0, e nenhuma célula foi detectada pelas técnicas de contagem em placas (Tabela 4) e por MEV (Figura 7A), diferentemente, em pH 4 e temperatura de 35 °C houve adesão com probabilidade pelo modelo de 43 % e a contagem foi de $4,1 \pm 1,8 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Figura 7C). Também Moraes et al. (2018, 2019) ao desenvolver modelos preditivos de diferentes sorotipos de

Salmonella verificou que *S. Enteritidis* aderiu e formou biofilme mesmo em condições ácidas (pH ~ 4,0), em temperaturas de 20 °C ou 35 °C. No tratamento em pH 8 a 35 °C, foi possível verificar pela imagem de microscopia até a presença de exopolissacarídeo entre as células e a superfície (Figura 7A), houve contagem de $5,9 \pm 0,5 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, o valor encontrado pela técnica da contagem de células e as estruturas de EPS indicam claramente que nesta condição houve a formação de biofilme na superfície.

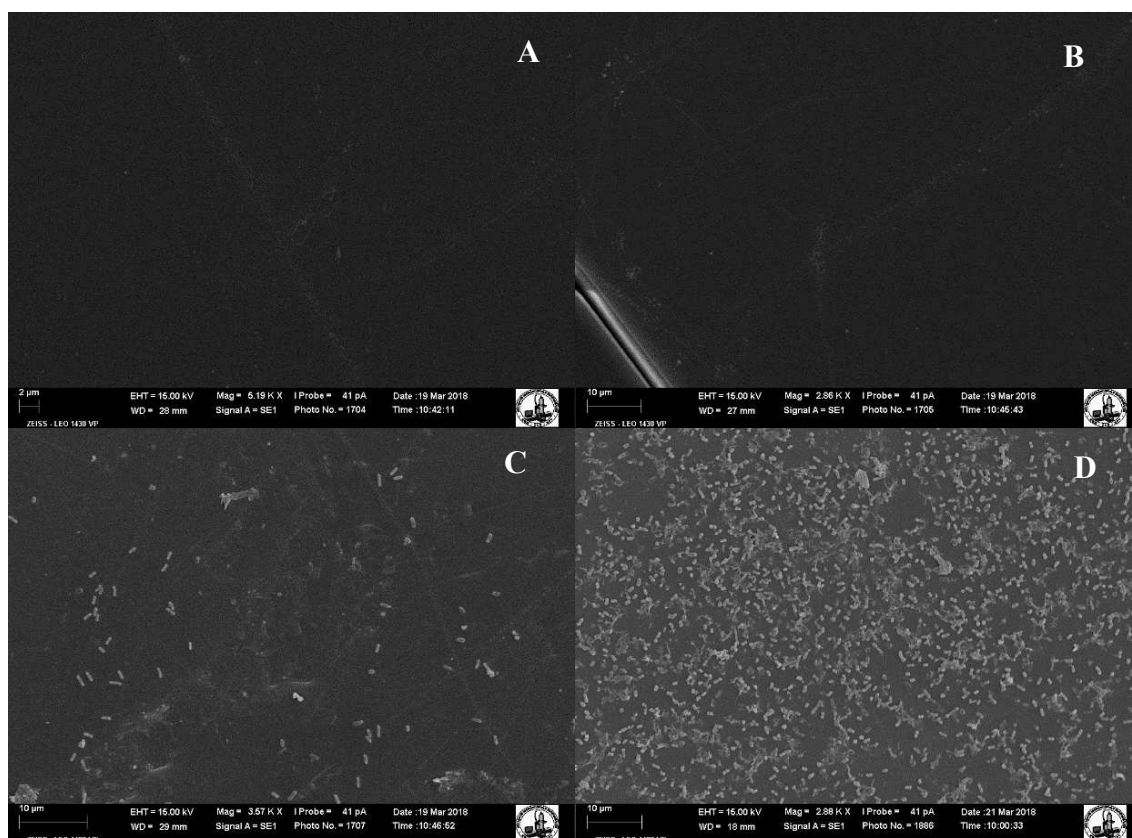


Figura 7 – Imagens por microscopia eletrônica de varredura de *Salmonella enterica* aderidas à cupons de poliestireno. A) Temperatura de 5 °C em pH 4; B) Temperatura de 5 °C em pH 8, C) Temperatura de 35 °C em pH 4 e D) pH 8 e temperatura de 35 °C.

Enterococcus spp. são micro-organismos ubíquos que são comuns nas indústrias de alimentos e possuem a capacidade de sobreviver em condições ambientais adversas, como temperaturas extremas (5 °C a 65 °C), com crescimento em uma faixa de temperatura de 5 °C a 50 °C. *E. faecalis* pode crescer em uma ampla faixa de pH (4,6 a 9,9) com o ótimo sendo 7,5 (FISHER; PHILLIPS, 2009). Neste estudo, as temperaturas ótimas para a adesão e por conseguinte a formação do biofilme situaram-se entre 21 e 47 °C, próximas das ideais para este micro-organismo (Figura 8). Não é surpreendente que as bactérias formem mais biofilme a 37 °C do que em outras temperaturas testadas, nessa temperatura, as bactérias crescem melhor e, conseqüentemente, o número de células

aumenta e, como resultado, a massa celular facilita a sedimentação, resultando em maior fixação inicial (MARINHO et al., 2013).

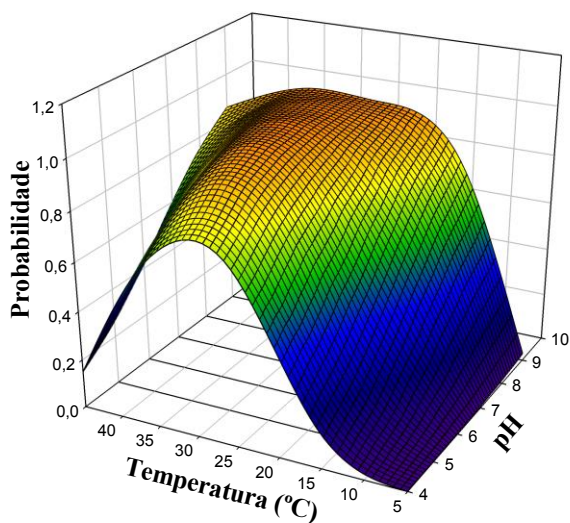


Figura 8 – Probabilidades de adesão e formação de biofilmes de *Enterococcus faecalis* previstas pelo modelo probabilístico de regressão logística.

Pelo modelo preditivo, temperaturas acima de 20,8 °C, independentes do pH, são críticas para a adesão de *E. faecalis* pois são encontradas probabilidades acima de 50 % (Figura 8) Mesmo sob baixos valores de pH as adesões podem ocorrer, como evidenciado pela microscopia em condições de pH 4 a 35 °C (Figura 9C). Desta forma, neste estudo, as temperaturas ótimas para a adesão e por conseguinte a formação do biofilme situaram-se na faixa entre 20,4 e 39,4 °C, estes resultados são semelhantes aos encontrados por Rosado de Castro et al. (2017) que encontraram condições ótimas para a formação de biofilmes de *E. faecalis* em aço inoxidável em temperatura entre 21 e 43 °C. Também no trabalho de Fernandes; Kabuki e Kuaye, (2015), as temperaturas ideais encontradas para a formação de biofilmes de *E. faecalis* e *E. faecium* são de 25 °C e 35 °C, respectivamente.

Apesar de *Enterococcus* sobreviver a baixas temperaturas, baixas probabilidades de adesão de *E. faecalis* são encontradas em temperatura de 5 °C e em combinação com baixos valores de pH (Figura 8). Na condição de pH 8 a 5 °C, a adesão não foi prevista pelo modelo, porém foi observado a adesão na MEV (Figura 9B) configurando uma predição falso positivo.

No modelo de adesão de *E. faecalis* (Figura 8) é observado que à medida que se elevam os valores de pH as probabilidades de adesão aumentaram, entretanto, pode ser visto que em condições alcalinas, ou seja, em pH 9, maiores probabilidades de adesão (acima de $p=0,85$) ocorreram em comparação ao pH ótimo de crescimento (7,5) e condições neutras, em todas as temperaturas testadas. Esses resultados mostram que

provavelmente, a mudança fisiológica das células planctônicas para sésseis pode ser induzida em resposta a condição alcalina.

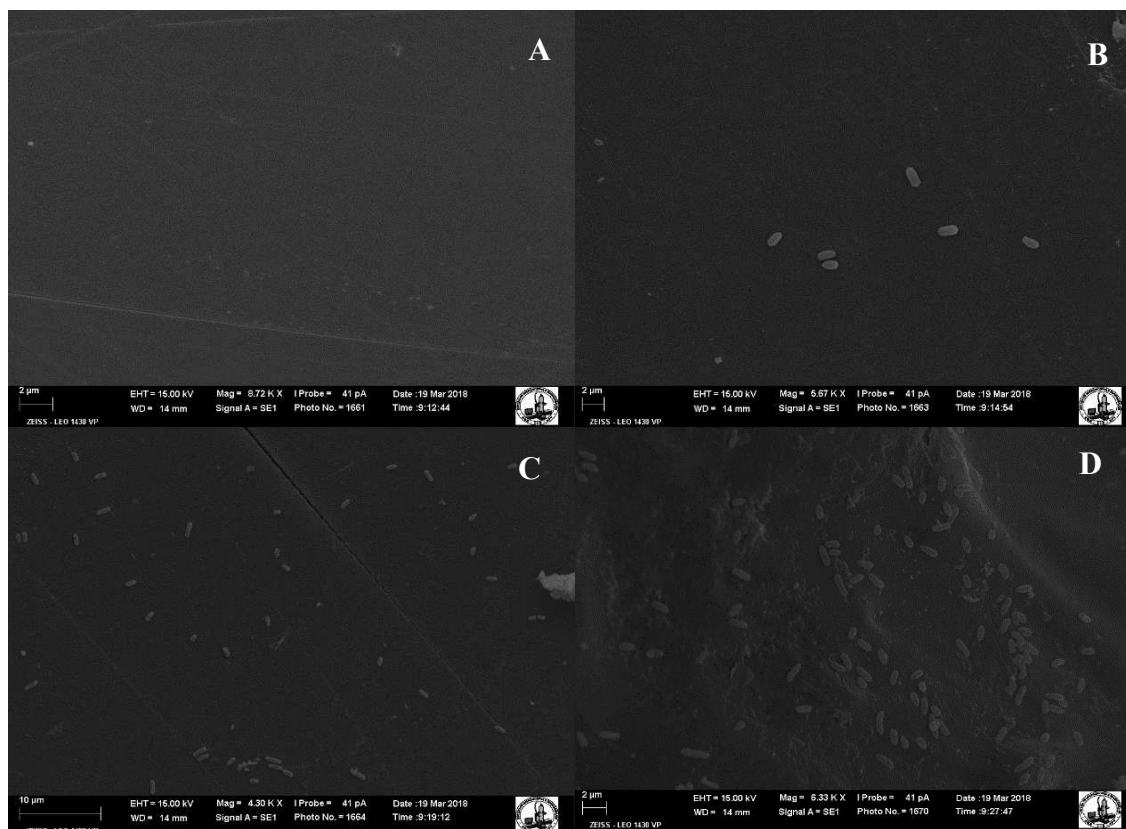


Figura 9 – Imagens por microscopia eletrônica de varredura de *Enterococcus faecalis* aderidas à cupons de poliestireno. A) Temperatura de 5 °C em pH 4,0. B) Temperatura de 5 °C em pH 8,0. C) Temperatura de 35 °C em pH 4,0. D) Temperatura de 35 °C em pH 8,0.

Estes dados corroboram com as pesquisas realizada por Kayaoglu, Erten, Ørstavik (2005), que observaram uma maior adesão significativa de *E. faecalis* em superfícies de polipropileno revestidas com colágeno tipo I quando cultivadas em pH 8,0 e 8,5, comparadas com as cultivadas em pH 7,1. Também no trabalho de Fan, Huang, Fan (2018), observou-se uma melhor capacidade de adesão em pH alcalino. Além disso, foi verificado por Ran, He, Liang (2013), que a hidrofobicidade de *E. faecalis* em meio alcalino (pH 9, 10 e 11) aumentou significativamente em comparação com o meio em pH 7, mudanças nas propriedades físico-químicas podem explicar como *E. faecalis* facilita a formação de biofilme sob condições alcalinas. Na literatura, é observado e relatado que *E. faecalis* pode resistir a condições ambientais adversas, incluindo altos níveis de alcalinidade, podendo crescer em pH 9,6 (KAYAOGU; ERTEN; ØRSTAVIK, 2005; WECKWERTH et al., 2013) e tolerar níveis de pH de até 11,9 (FLAHAUT et al., 1997). Segundo Evans et al. (2002), *E. faecalis* suporta ambientes com condições de pH alcalino

provavelmente devido ao seu mecanismo de bomba de prótons que mantém o citoplasma a níveis ideais de pH.

5. Conclusão

O modelo de parâmetro cardinal não foi adequado no ajuste dos dados para descrever os efeitos dos parâmetros ambientais de temperatura e pH na adesão e formação de biofilmes de *E. coli*, *S. enterica* e *E. faecalis*, e também modelar a extensão da adesão de *L. monocytogenes*.

O melhor ajuste foi obtido com os modelos probabilísticos de regressão logística, estes foram construídos a partir de dados experimentais obtidos por método indireto de quantificação de biofilmes utilizando a técnica de coloração com cristal violeta. A confiabilidade dos resultados pelos modelos preditivos foi verificada por meio do método tradicional de contagem em placas (método indireto) e a microscopia eletrônica de varredura (método direto), sendo possível confirmar e visualizar as células aderidas e os biofilmes formados, reforçando os acertos e erros dos modelos e indicando que métodos indiretos podem ser utilizados para construir tais modelos.

O comportamento de adesão e formação de biofilmes das espécies estudadas, sob a influência da temperatura e pH, mostraram que o efeito a temperatura influenciou mais na adesão que o pH, pois em temperaturas ótimas a adesão ocorreu independente do pH. As probabilidades de adesão das espécies testadas verificaram que com o aumento da temperatura o risco de o evento acontecer é maior, entretanto riscos de adesões também ocorrem em temperaturas de 15 °C, principalmente em bactérias psicotróficas como *L. monocytogenes*. Além disso, condições ambientais alcalinas (8 e 9) estimularam a adesão de *E. coli* e *E. faecalis* proporcionando maiores probabilidades.

Na indústria de alimentos, prevenir a formação de biofilme é fundamental para manter um alto nível de segurança dos alimentos e os resultados das predições para todos os modelos apresentados no presente estudo sugerem que baixas temperaturas (5 a 10 °C) associados a baixos valores de pH (4,0 a 5,0) são necessários para evitar a adesão bacteriana e consequente formação de biofilmes.

Os resultados demonstraram que o efeito da temperatura e o pH na adesão e formação de biofilme são importantes em avaliações de risco, pois descrevem o impacto destes fatores ambientais e podem ser expressos quantitativamente utilizando-se modelos matemáticos. A utilização desses modelos pode fornecer informações úteis para o controle de biofilmes em ambientes da indústria de alimentos.

CAPÍTULO 2

Interações sinérgicas e antagônicas em biofilmes cocultura de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* com *Enterococcus faecalis*

1. Introdução

Em ambientes de processamento e de contato com os alimentos, diversas bactérias podem aderir-se às superfícies, sobreviver, crescer e formar biofilmes multiespécies, devido à existência de condições ambientais propícias (ANDERSSON et al., 2008).

A maioria dos estudos é realizado com um único micro-organismo, ou seja, biofilme em monoespécie, entretanto, no ambiente, os biofilmes são formados por vários micro-organismos. O interesse por biofilmes multiespécies é devido às interações entre as espécies que ainda são pouco compreendidas. Essas interações podem ser tanto de cooperação (sinergismo) ou competição (antagonismo) (BRIDIER et al., 2015).

Existem diversos estudos que mostram efeitos antagônicos entre micro-organismos e visam encontrar formas de inibir o crescimento de patógenos em alimentos. A presença de bactérias inibidoras pode exercer esse efeito pela competição por nutrientes e/ou produção de bacteriocinas e outros metabólitos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, dentre outros (SALVUCCI; LEBLANC; PÉREZ, 2016). Algumas cepas específicas de *Enterococcus* podem inibir o crescimento de bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes*, devido à produção de bacteriocinas, que atuam como conservantes naturais impedindo a adesão (FERNANDES; KABUKI; KUAYE, 2015).

Além disso, uma das características mais preocupantes para a indústria de alimentos é o aumento da resistência e proteção dos micro-organismos em biofilmes, em relação aos agentes de higienização. As células nos biofilmes podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos agentes químicos utilizados nas indústrias de alimentos (PENG; TSAI; CHOU, 2002; ROMANOVA et al., 2007; PEREIRA, et al., 2019).

Os efeitos das interações sinérgicas são responsáveis por várias vantagens para o biofilme e podem, por exemplo, tornar os membros desta comunidade mais tolerantes e resistentes e afetar, diretamente, a eficiência de antimicrobianos usados na sanitização dos alimentos e das superfícies que entram em contato com eles (CLARKE, 2016; RØDER; SØRENSEN; BURMØLLE, 2016; RODRÍGUEZ-LÓPEZ; CABO, 2017).

Desta forma, é cada vez mais evidente que biofilmes multiespécies podem ser mais resistentes à atividade biocida que suas contrapartes monoespécies, isso já é demonstrado em estudos indicados por Gomes et al. dentre outros sobre o aumento da resistência aos tratamentos com sanitizantes (VEEN, VAN DER, ABEE, 2011; IBUSQUIZA et al., 2012; GIAOURIS, et al., 2013; WANG et al., 2013; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, CABO, 2017; GOMES et al., 2018; OXARAN et al., 2018; PAPAIOANNOU et al., 2018, KOCOT; OLSZEWSKA, 2020). Entretanto, poucos estudos avaliaram a resistência dos sanitizantes nos biofilmes entre espécies sob aspectos dos modelos matemáticos; a maioria desses estudos não incluiu uma avaliação da resistência de cada micro-organismo nos parâmetros cinéticos de inativação; portanto, é impossível julgar se o efeito interespécies afeta a resistência individual de cada espécie nas comunidades multiespécies.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram: i) verificar as interações sinérgicas em cocultura entre várias combinações das bactérias estudadas. ii) avaliar a capacidade antagônica e os mecanismos utilizados por *E. faecalis* para controlar a formação de biofilmes por *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. enterica* subsp. *enterica* em diferentes temperaturas. iii) correlacionar o controle da formação dos biofilmes de patógenos por *E. faecalis* por meio da avaliação das propriedades de autoagregação e coagregação. iv) determinar os parâmetros cinéticos de inativação dos micro-organismos patogênicos no biofilme em monocultura e em cocultura com *E. faecalis* sob ação do dicloroisocianurato de sódio e cloreto de benzalcônio. Em adição, avaliar se houve aumento da resistência para inativação dos biofilmes quando cultivados em cocultura. v) obter imagens por microscopia eletrônica de varredura e avaliar as estruturas dos biofilmes formados em cupons de poliestireno das bactérias patogênicas em monocultura e cocultura com *E. faecalis*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biofilmes e as interações entre multiespécies

Embora a maioria dos biofilmes encontrados na natureza existam na forma de comunidades muito diversas, observa-se que a maioria dos experimentos conduzidos em laboratórios estuda os biofilmes formados por uma única espécie (FLEMMING et al., 2016). Esse paradoxo indica que a formação de biofilme em cultura pura, ou seja, em monoespécie, pode representar um indicador inconsistente do que realmente acontece na

natureza. Nos biofilmes multiespécies as interações antagônicas e sinérgicas podem estimular o desenvolvimento das comunidades (GUO et al., 2016).

Nos biofilmes mistos, a expressão de genes e, conseqüentemente, os fenótipos, são diferentes da forma planctônica (NADELL et al., 2008). Isto é resultado dos efeitos das interações entre célula-célula seja por contato físico ou pela comunicação química entre as células pelo mecanismo de *quorum sensing*. Esta comunicação entre as espécies por meio de *quorum sensing* desempenha um papel importante no desenvolvimento dos biofilmes (ELIAS; BANIN, 2012). Assim, algumas espécies que são incapazes de formar biofilme isoladamente podem promover o aumento da biomassa em espécies mistas (REN et al., 2015).

Nos biofilmes constituídos por mais de uma espécie bacteriana foi demonstrado o aumento da biomassa celular e que as interações nesses biofilmes melhoraram as condições das bactérias patogênicas em se estabelecer e atingir grande número de células (REN et al., 2015). Alguns estudos têm relatado que a formação de biofilmes de *Salmonella* spp. pode ser tanto promovida quanto inibida pela presença de outras bactérias. *E. coli* também é capaz de interagir com outros micro-organismos e formar biofilmes multiespécies nas superfícies de processamento de alimentos, incluindo tanto bactérias gram-negativas, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e gram-positivas como *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. (PÉREZ IBARRECHE; CASTELLANO, VIGNOLO, 2014). Algumas interações bacterianas podem permitir a adesão de estirpes com pouca capacidade em formar biofilmes. Um exemplo é a formação de biofilme de *E. coli* não-aderente que foi estimulada por bactérias presentes nos ambientes de processamento de alimentos e também bactérias presentes na água (CASTONGUAY et al., 2006). Além disso, os biofilmes compostos de várias espécies bacterianas podem tornar-se mais resistentes a ação dos sanitizantes (RØDER et al., 2015). Desta forma, o controle da adesão e formação de biofilmes nos ambientes de processamento de alimentos é uma medida importante para evitar a propagação de patógenos.

Também as interações antagônicas podem ocorrer por meio da competição por nutrientes ou inibição do crescimento pela produção de compostos inibidores, tais como bacteriocinas, ácidos orgânicos, biosurfactantes e enzimas (REN et al., 2015). A competição ou antagonismo pode ser descrita como um processo pelo qual um indivíduo diminui a sobrevivência ou reprodução de outros indivíduos e pode-se dividir em competição de exploração ou competição de interferência. A competição de exploração é indireta e ocorre quando um organismo consome ou impede o acesso dos recursos limitante, sem interação direta entre concorrentes. Neste caso, tem-se a competição por

nutrientes e/ ou oxigênio e a competição por espaço disponível para colonizar. A competição de interferência surge quando os indivíduos se prejudicam diretamente, tal como ocorre em situações em que há secreções de compostos antimicrobianos como antibióticos ou outras substâncias inibidoras do crescimento (RENDUELES; GHIGO, 2015; QUINTO; MARÍN; SCHAFFNER, 2016) (PANDE et al., 2015). Algumas bactérias inibem os biofilmes por secretarem compostos antimicrobianos. Por exemplo, uma estirpe de *Lactobacillus plantarum* levou à diminuição de 2 ciclos log na formação de biofilme de *Salmonella* spp., em comparação com o crescimento em monocultura (DAS et al., 2013).

Estratégias competitivas para o crescimento e sobrevivência são utilizadas, pelos micro-organismos, como a produção de bacteriocinas, ácidos orgânicos, biossurfactantes e enzimas (FLEMMING, et al., 2016) e outros metabólitos secundários, que geralmente são compostos bioativos que podem estar envolvidos nas interações microbianas (BRAGA; DOURADO; ARAÚJO, 2016). Esses compostos podem alterar as condições ambientais, físicas e químicas ou bloquear os receptores de superfície disponíveis, levando a inibição do crescimento de algumas bactérias ou mesmo à sua inativação total (SADOWSKA et al., 2010).

2.2. *Enterococcus* sp. como biocontrole

Enterococcus ssp. são bactérias do ácido lático (BAL), ubiqüitárias gram-positivas, catalase-negativa e podem sobreviver em condições adversas em vários tipos de alimentos. Algumas espécies produzem bacteriocinas, as quais inibem o crescimento de patógenos como *Listeria* sp. e *Salmonella* sp (FOULQUIÉ MORENO et al., 2003; SADOWSKA et al., 2010; HUANG et al., 2016).

A atividade antagonista de *Enterococcus* ssp. é conferida pela produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas, também chamadas de enterocinas (ACHEMCHAM et al., 2012). Além da produção desses compostos antimicrobianos, algumas estirpes de probióticos podem ser usadas como uma estratégia alternativa para reduzir a formação de biofilmes de bactérias patogênicas através da competição, exclusão e/ ou deslocamento (WOO; AHN, 2013). Como exemplo, isolados de *Enterococcus durans* demonstraram potencial de controlar e eliminar *L. monocytogenes* de drenos na indústria de processamento de carne e aves. Embora os mecanismos não sejam claros, as estirpes produziram metabólitos anti-listeriais (ZHAO et al., 2013).

Esses compostos do metabolismo secundário que muitas espécies podem secretar e interferir na formação dos biofilmes multiespécie, são desencadeados em resposta à presença de competição na vizinhança. Por isso, os mecanismos de defesa só ocorrerem quando as bactérias estão sob estresse em decorrência de uma ação prejudicial de outras bactérias concorrentes. Essa regulação da expressão de antibióticos ou bacteriocinas pode ser ativada ao detectarem, por exemplo, uma competição de nutrientes ou danos celulares direto ao invés de serem produzidas continuamente pelas células (CORNFORTH; FOSTER, 2013, CORNFORTH; FOSTER, 2015).

2.3. Resistência dos biofilmes a sanitizantes

Uma das grandes preocupações nas instalações de produção de alimentos é a persistência de patógenos alimentares e, quando estão na forma de biofilmes nas superfícies de processamento de alimentos, há uma grande dificuldade de eliminá-los, muitas vezes observando-se certa resistência da população (MYSZKA; CZACZYK, 2011; NYENJE; GREEN; NDIP, 2012).

Já é bem conhecido que as células sésseis são mais resistentes ao sanitizantes do que as células planctônicas. O aumento de resistência das células no biofilme aos sanitizantes é devido à uma maior formação de EPS que impede a difusão/reação de antibióticos e sanitizantes, mudanças na composição da matriz, além das características fenotípicas de resistência das células ou respostas de estresse adaptativo (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010; ELIAS; BANIN, 2012).

Além disso, os biofilmes de espécies mistas são ainda mais resistentes a tratamentos de desinfecção em comparação com os biofilmes de espécies únicas (METSELAAR et al., 2015). Nos biofilmes multiespécies, as interações entre espécies podem gerar vantagens o que pode explicar uma maior tolerância e resistência aos sanitizantes (LIU et al., 2017).

3. Materiais e Métodos

3.1. Estirpes bacterianas

As estirpes que foram utilizadas fazem parte do banco de culturas do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos e foram identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S/DNA (Tabela 1).

Tabela 1 – Estirpes estudadas

Espécie	Fonte	Referência
<i>Escherichia coli</i>	Alface	ANTUNES, 2009
<i>Listeria monocytogenes</i> sorovar 1/2b (UFV_02)	Melão	SOUZA, 2014
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	Alface	SILVA, 2013
<i>Enterococcus faecalis</i>	Leite	PERIN, NERO, 2014

Antes de cada experimento, as estirpes mantidas em microtubos de 1,0 mL contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol na proporção 80:20 à temperatura de -18 °C foram ativadas por duas repicagens consecutivas em BHI a 35 °C por 18-20 h. As células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com solução salina 0,85 % solubilizadas em caldo BHI (pH 7,2) e a absorbância foi ajustada para 0,08-0,10 a 625 nm utilizando espectrofotômetro (Kazuaki IL-227), o que corresponde ao padrão McFarland 0,5 que contém, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹.

3.2. Formação de biofilmes em cocultura e verificação da interação sinérgica entre diferentes espécies

Para induzir a formação de biofilme em cocultura, 100 µL da suspensão de *E. faecalis* e 100 µL da suspensão de cada cultura patogênica em uma concentração previamente padronizada para $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹ foram inoculadas em poços de placas de microtitulação de poliestileno esterilizadas. As combinações possíveis de cocultura entre as espécies foram inoculadas em iguais proporções na mesma concentração.

As placas foram incubadas estaticamente durante 48 h em diferentes valores de pH e temperaturas. Foram utilizados 6 de valores de pH (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0) e 4 temperaturas diferentes (15 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C).

Após 48 h, o meio de cultura de cada poço foi removido e os biofilmes formados nas placas foram lavados uma vez com água esterilizada para remover as células planctônicas. Os poços com os biofilmes foram corados com 200 µL de uma solução a 0,1 % (p/v) de cristal violeta (CV) durante 30 min a temperatura ambiente. As placas foram lavadas duas vezes com água destilada esterilizada para remover o excesso de corante e após foram secas em temperatura ambiente. O cristal violeta aderido ao biofilme formado na placa foi solubilizado com 200 µL de etanol. A densidade óptica (DO) da solução obtida foi medida a 590 nm usando leitor de placas de microtitulação (*Thermo*

Scientific). O experimento foi conduzido em triplicata e com quatro repetições. Os resultados foram expressos em DO a 590 nm.

Foram verificadas as possíveis interações sinérgicas na formação de biofilme entre as bactérias em cocultura. Considerou sinergismo, quando $DO_{590\text{ nm}}$ do biofilme em cocultura – desvio padrão médio $\geq DO_{590\text{ nm}}$ do biofilme da melhor estirpe em monocultura + desvio padrão médio. Nenhum sinergismo foi considerado quando $DO_{590\text{ nm}}$ biofilme em cocultura + desvio padrão médio $\leq DO_{590\text{ nm}}$ biofilme da melhor estirpe em monocultura – desvio padrão médio (REN et al., 2015).

3.3. Controle da formação dos biofilmes patogênicos por interações antagônicas de *Enterococcus faecalis*

O isolado *E. faecalis* utilizado neste experimento foi obtido a partir do leite de cabra, sendo caracterizado como bacteriocinogênico (capacidade de impedir a multiplicação de outras bactérias) por métodos fenotípicos e moleculares (PERIN; NERO, 2014). O isolado possui os genes lantibiótico C, nisina e o gene Enterocina L50AB que é uma bacterocina classificada na subclasse IIb. Além dessa habilidade, verificou-se ausência de genes de virulência (*gelE*, *cylA*, *hyl*, *asa 1*, *esp*, *efaA*, *ace*), resistência a antibióticos (vancomicina, gentamicina, cloranfenicol, ampicilina e rifampicina) e produção de amina biogênica (PERIN et al., 2014).

Nesta base, o efeito inibitório de *E. faecalis* na formação de biofilme patogênicos foi avaliado por três mecanismos: (A) competição entre células planctônicas de *E. faecalis* com células planctônicas patogênicas; (B) exclusão, em que células planctônicas patogênicas são excluídas por células do biofilme de *E. faecalis* e (C) deslocamento, em que células planctônicas de *E. faecalis* desloca células sésseis do biofilme patogênico pré-formado. A representação esquemática é mostrada na Figura 1.

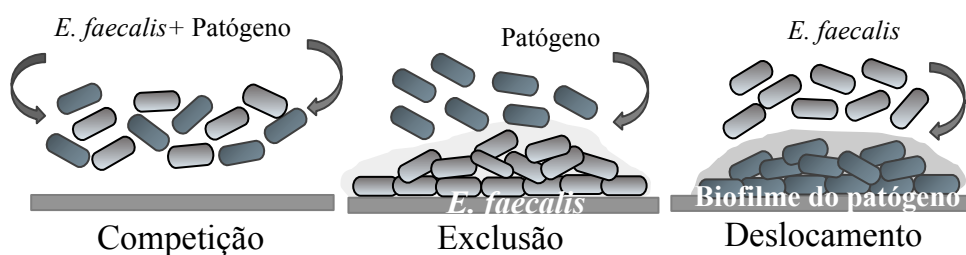


Figura 1 – Esquema de inibição da formação de biofilmes por *Enterococcus faecalis*. Adaptado de (PÉREZ-IBARRECHE et al., 2016).

O delineamento de cada ensaio foi inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos, correspondentes às temperaturas de 5 °C, 15 °C, 25 °C ou 35 °C. Os experimentos foram realizados em três repetições e as diferenças significativas ($P < 0.05$) entre as médias foram determinadas pelo teste de T usando o programa o programa *Sigma Plot* versão 11 (Systat Software, Inc).

3.3.1. Competição

Para o ensaio de competição, *E. faecalis* foi cocultivada com as bactérias patogênicas *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. enterica* em volumes iguais de 500 µL em concentração de, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹ nas placas de 24 poços durante 24 h nas temperaturas do delineamento. Os biofilmes em monocultura dos patógenos foram utilizados como controle.

3.3.2. Exclusão competitiva

Para o ensaio de exclusão competitiva, o biofilme de *E. faecalis* foi inicialmente formado com 500 µL do inóculo em concentração de, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹ e 500 µL de caldo BHI (pH 7,2) nas placas de 24 poços durante 24 h nas temperaturas do delineamento. Em seguida, os poços foram enxaguados com tampão PBS para remover células não aderidas e imediatamente inoculadas com 500 µL ($1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹) de cada suspensão bacteriana patogênica e 500 µL de caldo BHI (pH 7,2) e novamente incubadas durante 24 h nas temperaturas dos tratamentos. Também foram realizados os controles dos biofilmes em monocultura dos patógenos.

3.3.3. Deslocamento

Para o ensaio de deslocamento, os biofilmes dos patógenos foram previamente formados com uma alíquota de 500 µL ($1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹) das suspensões bacterianas e 500 µL de caldo BHI (pH 7,2) nas placas de 24 poços e incubadas durante 24 h em diferentes temperaturas. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e cada poço foi enxaguado duas vezes com tampão PBS para remover células não aderidas e 500 µL ($1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹) de *E. faecalis* e 500 µL de caldo BHI (pH 7,2) foram adicionados sobre o biofilme pré-formado dos patógenos. As placas foram incubadas durante 24 h nas

temperaturas do delineamento. Biofilmes em monocultura dos patógenos foram utilizados como controle (500 µL da suspensão de cada patógeno + 500 µL de caldo BHI (pH 7,2)).

3.3.4. Remoção e quantificação das células nos biofilmes

As células dos biofilmes de todos os ensaios de competição, exclusão competitiva ou deslocamento incubados em temperaturas de 5 °C, 15 °C, 25 °C ou 35 °C foram coletadas dos poços utilizando um *swab* esterilizado. O *swab* foi transferido para um tubo de ensaio contendo água peptonada 0,1 % e agitado em vórtex durante 90 segundos. Em seguida, diluições apropriadas foram feitas e 20 µL de cada diluição foram inoculadas pela técnica de microgotas em meios seletivos adequados. Para tanto, foram utilizados ágar MRS Vegiotone (Sigma[®]), Sorbitol Mackonkey (Oxoid[®]), ágar Oxford (Merck[®]) e Hecktoen (Acumedia[®]) e para as contagens de *E. faecalis*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella*, respectivamente. As placas foram incubadas a 35 °C durante 12-48 h para enumeração das bactérias. Os resultados foram calculados em UFC·cm⁻² de acordo com a Equação 1 e expressos em log UFC·cm⁻².

$$UFC \cdot cm^{-2} = \frac{N \cdot D \cdot \left(\frac{V}{P}\right)}{A} \quad (1)$$

Em que:

N = média da contagem de colônias após o tempo de incubação;

D = inverso da diluição decimal;

V = volume de solução salina para retirada das células salinas;

P = alíquota plaqueada;

A = área das superfícies dos poços (cm⁻²).

As reduções decimais das células patogênicas e *E. faecalis* dos biofilmes foi estimada subtraindo as contagens de células do biofilme em coculturas daqueles encontrados nos controles constituídos pelas células do biofilme em monocultura.

3.4. Ensaios de autoagregação e coagregação

Os ensaios de autoagregação foram realizados com as três espécies patogênicas selecionadas e *Enterococcus faecalis* cultivadas separadamente a 35 °C durante 16-20 h

em caldo BHI. As células foram centrifugadas a 5000 x g durante 10 min e depois lavadas duas vezes em solução salina 0,1 % e ressuspensas em tampão fosfato (pH 7,2). A absorbância (600 nm) foi ajustada a $0,25 \pm 0,05$ a fim de normalizar o número de bactérias ($10^7 - 10^8$ UFC·mL⁻¹). Em seguida, as suspensões bacterianas foram incubadas sem agitação nas temperaturas 5 °C, 15 °C, 25 °C e 35 °C e monitoradas pela medida da absorbância durante diferentes tempos (0 h, 2h, 6h, 12h, 24 h). A capacidade de autoagregação foi estimada pelo cálculo da Equação 2 descrita por Collado, Meriluoto, Salminen, 2008. Em que $A_{600}(t)$ representa a absorvância da suspensão em diferentes tempos e $A_{600}(t_0)$, absorvância no tempo 0.

$$\text{Autoagregação (\%)} = 1 - \frac{(A_{600} t)}{(A_{600} t_0)} \times 100 \quad (2)$$

Para o ensaio de coagregação, a suspensão bacteriana foi preparada da mesma forma como descrito anteriormente. Volumes iguais (5,0 mL) de cada suspensão dos patógenos com *E. faecalis* foram misturados em *vortex* por 10 s e incubados sem agitação nas temperaturas 5 °C, 15 °C, 25 °C e 35 °C. As absorvâncias das coculturas foram determinadas durante diferentes tempos (0 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h). A porcentagem de coagregação foi determinada de acordo a Equação 3 abaixo descrita por Handley et al., (1987).

$$\text{Coagregação \%} = \frac{A_{600}(\text{monocultura patógeno} + \text{monocultura } E. \text{ faecalis}) / 2 - A_{600}(\text{cocultura})}{A_{600}(\text{monocultura patógeno} + \text{monocultura } E. \text{ faecalis}) / 2} \times 100 \quad (3)$$

Os ensaios de autoagregação e coagregação foram realizados em 3 repetições. As médias e desvios padrões foram calculados e interpretados por análise de variância (ANOVA) unidirecional para determinar diferenças significativas ($P < 0,05$) na porcentagem de autoagregação e coagregação. A análise de correlação foi realizada calculando o coeficiente de correlação de Pearson, foram utilizadas as porcentagens de autoagregação, coagregação e o número de células (UFC·cm⁻²) encontrados nos testes de inibição por competição, deslocamento e exclusão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sigma Plot versão 11 (Systat Software, Inc).

3.5. Cinética de inativação dos biofilmes patogênicos em monoculturas e em cocultura com *Enterococcus faecalis*

Para determinar a cinética de inativação das bactérias na forma sésil, foram formados os biofilmes de *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. enterica* em monocultura e em cocultura com *E. faecalis*. Os biofilmes foram formados em condições de temperatura de 35 °C e pH (7,2) pois é necessário um número de células aderidas em biofilmes no intervalo entre 10^6 e 10^7 UFC.cm⁻² para realizar a cinética de inativação, pois um número menor inviabilizaria a efetiva análise da cinética.

Os biofilmes foram formados em placas de 24 poços de poliestireno esterilizados. Em monocultura foram inoculados 500 µL das suspensões bacterianas em concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹ com 500 µL de caldo BHI. Para a formação dos biofilmes em cocultura foram inoculadas 500 µL das suspensões dos patógenos com 500 µL da suspensão de *E. faecalis*. As placas foram incubadas durante 48 h a 35 °C. Após, os poços foram enxaguados duas vezes com 1,0 mL de tampão PBS 0,05 mol L⁻¹, pH 6,8 a 7,2 para remoção de células não aderidas.

A cinética de inativação das células sésseis foi realizada com 200 mg·L⁻¹ de cloro residual total a partir do dicloroisocianurato de sódio ou com 1800 mg·L⁻¹ de cloreto de benzalcônio (Vetec), em temperatura ambiente (25°C) em sete tempos de contato: 3, 5, 7, 10, 15, 20 e 25 minutos. Após o tempo de contato, adicionou-se aos poços 1,0 mL de água peptonada 0,1 % contendo tiosulfato de sódio a 0,25 % para neutralizar a ação do cloro ou solução peptonada com Tween 80 a 2% para inativar o cloreto de benzalcônio. Em seguida, foram feitas diluições decimais apropriadas e 20 µL de cada diluição foram inoculadas pela técnica de microgotas em meios seletivos adequados, como descrito no item 3.3.4. As placas foram incubadas a 35 °C durante 8-12 h seguida da enumeração das bactérias. Os resultados foram expressos em UFC·cm⁻² de acordo com a Equação 1 em seguida transformados em log₁₀. O experimento foi realizado no mínimo em 3 repetições e com as médias foram construídas as curvas dos sobreviventes.

Com os dados experimentais obtidos foram ajustados ao modelo cinético utilizando o suplemento GInaFiT, versão 1.6 (Microsoft[©] Excel). O modelo bifásico proposto por Cerf (1977) foi usado para descrever as contagens dos micro-organismos sobreviventes. Este modelo é capaz de descrever curvas de sobreviventes com duas subpopulações microbianas com diferentes sensibilidades ao tratamento aplicado e está descrito na Equação 4.

$$\text{Log}_{10}(N_t) = \text{log}_{10}(N_0) + \text{log}_{10}(f \cdot \exp(-k_{max1} \cdot t) + (1 - f) \cdot \exp((-k_{max2} \cdot t))) \quad (4)$$

Em que, N_t é a população de micro-organismos (UFC·mL⁻¹) no instante t (tempo), N_0 é a população inicial do micro-organismos (UFC·mL⁻¹), f é a fração da população sensível ao tratamento, $1 - f$ é a fração da população que é resistente ao tratamento, sendo k_{max1} e k_{max2} (min⁻¹) as velocidades específicas de inativação das duas populações.

A partir dos valores de k_{max1} e k_{max2} (min⁻¹) foram calculados o valor D (Equação 5) (XIONG et al., 1999).

$$D = \frac{2.303}{k} \quad (5)$$

3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes em monocultura de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e cocultura com *Enterococcus faecalis*

Os biofilmes foram formados em cupons de poliestireno (1 cm x 1cm) previamente limpos por lavagem com detergente neutro líquido e água, enxaguados com água destilada e em seguida imersos em álcool etílico a 70% durante 1 h para remover a gordura. Os cupons foram novamente rinsados com água destilada, secos à temperatura ambiente e esterilizados por radiação ultravioleta (UV), por 20 min de cada lado. Após este procedimento, os cupons foram acondicionados em placas de 24 poços e inoculados com 1,0 mL das suspensões bacterianas em monoculturas ou 1:1 em cocultura e incubados durante 48 h na temperatura de 35 °C e pH 7,0. Os cupons foram lavados com tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 6,8 a 7,2 para remoção das células não aderidas.

A etapa de fixação foi realizada com glutaraldeído 2,5 % por duas horas a 25 °C. Em seguida, foi lavado com tampão PBS 0,05 mol L⁻¹, pH 6,8 a 7,2. A etapa da desidratação foi realizada com o tratamento seriado em etanol nas concentrações de 30 %, 50 %, 70 %, 80 % e 95 % por 10 minutos cada e três tratamentos de 10 min, em etanol 100%. Os cupons foram transferidos para o secador de ponto crítico (Balzers CPD 020) para a desidratação total. Os cupons foram, em seguida, metalizados com liga de ouro em metalizador (Quorum Q150R S) e observados no microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430, ZEISS), disponível no núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

4. Resultados e Discussão

4.1. Formação de biofilmes em cocultura e verificação da interação sinérgica entre diferentes espécies

A ocorrência de interações sinérgicas na formação de biofilmes entre os isolados foi avaliada em todas as combinações possíveis em cocultura das quatro espécies, ou seja, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* e *E. faecalis*, pelo método indireto de formação de biofilmes utilizando cristal violeta. Os dados das quatro repetições são apresentados no Anexo B e não ocorreram muitos resultados de sinergismo, pois em 144 combinações houve somente 4 efeitos sinérgicos.

Na temperatura de 15 °C em pH 8 e 9 e também a 25 °C em pH 8 a cocultura entre *Salmonella* e *Listeria*, apresentaram efeito sinérgico. Nesta interação sinérgica entre as duas espécies não é possível saber qual cepa influenciou mais neste efeito. Porém, é conhecido que estas espécies são fortes formadoras de biofilmes, devido a alta produção de EPS, além disso, Iñiguez-Moreno et al., (2018) relatam que a indução de maior formação de biofilme de *Salmonella* spp. pode ser promovida pela presença de outras bactérias. A capacidade de interações é diferente entre várias espécies, onde encontram-se cepas com capacidade competidora forte ou fraca e efeitos com sinergismos. Neste caso, houve uma interação sinérgica entre uma bactéria Gram-positiva e Gram-negativa, diferentemente no trabalho de Heir et al., (2018) houve inibição nos biofilmes de *L. monocytogenes* por de *L. innocua* e bactérias gram-negativas em culturas mistas. Por outro lado, os resultados obtidos Chen et al., (2019) mostraram que a densidade de *V. parahaemolyticus* foi maior que a de *L. monocytogenes* em biofilmes de espécies mistas concluindo que havia uma relação competitiva entre as espécies. Outro resultado sinérgico encontrado foi de *E. coli* e *E. faecalis* na temperatura de 35 °C e pH 8, em que houve maior formação de biofilme em cocultura em comparação a monocultura.

Segundo Ren et al., (2015) estas interações sinérgicas são baseadas no pressuposto de que na ausência de interações: (1) a densidade celular de biofilmes de uma única espécie e biofilmes multiespécies é igual, portanto, nenhum biofilme adicional é formado por culturas de espécies múltiplas do que por culturas de uma única espécie quando os nutrientes similares estão disponíveis, a menos que ocorram interações que causem efeitos sinérgicos, e (2) o melhor formador de biofilme domina o biofilme.

Estes efeitos sinérgicos podem não aparecer com tanta frequência, em um estudo de Røder et al., (2015) das combinações entre bactérias em coculturas houve apenas 20

% de efeitos sinérgicos. Contudo, os isolados *Psychrobacter cibarius* e *Kocuria rhizophila* foram encontrados em maior frequência nas combinações sinérgicas que outros isolados testados, assim podem indicar que uma ou mais espécies podem funcionar como uma espécie-chave coordenando ou influenciando a formação de biofilme em um ambiente.

Combinações em cocultura tais como: *L. monocytogenes* e *E. faecalis*, mostraram menor formação de biofilme do que em monoespécies (estirpe que melhor formou biofilme), sugerindo que interações competitivas ocorreram. Desta forma, são relevantes os estudos sobre as interações entre diferentes bactérias e como estas podem induzir ou promover a formação de biofilmes.

4.2. Controle da formação dos biofilmes patogênicos por interações antagônicas de *Enterococcus faecalis*

4.2.1. Competição

A capacidade das células planctônicas de *E. faecalis* em competitivamente inibir a formação de biofilme de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. enterica* é demonstrada nas Figuras 2, 3 e 4, respectivamente. Na formação de biofilme entre as coculturas observou-se que as células sésseis dos patógenos diminuíram pouco em comparação com o controle.

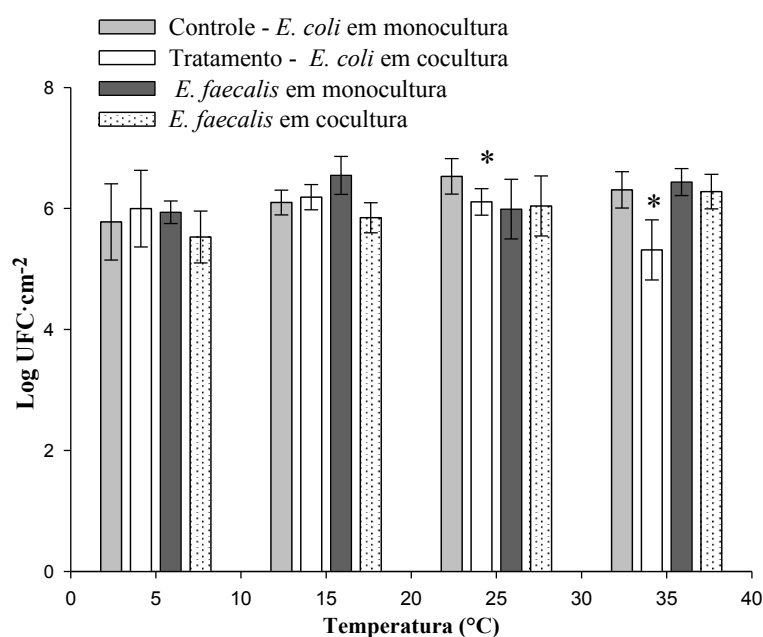


Figura 2 – Capacidade de inibição da formação dos biofilmes de *Escherichia coli* por competição com *Enterococcus faecalis*. * Indica diferenças significativas entre o controle em monocultura e tratamento em cocultura ($P < 0.05$). Os dados são os valores médios de três repetições e as barras indicam o desvio padrão médio.

Houve diferença significativa ($P < 0.05$) na formação de biofilme em cocultura de *E. coli* nas temperaturas de 35 °C (redução de 1 log) e 25 °C (redução 0,4 log) (Figura 2), nestas temperaturas, foi observado que a população do biofilme de *E. faecalis* sobrepôs em relação ao biofilme de *E. coli* e oposto ocorreu nas temperaturas de 5 °C e 15 °C demonstrando que a temperatura influenciou o efeito antagonístico. A temperatura pode eventualmente afetar a fixação do micro-organismo, o crescimento e a produção de bacteriocinas (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2018).

Um maior número de células de *E. faecalis* pode indicar uma vantagem potencial de adesão e crescimento, e isso pode ser um fator benéfico para controlar a adesão e colonização de bactérias patogênicas.

Já na competição entre *L. monocytogenes* e *E. faecalis* houve redução significativa ($P < 0.05$) de 0,8 log na temperatura de 35 °C (Figura 3). O estudo por Alonso e Kabuki, (2019) também observou uma competição natural e a dificuldade de *L. monocytogenes* em formar biofilmes em biofilmes com *E. faecium*.

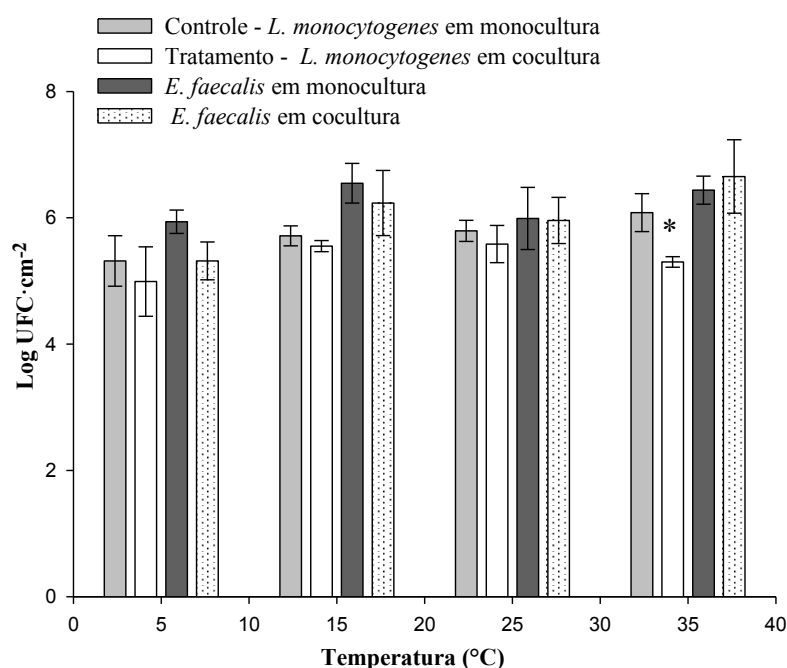


Figura 3 – Capacidade de inibição da formação dos biofilmes de *Listeria monocytogenes* por competição com *Enterococcus faecalis*. * Indica diferenças significativas entre o controle em monocultura e tratamento em cocultura ($P < 0.05$). Os dados são os valores médios de três repetições e as barras indicam o desvio padrão médio

Também, foi verificada diferença significativa ($P < 0.05$) no número de células aderidas de *S. enterica* (redução 0,4 log) quando cultivada na presença de *E. faecalis* na temperatura de 25 °C (Figura 4).

O efeito do *E. faecalis* no controle da formação dos biofilmes de patógenos foi menor quando comparados aos dados da literatura utilizando outras culturas lácticas. Em trabalho realizado por Pérez-Ibarreche et al., (2016) foi avaliado o efeito de *Lactobacillus sakei* CRL1862 produtor de bacteriocina no controle do biofilme de *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável e politetrafluoretileno (PTFE). Três condições foram simuladas para avaliar o deslocamento, exclusão e competição. Esta bactéria inibiu a formação de biofilme pelos três mecanismos com reduções máximas do patógeno em 5,54 log em PTFE e 4,52 log em aço inoxidável.

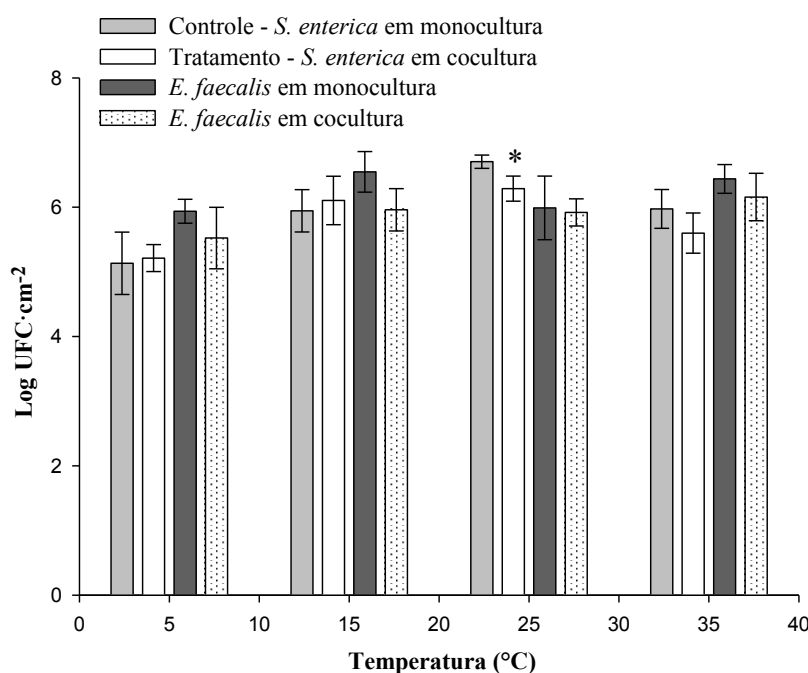


Figura 4 – Capacidade de inibição da formação dos biofilmes de *Salmonella enterica* por competição com *Enterococcus faecalis*. * Indica diferenças significativas entre o controle em monocultura e tratamento em cocultura ($P < 0.05$). Os dados são os valores médios de três repetições e as barras indicam o desvio padrão médio.

Woo e Ahn (2013) examinaram o efeito inibitório de cepas probióticas na formação de biofilmes patogênicos por meio dos mecanismos de competição, exclusão e deslocamento. *L. monocytogenes* foi mais suscetível às culturas probióticas quando comparado com *S. Typhimurim*. Os números de células do biofilme de *L. monocytogenes* durante os ensaios de competição, exclusão e deslocamento foram reduzidos em mais de 3 log quando cocultivados com *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus Rhamnosus*. Minei, et al., (2008) relataram que a formação de biofilme de *L. monocytogenes* em cupons de aço inoxidável foi reduzida em até 5,9 log por *Enterococcus faecium*. Isolados de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* também mostraram capacidade de competição anti-

listeria e as células do biofilme foram reduzidas com até 2,17 log UFC/cm² em superfície de aço inoxidável e de 1,62 log UFC/cm² em superfície de alface (HOSSAIN et al., 2020).

4.2.2. Exclusão Competitiva

O efeito inibitório de *E. faecalis* na formação de biofilmes pelo mecanismo de exclusão competitiva não foi efetivo e estatisticamente significativo para *E. coli* e *S. enterica* (Figuras 5 e 7). Talvez isso pode estar relacionado ao tempo necessário para que ocorra a exclusão, segundo Leverentz et al., (2006) o efeito inibitório dos antagonistas em patógenos de origem alimentar não são instantâneos e tornam-se aparente somente após 2 ou 5 dias, e nestes caso, o resultado apresentado é da observação em 24h. Além disso, sabe-se que as bacteriocinas são mais ativas contra bactérias Gram-positivas, em estudos revisados por Grande Burgos et al., (2014) relatam que a enterocina AS-48 em gram-negativas foram cerca de dez vezes menos sensíveis comparadas as bactérias gram-positivas, esta pouca atividade é devido a barreira da membrana externa das gram-negativas.

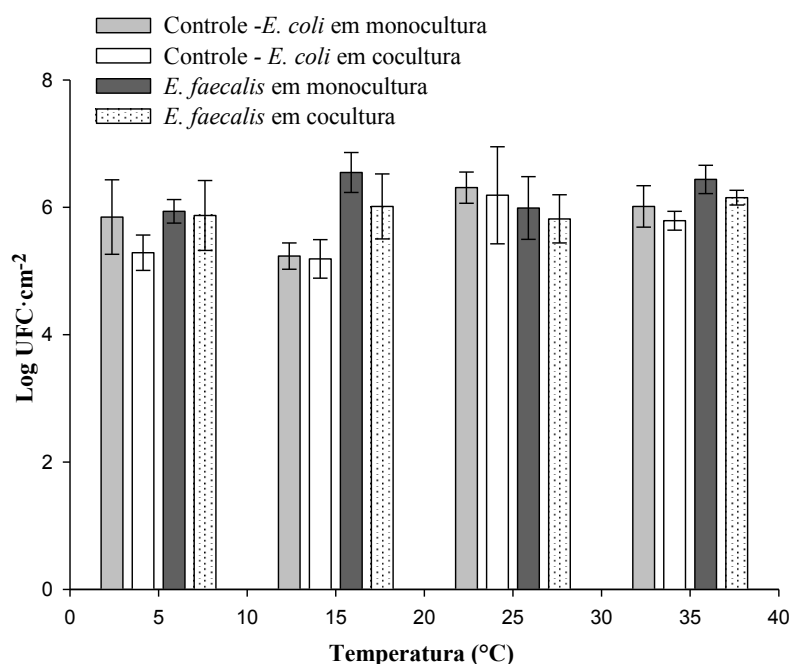


Figura 5 – Capacidade de inibição da formação dos biofilmes de *Escherichia coli* por exclusão competitiva com *Enterococcus faecalis*. * Indica diferenças significativas entre o controle em monocultura e tratamento em cocultura ($P < 0.05$). Os dados são os valores médios de três repetições e as barras indicam o desvio padrão médio.

No mecanismo de exclusão foi verificada diferenças significativas ($P < 0.05$) com reduções na formação de biofilme de *L. monocytogenes* em todas as temperaturas

testadas, mostrando que este mecanismo foi o melhor para controlar a formação de biofilme deste patógeno (Figura 6).

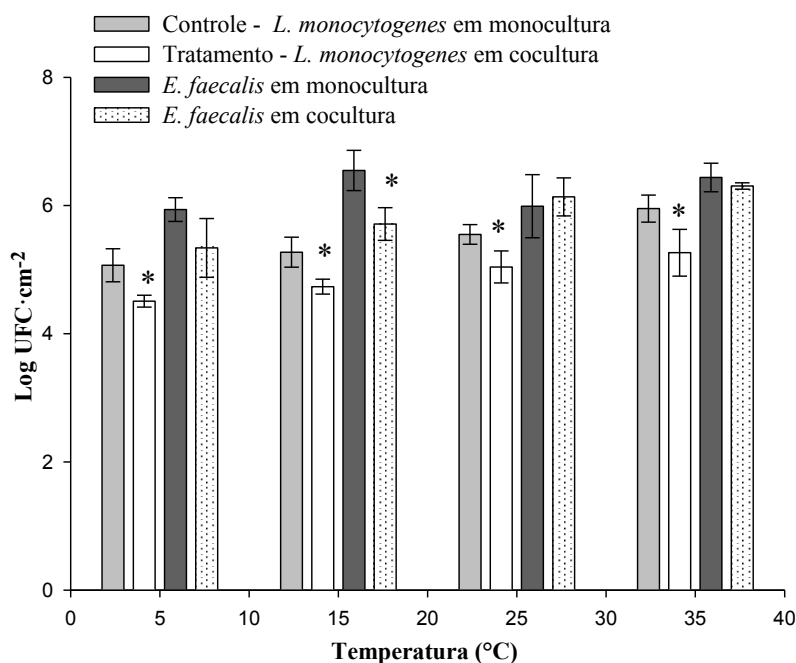


Figura 6 – Capacidade de inibição da formação dos biofilmes de *Listeria monocytogenes* por exclusão competitiva com *Enterococcus faecalis*. * Indica diferenças significativas entre o controle em monocultura e tratamento em cocultura ($P < 0.05$). Os dados são os valores médios de três repetições e as barras indicam o desvio padrão médio.

No trabalho de Guerrieri et al., (2009), *E. faecalis* JH2-2 promoveu uma redução máxima de 1 log nas células aderidas de *L. monocytogenes*. Os autores sugerem que o pequeno efeito causado por *E. faecalis* JH2-2 pode ser devido à competição entre bactérias ou a outras causas, como os mecanismos de *quorum sensing* que podem melhorar o acesso a nutrientes complexos e a defesa coletiva contra a microbiota concomitante.

No estudo realizado por Gómez et al., (2016), cepas de *Lactobacillus* produtoras e não-produtoras de bacteriocina, foram testadas para o controle de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7 e *Salmonella* Typhimurium pelo mecanismo de exclusão e, apresentaram reduções de 6 ciclos log dos patógenos quando comparado aos controles. Os autores descrevem que a inibição de bactérias patogênicas não é apenas devido à produção de bacteriocina, mas este resultado pode ser atribuído a uma combinação de fatores como biosurfactante e mecanismos de exclusão de patógenos por meio de armadilhas (morte de células embutidas em biofilmes). A exclusão competitiva foi sugerida como o

mecanismo mais eficaz em inibir a adesão de patógenos (COLLADO, MERILUOTO, SALMINEN, 2008; GARCÍA-CAYUELA et al., 2014).

A exclusão competitiva entre *L. lactis* subsp. *lactis* estirpe C-1-92, *E. durans* reduziu a formação de biofilme de *L. monocytogenes* em 3 ciclos log a 4 °C e 4,8 reduções decimais a 8 °C (ZHAO et al., 2013).

Fernandes et al., (2015), ao avaliarem a formação de biofilme de *L. monocytogenes* monoespécies e com biofilmes multiespécies de *E. faecium*, *E. faecalis* encontram uma redução significativa para *L. monocytogenes* após 4 dias de cultivo a 39 °C, foram encontrados valores de 0,4 Log UFC·cm⁻². A exclusão competitiva também foi evidenciada pelo trabalho de Kim et al., 2020 onde *Erwinia persicina* EUS78 inibiu o crescimento de *Salmonella enterica* em brotos de alfafa.

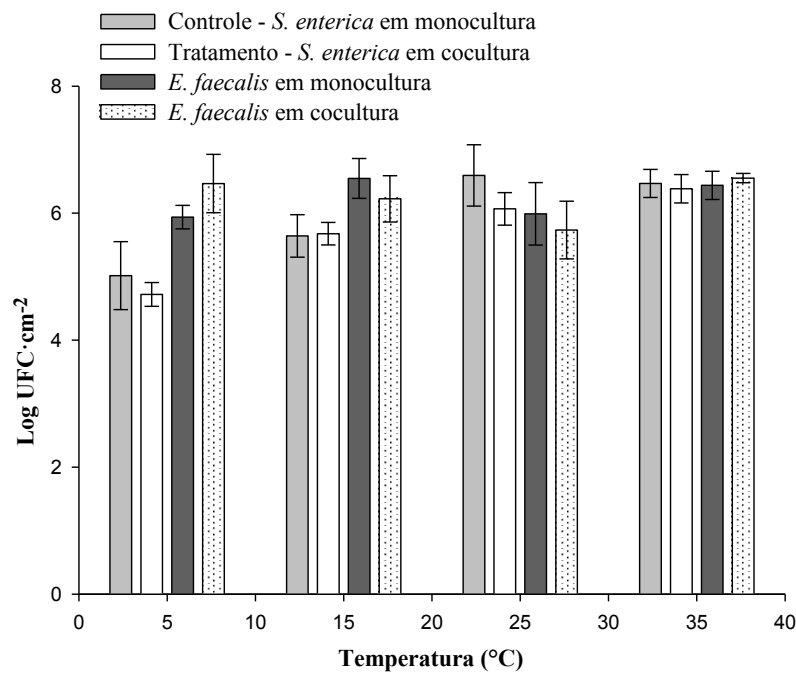


Figura 7 – Capacidade de inibição da formação dos biofilmes de *Salmonella enterica* por exclusão competitiva com *Enterococcus faecalis*. * Indica diferenças significativas entre o controle em monocultura e tratamento em cocultura ($P < 0.05$). Os dados são os valores médios de três repetições e as barras indicam o desvio padrão médio.

4.2.3. Deslocamento

No deslocamento das células patogênicas presentes no biofilme pelas células planctônicas de *E. faecalis* também houve baixa capacidade de inibição (Figuras 8, 9 e 10).

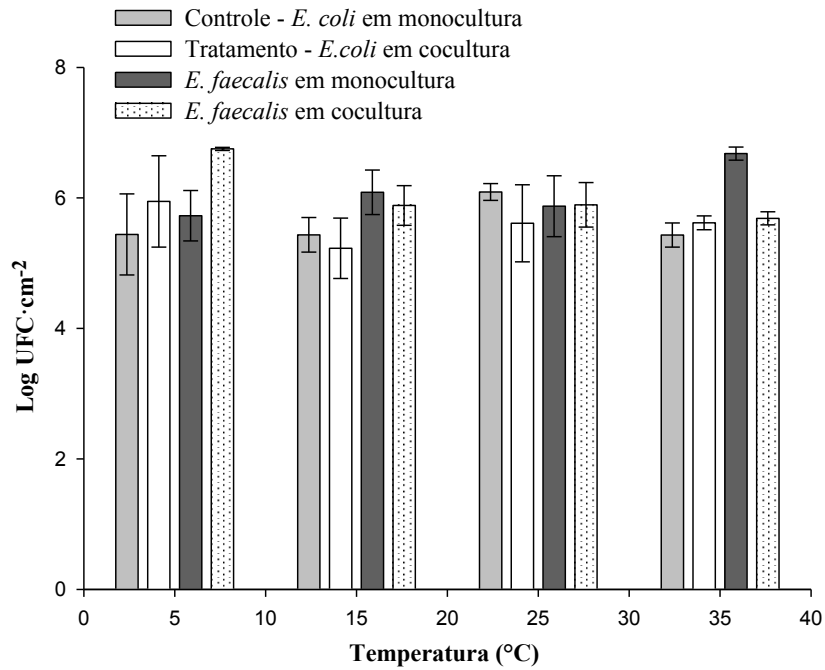


Figura 8 – Capacidade de inibição da formação dos biofilmes por deslocamento de *Escherichia coli* pela ação de *Enterococos faecalis*. * Indica diferenças significativas entre o controle em monocultura e tratamento em cocultura ($P < 0.05$). Os dados são os valores médios de três repetições e as barras indicam o desvio padrão médio.

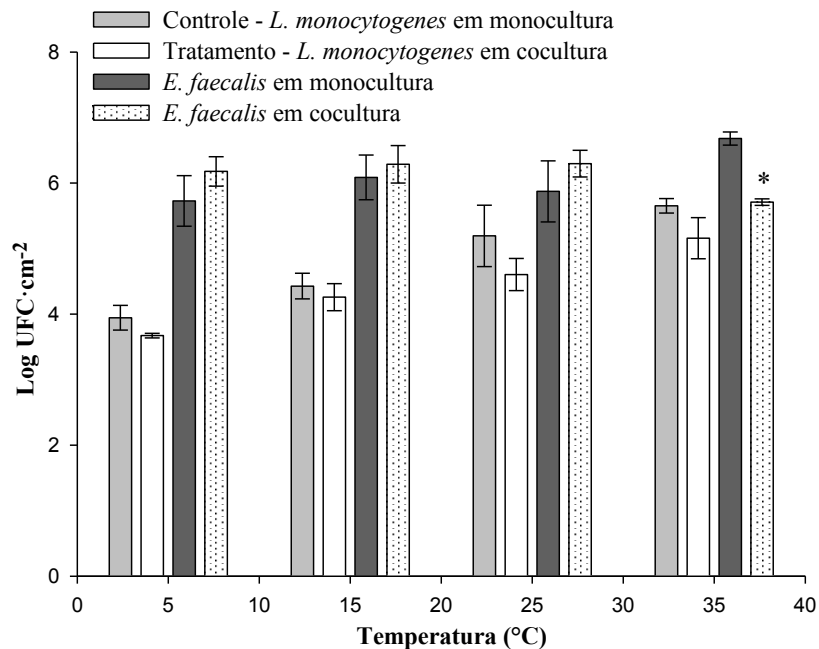


Figura 9 – Capacidade de inibição da formação dos biofilmes por deslocamento de *Listeria monocytogenes* pela ação de *Enterococos faecalis*. * Indica diferenças significativas entre o controle em monocultura e tratamento em cocultura ($P < 0.05$). Os dados são os valores médios de três repetições e as barras indicam o desvio padrão médio.

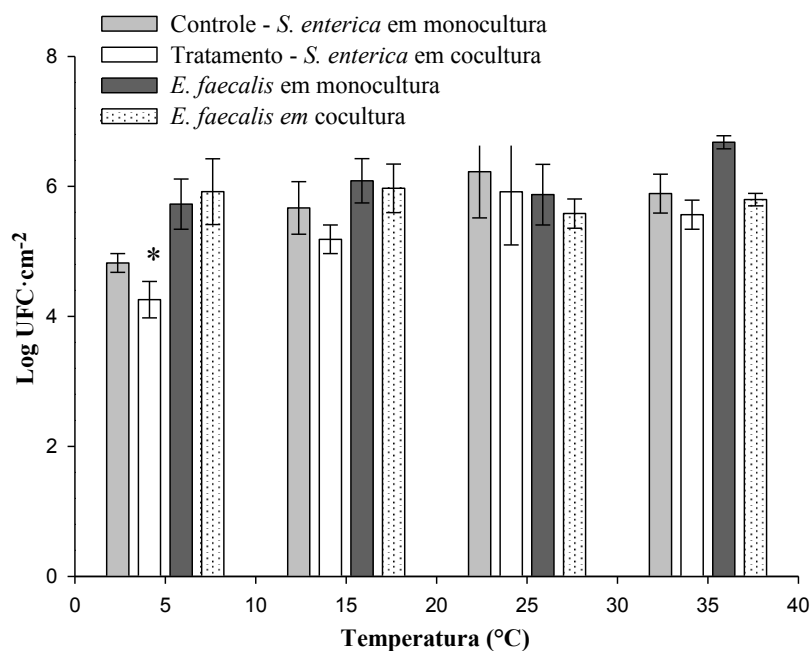


Figura 10 – Controle da formação dos biofilmes de *Salmonella enterica* por deslocamento de *Enterococcus faecalis*. * Indica diferenças significativas entre monocultura e em cocultura ($P < 0.05$). Os dados são os valores médios de três repetições e as barras de erro indicam o desvio padrão médio ($n = 3$).

Na temperatura de 5 °C, *S. enterica* foi reduzido 0,6 log com diferença significativa a $P < 0.05$ (Figura 10). Não houve diferenças significativas em nenhuma temperatura para o deslocamento do biofilme de *L. monocytogenes* e *E. coli* demonstrando que este ensaio foi menos efetivo comparado com os mecanismos de competição e exclusão, isto pode estar atribuído a uma capacidade reduzida das bacteriocinas em se difundir na matriz e atingir as células nos biofilmes, descobriu-se que a nisina age de forma bastante lenta e uma eficácia limitada contra biofilmes pré-formados de *L. monocytogenes* (IBUSQUIZA et al., 2012; GARCÍA-ALMENDÁREZ et al., 2008 apud RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2018). Isso também foi observado por Zhao; Doyle; Zhao (2004) e Zhao et al., (2006), onde o efeito mediado por probióticos foi menor no pós-tratamento (deslocamento) do que o pré-tratamento (exclusão), desta forma, agir precocemente parece ser o mais apropriado para prevenir a formação de biofilme de *L. monocytogenes*.

4.3. Ensaios de autoagregação e coagregação

A autoagregação é definida como o processo pelo qual as bactérias interagem fisicamente entre si, resultando de uma aderência entre as mesmas cepas (SORROCHE

et al., 2012; ABDEL-NOUR et al., 2014; SARAVANAN et al, 2014). A autoagregação é um processo de aglomeração reversível das células, fazendo com que elas precipitem espontaneamente no meio em que estão suspensas (DEL RE et al., 2000). Essa agregação microbiana pode ser resultado de interações de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas e excretadas pelas células microbianas (BALAKRISHNA, 2013; GÓMEZ et al., 2016).

As características de autoagregação das quatro estirpes analisadas por ensaios espectrofotométricos são mostradas na Tabela 2. Os maiores percentuais de autoagregação foram mostrados após 24 h de incubação, embora os valores de agregação tenham aumentado ao longo do tempo, de maneira dependente da temperatura. Após 2 h de incubação a 35 °C duas estirpes apresentaram maior capacidade de autoagregação e foram *E. faecalis* e *S. enterica*.

Alguns autores mostram que existe uma correlação entre a autoagregação e as capacidades de formação de biofilme, indicando que ambos os processos dependem das mesmas forças físicas adesivas (KATHARIOS-LANWERMEYER et al., 2014; STEVENS et al., 2015). Também García-Cayuela et al., (2014) demonstraram que autoagregação está fortemente relacionada à adesão. Essa relação pode ser verificada por meio de uma análise de correlação (Correlação de Person) de autoagregação e a capacidade formação de biofilme, contudo, entre as bactérias estudadas esta hipótese não apresentou um coeficiente significativo (Tabela 4), indicando que não há uma correlação positiva entre estas duas variáveis.

Tabela 4. Matriz de correlação dos coeficientes de Pearson entre autoagregação, cogregação e propriedades de adesão e inibição.

	Adesão	Inibição		
		Competição	Deslocamento	Exclusão
Autoagregação				
<i>E. faecalis</i>				
<i>E. coli</i>	0,716			
<i>L. monocytogenes</i>	0,937			
<i>S. enterica</i>	0,597			
Coagregação				
<i>E. coli/ E. faecalis</i>	-0,527	-0,184	0,850	
<i>L. monocytogenes/ E. faecalis</i>	0,380	0,963*	0,996**	
<i>S. enterica/ E. faecalis</i>	0,258	0,803	0,902	

O coeficiente de correlação mede o grau de dependência linear entre cada par de variáveis. O número de pares de valores de dados usados para calcular cada coeficiente corresponde a n = 4. Cada dado é a média de três experimentos independentes.

* ($P < 0.05$).

** ($P < 0.01$).

Tabela 2. Porcentagens e desvio padrão de autoagregação para estirpes após incubação em diferentes temperaturas.

	% Autoagregação 5 °C				% Autoagregação 15 °C			
	2 h	6 h	12 h	24 h	2 h	6 h	12 h	24 h
<i>E. faecalis</i>	3,5±0,2 ^{ba}	6,0±3,6 ^{ba}	15,4±1,3 ^{ca}	28,5±7,1 ^{aa}	5,3 ± 2,1 ^{ba}	11,1±1,7 ^{aa}	18,7±4,8 ^{aa}	27,4±6,4 ^{aa}
<i>E. coli</i>	7,5 ± 1,1 ^{ca}	12,4 ±5,4 ^{ba}	18,6±1,2 ^{ca}	24,3±5,7 ^{aa}	4,4 ± 0,7 ^{de}	10,8±1,7 ^{ce}	18,4±5,3 ^{ba}	30,5±4,4 ^{aa}
<i>L. monocytogenes</i>	5,2±3,7	11,1±3,0 ^{bc}	9,9±0,0 ^a	20,7±11 ^{aa}	3,8 ± 1,5 ^{de}	6,9 ± 1,4 ^{ce}	14,8±0,2 ^{ba}	28,4±3,3 ^{aa}
<i>S. enterica</i>	3,2± 1,0 ^{aa}	10±4,3 ^{aa}	15,4±3,2 ^{aa}	21,3±2,1 ^{aa}	9,9 ± 0,2 ^{aa}	14,9±0,5 ^{aa}	20,9±2,2 ^{aa}	31,2±5,0 ^{aa}
	% Autoagregação 25 °C				% Autoagregação 35 °C			
	2 h	6 h	12 h	24 h	2 h	6 h	12 h	24 h
<i>E. faecalis</i>	6,1±1,7 ^{aa}	12,1±4,2 ^{aa}	24,8±6,0 ^{aa}	52,3±3,6 ^{aa}	16,0±4,2 ^{aa}	26,4±2,5 ^{aa}	35,0±2,7 ^{aa}	49,7±4,2 ^{aa}
<i>E. coli</i>	9,6±3,6 ^{ca}	15,3±6,1 ^{ba}	26,5±7,2 ^{aa}	39,7±5,4 ^{aa}	13,0±1,1 ^{da}	26,5±3,6 ^{ca}	34,4±1,0 ^{ba}	53,8±3,7 ^{aa}
<i>L. monocytogenes</i>	10,1±3,3 ^a	21,3±8,9 ^{ae}	27,4±8,3 ^{ae}	35,2±3,7 ^{aa}	9,3±0,9 ^c	15,5±2,9 ^{ca}	25,0±4,0 ^{ba}	36,0±4,6 ^{aa}
<i>S. enterica</i>	5,6±2,2 ^{aa}	15,3±2,2 ^{aa}	23,8±3,0 ^{aa}	35,3±4,3 ^{aa}	19,8±1,3 ^{aa}	31,0±3,0 ^{aa}	35 ± 5,9 ^{aa}	47,1±6,8 ^{aa}

Médias e desvio padrão de três ensaios independentes.

Letras minúsculas diferentes denota diferenças entre os tempos na mesma temperatura ao nível de 5 % pelo teste de Duncan.

Letras maiúsculas diferentes denota diferenças entre temperatura nos tempos iguais na mesma ao nível de 5 % pelo teste de Duncan.

Tabela 3. Capacidade de coagregação em porcentagens (%) e desvio padrão para estirpes após 24 h de incubação em diferentes temperaturas.

	Coagregação 5 °C	Coagregação 15 °C	% Coagregação 25 °C	% Coagregação 35 °C
<i>E. coli/ E. faecalis</i>	5,3 ± 2,2 ^b	8,6 ± 1,4 ^a	14,2 ± 0,5 ^a	14,2 ± 3,4 ^a
<i>L. monocytogenes/ E. faecalis</i>	3,9 ± 0,4 ^b	5,4 ± 0,4 ^b	9,6 ± 2,1 ^b	12,7 ± 3,3 ^a
<i>S. enterica / E. faecalis</i>	3,6 ± 0,9 ^b	14,0 ± 3,8 ^b	18,8 ± 0,5 ^a	7,9 ± 1,9 ^a

Médias e desvio padrão de três ensaios independentes.

Letras diferentes na mesma linha denota diferenças significativas ao nível de 5 % pelo teste de Duncan.

É conhecido que modificações nas características físico-químicas da superfície celular afetam a adesão e a formação de biofilmes, no caso da hidrofobicidade também pode afetar a autoagregação (EKMEKCI, ASLIM, OZTURK, 2009; YOUNES et al., 2012).

A interação chamada de coagregação ocorre quando bactérias geneticamente distintas ligam-se umas às outras por meio de interações mediadas por receptores altamente específicos para formar um agregado composto estável (KOLENBRANDER et al., 2007; MALIK et al., 2003). As interações de coagregação ocorrem por meio de proteínas que estão na superfície da célula. As adesinas tipo lectina são as proteínas mais comuns e possuem receptores polissacáridos complementares na superfície celular de bactérias (KATHARIOS-LANWERMEYER et al., 2014; STEVENS et al., 2015).

O ensaio de coagregação é um método utilizado para avaliar a interação das bactérias ácido lácticas e bactérias patogênicas e selecionar probióticos. A capacidade de coagregação entre *E. faecalis* e os patógenos testados são apresentadas na Tabela 3. *E. faecalis* mostrou-se coagregado com os patógenos testados, mas a extensão da coagregação foi dependente da temperatura e do tempo de incubação, uma vez que não foram encontrados resultados de coagregação em tempo menor a 24 h.

Os resultados da taxa (%) de coagregação de *E. faecalis* e os patógenos foi menor quando comparadas a outras bactérias descritas na literatura. Por exemplo, *Enterococcus faecium* cepa FM11-2 coagregação acima de 74% com *B. cereus*, *E. coli* e *S. Typhimurium* após 24 horas de incubação a 37 °C (TATSAPORN; KORNKANOK 2020). Também, Janković et al., (2012) verificou que *L. plantarum* coagregou 41,5% com *E. coli*, e 40,5% com *S. Typhimurium* e *L. plantarum* coagregou 37,4% com *L. monocytogenes*.

É sugerido que durante a coagregação as BAL poderiam controlar o microambiente em torno dos patógenos e aumentar a concentração de substâncias inibitórias excretadas (EKMEKCI; ASLIM; OZTURK, 2009; YOUNES et al., 2012). Os possíveis mecanismos subjacentes a esses efeitos antagônicos incluem competição por sítios de adesão e nutrientes e secreção de substâncias antimicrobianas (HABIMANA et al., 2010).

A correlação entre coagregação e os mecanismos de inibição não foram significativas em *E. coli* e *S. enterica*. A exceção foi a coagregação entre *L. monocytogenes* e *E. faecalis* que apresentou correlação positiva e significativa (Tabela 4), indicando que a coagregação ajudou para efetuar na inibição dos biofilmes.

Os resultados de coagregação e a não correlação encontrados neste trabalho corroboraram com a baixa redução decimal e pouco controle da formação dos biofilmes dos patógenos verificados por três ensaios: competição, exclusão competitiva e deslocamento.

No estudo realizado por Gómez et al., (2016), cepas de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocina apresentaram resultados com altas taxas de autoagregação e coagregação. Das cepas estudadas *Lactobacillus curvatus* (estirpe MBSa3) apresentou maior coagregação com taxas de 69% com *Listeria monocytogenes* e 74,6% com *E. coli* O157: H7 e, neste caso, os biofilmes patogênicos não foram detectados (> 1 Log/poço) após o ensaio por exclusão testada em 24,48 e 72 h.

4.4. Cinética de inativação dos biofilmes patogênicos em monocultura e em cocultura com *Enterococcus faecalis*

Os principais índices para avaliação de desempenho e validação do modelo de inativação dos biofilmes patogênicos tratados com cloreto de benzalcônio e dicloroisocianurato de sódio, estão descritos na Tabela 5. Como pode ser visto, os dados experimentais se ajustaram bem ao modelo predito, com R² acima de 0,93.

Tabela 5 - Valores dos índices estatísticos, raiz média dos erros quadrados (RMSE) e coeficiente de determinação ajustado (R² aj), para o modelo aplicado às curvas de inativação dos biofilmes patogênicos, tratados com cloreto de benzalcônio e dicloroisocianurato de sódio.

<i>Escherichia coli</i>				
Sanitizantes	Monocultura		Cocultura	
	RMSE	R ² aj	RMSE	R ² aj
Cloreto de Benzalcônio 1800 mg·L ⁻¹	0,1809	0,9898	0,1727	0,9909
Dicloroisocianurato de sódio CRT: 200 mg·L ⁻¹	0,047	0,9994	0,3127	0,9810
<i>Listeria monocytogenes</i>				
Sanitizantes	Monocultura		Cocultura	
	RMSE	R ² aj	RMSE	R ² aj
Cloreto de Benzalcônio 1800 mg·L ⁻¹	0,2266	0,9763	0,3674	0,9526
Dicloroisocianurato de sódio CRT: 200 mg·L ⁻¹	0,3287	0,9645	0,3816	0,9708
<i>S. enterica</i>				
Sanitizantes	Monocultura		Cocultura	
	RMSE	R ² aj	RMSE	R ² aj
Cloreto de Benzalcônio 1800 mg·L ⁻¹	0,2158	0,9908	0,1902	0,9371
Dicloroisocianurato de sódio CRT: 200 mg·L ⁻¹	0,2388	0,9814	0,1400	0,9957

Para obtenção de um modelo matemático confiável, que represente com precisão a cinética de inativação microbiana é necessário avaliar a adequação dos modelos estimados. A precisão dos modelos foi determinada pela avaliação dos parâmetros R^2 ajustado e RMSE. O valor de R^2 próximo a 1 e um baixo valor de RMSE mais próximo de zero indica a qualidade do ajuste do modelo (PEREIRA, et al., 2020).

Os modelos cinéticos de inativação fornecem informações importantes sobre os processos de inativação microbiana durante a sanitização e podem ser utilizados para prever e melhorar a eficácia de diferentes tratamentos ou a identificação da população bacteriana mais resistente ou tolerante (adaptação a concentrações inibitórias) (TAIYE MUSTAPHA et al., 2020), além de estimar e verificar as reduções de log dos patógenos contaminantes sob ação dos sanitizantes testados (JUNEJA et al., 2015).

O modelo bifásico refere-se ao fato de que a inativação possui dois estágios ou 'fases' distintas, e assume que existem duas populações que morrem em taxas diferentes, ou seja, constantes diferentes e, por isso, difere nas suas sensibilidades ao agente letal (CORRADINI; NORMAND; PELEG, 2007). Esta ocorrência apresentou-se tanto nas curvas em monocultura e cocultura, duas frações de sobreviventes, uma mais sensível, com uma maior taxa de inativação e outra subpopulação mais resistente com menor taxa de inativação.

Para análise da cinética infere-se que quanto maiores os valores de K , mais rápida será a inativação das células ao longo de um determinado tempo (BEHNKE et al., 2011). O parâmetro cinético k_{max1} sempre é maior do que o parâmetro k_{max2} , indicando uma taxa de inativação muito alta durante os primeiros minutos dos tratamentos. Os parâmetros cinéticos k_{max1} e k_{max2} são os coeficientes da velocidade de inativação, da fração sensível e fração resistente, respectivamente. Estes são usados como indicadores e também verificar se houve ou não um aumento da resistência de uma população a um determinado sanitizante (CERF; CARPENTIER; SANDERS, 2010). Portanto, quando a cinética de inativação é descrita com uma constante de taxa k ou um tempo de redução decimal D , a modificação do parâmetro k mais baixo e, portanto, o valor D mais alto é considerada mais resistente (CERF; CARPENTIER; SANDERS, 2010). Além disso, outra forma para verificar o aumento da resistência dos sanitizantes entre uma espécie ou outra de micro-organismos é considerar o maior tempo necessário para atingir um determinado número de reduções decimais em uma determinada concentração de desinfetante (CERF; CARPENTIER; SANDERS, 2010).

4.4.1. *Escherichia coli*

As curvas de inativação dos biofilmes de *E. coli* em monocultura e em cocultura com *E. faecalis*, tratados com cloreto de benzalcônio são apresentadas na Figura 11.

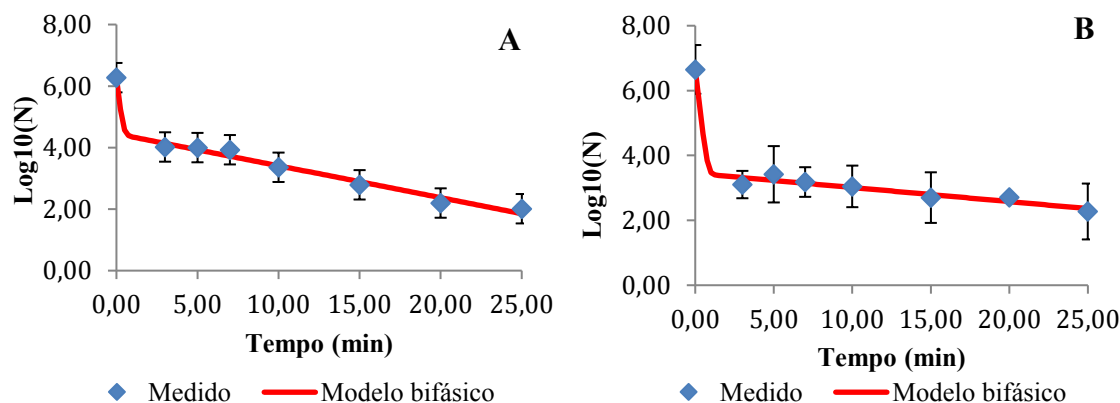


Figura 11 – Curvas de sobrevivência dos biofilmes de *Escherichia coli* em monocultura (A) e em cocultura com *Enterococcus faecalis* (B), tratados com $1800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloreto de benzalcônio. As curvas foram construídas pelas médias das contagens de três repetições.

Os parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo bifásico proposto por Cerf (1997) estão na Tabela 6. No tratamento com cloreto de benzalcônio, 98,51 % dos micro-organismos presentes no biofilme em monocultura representam a fração sensível, em cocultura com *E. faecalis* aumentou-se esta fração, passando para 99,94 %.

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos de inativação dos biofilmes de *Escherichia coli*, aderidos em poliestireno, tratados com o sanitizante cloreto de benzalcônio à $1800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Biofilme	f Fração sensível	k_{max1} (min^{-1})	D_1	k_{max2} (min^{-1})	D_2	Tempo (min) para redução de 4 ciclos log
Monocultura	0,9851	10,0	0,23	0,24	9,60	$\pm 21,0$
Cocultura	0,9994	9,25	0,25	0,10	23,0	$\pm 18,5$

k_{max1} : Velocidade específica da fração sensível

k_{max2} : Velocidade específica da fração resistente

D_1 : Valor em min para reduzir 90% da subpopulação sensível

D_2 : Valor em min para reduzir 90% da subpopulação resistente

Os parâmetros cinéticos de inativação foram obtidos a partir das médias das contagens de três repetições.

As velocidades específicas de inativação k_{max1} e k_{max2} diminuíram, mostrando uma menor velocidade de inativação das células. Assim, em análise a estes parâmetros cinéticos houve um aumento de resistência para inativação de *E. coli* em biofilmes em cocultura com *E. faecalis*, porém outras considerações devem ser analisadas para chegar

na conclusão da resistência. Na subpopulação resistente o valor D_2 em cocultura aumentou, modificando de 9,60 min em monocultura para 23,0 min, entretanto, isso parece não ter influenciado no tempo para redução de 4 ciclos log que ficou em 18,5 min em cocultura, contra 21,0 min em monocultura (Tabela 6). Essa diminuição no tempo para redução de 4 ciclos log em cocultura, provavelmente, foi devido ao aumento da fração de bactérias sensíveis (f) em cocultura e conseqüentemente redução da subpopulação resistente. Em 25 minutos de contato com o sanitizante, houve redução de 4,26 ciclos log da população em monocultura e 4,38 ciclos log em cocultura, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre as reduções. Desta forma, analisando esses outros resultados não houve aumento da resistência.

A Figura 12 apresenta as curvas de inativação dos biofilmes de *E. coli* em monocultura e cocultura com *E. faecalis*, tratados com o composto clorado, dicloroisocianurato de sódio.

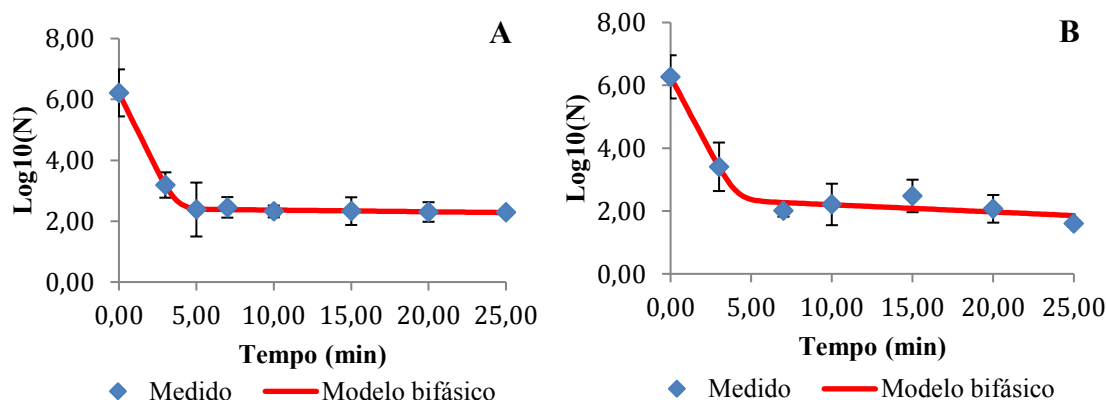


Figura 12 – Curvas de sobrevivência dos biofilmes de *Escherichia coli* em monocultura (A) e em cocultura com *Enterococcus faecalis* (B), tratados com $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de dicloroisocianurato de sódio. As curvas foram construídas pelas médias das contagens de três repetições.

A Tabela 7 apresenta os valores cinéticos de inativação de *E. coli*.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos de inativação dos biofilmes de *Escherichia coli* aderidos em poliestireno, tratados com dicloroisocianurato de sódio o sanitizante à $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Biofilme	f Fração sensível	k_{max1} (min^{-1})	D_1	k_{max2} (min^{-1})	D_2	Tempo (min) para redução de 4 ciclos log
Monocultura	0,9998	2,38	0,85	0,01	230,3	$\pm 21,75$
Cocultura	0,9999	2,23	1,0	0,05	46,0	± 7

k_{max1} : Velocidade específica da fração sensível

k_{max2} : Velocidade específica da fração resistente

D_1 : Valor em min para reduzir 90% da subpopulação sensível

D_2 : Valor em min para reduzir 90% da subpopulação resistente

Os parâmetros cinéticos de inativação foram obtidos a partir das médias das contagens de três repetições.

No tratamento com o composto clorado observou-se pelos parâmetros cinéticos de inativação (Tabela 7), que 99,98 % dos micro-organismos presentes no biofilme em monocultura foram sensíveis, passando para 99,99 % em cocultura com *E. faecalis*.

Pode-se observar (Tabela 7) uma redução considerável no tempo para reduzir 4 ciclos log do biofilme de *E. coli* em cocultura com *E. faecalis* em comparação com o biofilme de *E. coli* em monocultura. Isso pode ser explicado pelo aumento da fração sensível e também pelo aumento na velocidade específica da fração resistente (k_{max2}), que resultou em uma diminuição no valor de D_2 , que passou de 230,3 min para 46 min. Isso indica que a fração resistente ao dicloroisocianurato de sódio se tornou mais sensível em cocultura com *E. faecalis*, sendo inativada mais rapidamente. Assim, em análise aos parâmetros cinéticos não houve um aumento de resistência para inativação de *E. coli* em biofilmes em cocultura com *E. faecalis*. Também, em 25 minutos do tratamento com o sanitizante dicloroisocianurato de sódio, houve uma redução decimal (RD) de 3,91 em monocultura e 4,66 RD em cocultura com diferença significativa entre as reduções ($P < 0.05$).

Observações diferentes foram encontrados por Wang et al. (2013), em que *E. coli* em cocultura com *Salmonella* Typhimurium apresentou uma menor redução decimal nas células tratadas com cloro a 100 mg/L quando comparadas com as células em monocultura, e do mesmo modo, *Salmonella* Typhimurium se tornou mais resistente à sanitização quando presente em biofilme cocultura.

O desenvolvimento de biofilmes microbianos ocorre frequentemente nas indústrias de alimentos onde grande quantidade de nutrientes está disponível aos micro-organismos, e se não houver procedimentos corretos de higienização, certamente haverá condições favoráveis ao crescimento microbiano. A remoção completa de biofilmes nas superfícies é uma tarefa muito difícil e situações de uma inativação incompleta pode ocorrer.

Os resultados obtidos das reduções decimais das células no biofilme tanto em monocultura e cocultura em 25 minutos de tratamento mostraram que tanto o composto de amônio quaternário e clorado, nas concentrações testadas, não inativou completamente todas as células do biofilme. A cinética de inativação mostrou a existência de uma fração de bactérias mais resistente, portanto, as células que não morreram nas primeiras aplicações de sanitizante são menos suscetíveis às aplicações subsequentes. Se essas células são capazes de sobreviverem ao estresse entre duas aplicações dos sanitizantes e posteriormente crescerem, surge a persistência desta fração da população resistente ao ambiente (CERF; CARPENTIER; SANDERS, 2010).

Na definição oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), o padrão para a sanitização de superfícies em contato com alimentos é um processo que reduz o nível de contaminação em 99,999% (5 ciclos log) em 30s (PENG; TSAI; CHOU, 2002; KUAYEI, 2017). Neste trabalho, no tempo de 25 minutos de tratamento com os sanitizantes nenhum conseguiu chegar a uma redução de 5 log. Os testes para verificar a eficácia dos sanitizantes para a indústria alimentícia são realizados com células planctônicas, utilizando o teste em suspensão ou com células aderidas em aço inoxidável (método de diluição de uso) e fornecem dados das concentrações recomendadas em uso. Entretanto, a eficácia é diferente nas células sésseis e nas instalações de processamento de alimentos este modo fisiológico é esperado (BREMER; MONK; BUTLER, 2002; PENG; TSAI; CHOU, 2002). Além disso, os efeitos das interações microbianas também não são considerados, portanto, os testes usuais não simulam adequadamente as condições usuais encontradas na prática como a presença de biofilmes compostos de várias espécies e suas interações.

4.4.2. *Listeria monocytogenes*

As curvas de sobrevivência de *L. monocytogenes* em monocultura e cocultura com *E. faecalis*, ajustadas com o modelo proposto por Cerf são apresentadas na Figura 13 e os parâmetros de inativação determinados estão apresentados na Tabela 8.

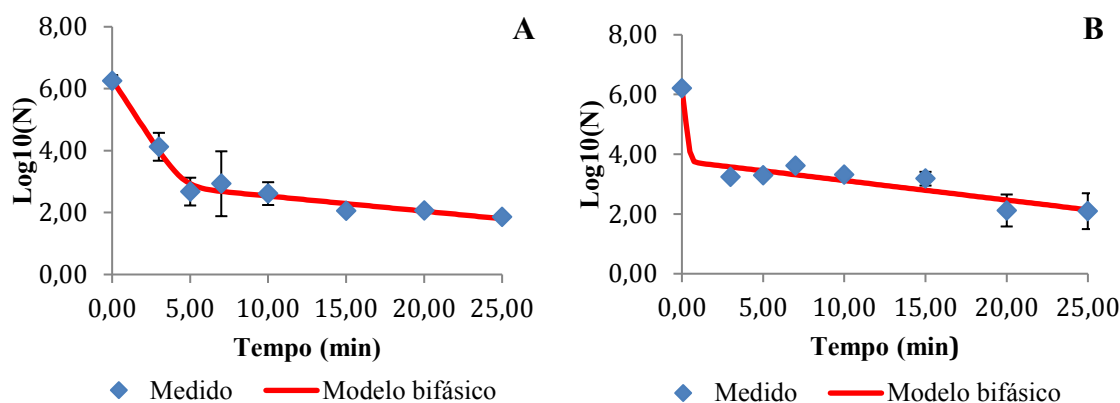


Figura 13 – Curvas de sobrevivência dos biofilmes de *Listeria monocytogenes* em monocultura (A) e cocultura com *Enterococcus faecalis* (B), tratados com 1800 mg·L⁻¹ de cloreto de benzalcônio. As curvas foram construídas pelas médias das contagens de três repetições.

No tratamento com cloreto de benzalcônio, a subpopulação sensível em monocultura era 99,95 % e em cocultura diminuiu para 99,64 % indicando que a subpopulação resistente aumentou 6 vezes.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos de inativação dos biofilmes de *Listeria monocytogenes* aderidos em poliestireno tratados com sanitizante cloreto de benzalcônio à 1800 mg·L⁻¹

Biofilme	f Fração sensível	k_{max1} (min ⁻¹)	D ₁	k_{max2} (min ⁻¹)	D ₂	Tempo (min) para redução de 4 ciclos log
Monocultura	0,9995	1,79	1,3	0,11	20,9	±15,0
Cocultura	0,9964	10,96	0,21	0,15	15,35	±24

k_{max1} : Velocidade específica da fração sensível

k_{max2} : Velocidade específica da fração resistente

D₁: Valor em min para reduzir 90% da subpopulação sensível

D₂: Valor em min para reduzir 90% da subpopulação resistente

Os parâmetros cinéticos de inativação foram obtidos a partir das médias das contagens de três repetições.

Observando a Tabela 8, as subpopulações sensível e resistente em cocultura morreram em uma velocidade maior quando comparada em monocultura pois o valor de k_{max1} e k_{max2} no biofilme em cocultura aumentou, diminuindo os valores de D. Desta forma, por estes parâmetros cinéticos não é possível confirmar um aumento da resistência ao sanitizante, pois houve aumento das velocidades de morte.

Entretanto, o tempo para reduzir 4 ciclos log de todas as populações aumentou, passando de 15 min para 24 min. Além disso, em 25 minutos de tratamento houve uma redução de 4,40 ciclos log da população em monocultura e 4,12 em cocultura, resultando de um decréscimo de 0,28 ciclos log, assim, infere-se que possivelmente houve alguma interferência na efetividade do sanitizante ou interação química ou sinérgica com a presença de *E. faecalis* na inativação dos biofilmes de *L. monocytogenes* em cocultura.

A resistência a sanitizantes pode envolver vários fatores como limitação da reação-difusão do biocida e acesso às células, a expressão de fenótipos heterogêneos, menos suscetíveis (GILBERT, et al., 2001), a produção de enzimas degradantes e químicos neutralizantes (GILBERT; MOORE, 2005) ou até mesmo a indução de bombas de efluxo não específicas como foi demonstrado na resistência de *L. monocytogenes* ao cloreto de benzalcônio (VEEN, ABBE, 2011).

Segundo Zhu et al., (2020) as interações sinérgicas em biofilmes em cocultura podem aumentar a expressão de EPS e levar a formação de um biofilme mais denso e espesso, o que limitaria a difusão de sanitizantes através da matriz do biofilme, e consequentemente maior resistência. Porém, refuta-se a hipótese de maior produção de EPS, pois de acordo com os resultados obtidos pelo ensaio de formação e interações de biofilmes em cocultura, não houve sinergismo entre as cepas nas mesmas condições de

formação de biofilme do experimento de cinética (35 °C pH 7,0) mostrados no anexo B3. Também as interações químicas entre os micro-organismos no biofilme podem produzir mudanças químicas no EPS (IÑIGUEZ-MORENO et al., 2018). Segundo Liu et al., (2017) os biofilmes mistos de *Serratia liquefaciens* e *Shewanella putrefaciens* apresentaram maior resistência ao cloreto de benzalcônio e etanol devido a diferentes composições de EPS e menor difusão no biofilme.

A hipótese para explicar os resultados de maior tempo de inativação e menor redução decimal de *L. monocytogenes* nos biofilmes em cocultura poderia ser uma menor taxa de difusão do sanitizante, ocasionado maior tempo para adentrar no biofilme e o composto quaternário inativar as células. Geralmente os biofilmes possuem carga negativa devido aos grupos funcionais dos EPS (ZHANG; NADEZHINA; WILKINSON, 2011) e os compostos de amônio quaternário devido a carga positiva podem interagir com essa camada de EPS retardando a entrada do sanitizante e inibir sua eficácia bactericida (LINEBACK et al., 2018). Além disso o tempo para entrada do composto amônio quaternário (QATs) até o centro do biofilme pode ser até 60 vezes maior (DAVISON; PITTS; STEWART, 2010).

Outra possibilidade é ocorrência de uma neutralização ou degradação do sanitizante por produtos excretados por *E. faecalis* ou até mesmo por *L. monocytogenes*, como por exemplo, enzimas ou surfactantes aniônicos que neutralizam compostos catiônicos. No entanto, as razões para embasar essas hipóteses não foram elucidadas neste estudo, seria necessário verificar o coeficiente de difusão do sanitizante dentro do biofilme em cocultura para verificar as mudanças.

Alguns autores demonstraram que biofilmes de espécies mistas de *L. monocytogenes* e *L. plantarum* são mais resistentes a tratamentos com os sanitizantes cloreto de benzalcônio e ácido peracético, quando comparado com os biofilmes de espécies isoladas, e indicaram que o crescimento em biofilmes de espécies misturadas pode fornecer um efeito protetor durante exposição dos sanitizantes utilizados (VEEN, ABBE, 2011). Ibusquiza et al., (2012), mostraram que a presença de *P. putida* em biofilmes de *L. monocytogenes* aumentaram significativamente a sua resistência ao cloreto de benzalcônio em relação à resistência dos biofilmes em monocultura. No trabalho de Haddad et al., (2021) *L. monocytogenes* foi resistente ao cloreto de benzalcônio, pois houve um aumento significativo na concentração mínima de erradicação de biofilme quando este patógeno foi cocultivado em biofilmes com *P. fluorescens*. Diferentemente, Metselaar et al., (2015), não encontraram diferenças claras na resistência ao cloreto de benzalcônio entre biofilme de *L. monocytogenes* em biofilmes

de espécies mistas com *Lactobacillus plantarum*. Também no trabalho de Pang et al., (2019) biofilmes mistos de *L. monocytogenes* formados com micro-organismos indígenas de salmão fresco, não apresentaram resistência ao sanitizante a base de amônio quaternário.

Para controlar patógenos e a microbiota deteriorante, a indústria de alimentos utiliza agentes sanitizantes, dentre os quais, o cloro é o mais amplamente utilizado devido às vantagens em termos de economia, eficácia, baixa relação custo-efetividade e uso simples (OH et al., 2014). Este composto é considerado um oxidante não seletivo que reage com vários componentes celulares e são geralmente eficazes contra uma ampla variedade de micro-organismos (CHARLEBOIS et al., 2017; OH, PARK E HA, 2014).

As curvas de sobrevivência das células tratadas com o dicloroisocianurato de sódio também foram ajustadas com o modelo proposto por Cerf e são apresentadas na Figura 14.

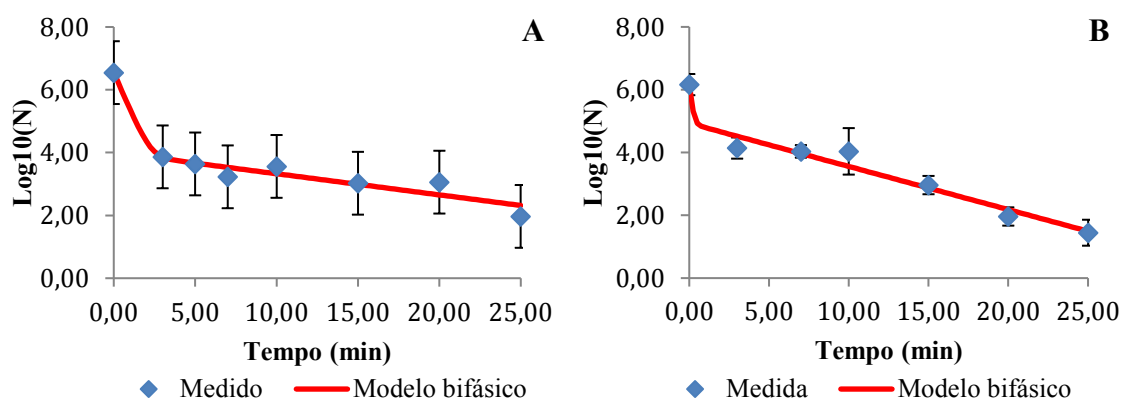


Figura 14 – Curvas de sobrevivência dos biofilmes de *Listeria monocytogenes* em monocultura (A) e cocultura com *Enterococcus faecalis* (B), tratados com 200 mg·L⁻¹ de dicloroisocianurato de sódio. As curvas foram construídas pelas médias das contagens de três repetições.

Os parâmetros de inativação determinados pelo modelo estão apresentados na Tabela 9. Na cinética de inativação dos biofilmes tratados com o composto clorado a subpopulação sensível diminuiu e a subpopulação resistente aumentou, pois a fração sensível em monocultura passou de 99,72 % para 94,15 % em cocultura, porém isto não influenciou a sensibilidade ao sanitizante, pois as constantes k_{max1} e k_{max2} aumentaram, e os valores D diminuíram em cocultura, consequentemente a velocidade de morte foi mais rápida nestas populações.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos de inativação dos biofilmes de *Listeria monocytogenes* aderidos em poliestireno tratados com o sanitizante composto clorado à 200 mg·L⁻¹

Biofilme	f Fração sensível	k_{max1} (min ⁻¹)	D ₁	k_{max2} (min ⁻¹)	D ₂	Tempo (min) para redução de 4 ciclos log
Monocultura	0,9972	2,71	0,85	0,15	15,35	±21,75
Cocultura	0,9415	9,53	0,24	0,32	7,20	±20,25

k_{max1} : Velocidade específica da fração sensível

k_{max2} : Velocidade específica da fração resistente

D₁: Valor em min para reduzir 90% da subpopulação sensível

D₂: Valor em min para reduzir 90% da subpopulação resistente

Os parâmetros cinéticos de inativação foram obtidos a partir das médias das contagens de três repetições.

Desta forma, os resultados apresentados por k_{max1} e k_{max2} , valores D₁ e D₂, além do tempo de redução de 4 ciclos log da população mostraram que não houve um aumento da resistência para inativação de *L. monocytogenes* em cocultura com *E. faecalis*, pois foram sensíveis ao tratamento com o composto clorado obtendo reduções decimais de 4,58 em monocultura e 4,71 em cocultura.

Neste caso, mesmo com o aumento da fração resistente em cocultura houve maiores reduções decimais e maior taxa na velocidade de morte. O aumento da fração resistente de *L. monocytogenes* possivelmente foi devido a resposta da competição e estresse adaptativo causados por *E. faecalis*. Segundo Alonso; Kabuki, (2019) as interações entre espécies são importantes na formação, estrutura e função das comunidades bacterianas e esses comportamentos se deve à proteção das espécies entre si ou à indução de fenótipos de tolerância específicos em resposta a competidores. Em relação ao aumento da velocidade das populações, a hipótese apresentada é que os compostos produzidos por *E. faecalis* como enterocinas e outros poderiam ter aumentado a sensibilidade ao cloro. No trabalho de Caballero Gómez et al., (2012) a combinação de enterocina AS-48 purificada potencializou a atividade de alguns biocidas como o cloreto de benzalcônio para a inativação de *Listeria* em biofilmes monocultura.

4.4.3. *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

A Figura 15 apresenta as curvas de inativação dos biofilmes de *S. enterica* em monocultura e em cocultura com *E. faecalis*, tratados com cloreto de benzalcônio. As curvas foram construídas pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo de bifásico.

A fração sensível apresenta rápido declínio a partir do ponto inicial, demonstrando a morte rápida dessa subpopulação. A segunda característica é ditada pela população mais resistente, manifestada pela formação da cauda, essa subpopulação resistente sob

circunstâncias de segurança dos alimentos é de maior preocupação, pois é inativada de forma mais lenta e dependendo do tempo de exposição ao sanitizante, pode sobreviver.

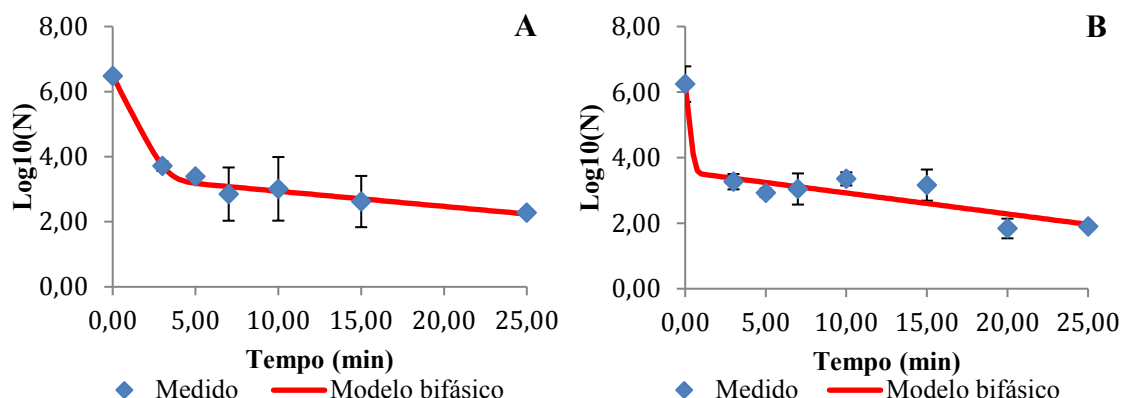


Figura 15 – Curvas de sobrevivência dos biofilmes de *Salmonella enterica* em monocultura (A) e em cocultura com *Enterococcus faecalis* (B), tratados com 1800 mg·L⁻¹ de cloreto de benzalcônio. As curvas foram construídas pelas médias das contagens de três repetições.

Como pode ser observado na Tabela 10, 99,91 % dos micro-organismos presentes no biofilme em monocultura são sensíveis ao cloreto de benzalcônio. Já no biofilme em cocultura com *E. faecalis*, a fração de bactérias sensíveis diminuiu para 99,79 %, mostrando um pequeno aumento da subpopulação resistente. Houve aumento nos valores de k_{max1} e k_{max2} e diminuição nos valores de D_1 e D_2 , no biofilme em cocultura, indicando que as duas subpopulações, sensível e resistente, foram inativadas mais rapidamente em cocultura com *E. faecalis* do que em monocultura. Entretanto, esse aumento na velocidade de inativação não diminuiu o tempo para inativar 4 ciclos log dos micro-organismos em cocultura. Isso pode ter sido causado pelo aumento da subpopulação resistente.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de inativação dos biofilmes de *Salmonella enterica* aderidos em poliestireno tratados com sanitizante cloreto de benzalcônio à 1800 mg·L⁻¹

Biofilme	f Fração sensível	k_{max1} (min ⁻¹)	D_1	k_{max2} (min ⁻¹)	D_2	Tempo (min) para redução de 4 ciclos log
Monocultura	0,9991	2,26	1,0	0,11	20,1	±20
Cocultura	0,9979	10,43	0,22	0,15	15,35	±20,75

k_{max1} : Velocidade específica da fração sensível

k_{max2} : Velocidade específica da fração resistente

D_1 : Valor em min para reduzir 90% da subpopulação sensível

D_2 : Valor em min para reduzir 90% da subpopulação resistente

Os parâmetros cinéticos de inativação foram obtidos a partir das médias das contagens de três repetições.

Em 25 minutos de tratamento houve reduções decimais de 4,2 em monocultura e 4,34 em cocultura. Assim, verifica-se pelas análises dos parâmetros cinéticos k e D e o tempo de redução de 4 ciclos log de todas as populações de acordo com as considerações descritas por Cerf; Carpentier; Sanders, (2010) que não houve aumento da resistência de *S. enterica* em cocultura com o sanitizante testado.

No trabalho de Iñiguez-Moreno et al. (2018), também não foi observado aumento da resistência ao sanitizante brometo de cetrimônio (composto quaternário de amônio) quando aplicados nos biofilmes *S. aureus* e *Salmonella* spp. formados em coculturas, neste caso, houve um efeito negativo, pois houve maior redução decimal em cocultura versus os biofilmes monoespécies.

As curvas de inativação dos biofilmes de *S. enterica* em monocultura e em cocultura com *E. faecalis*, tratados com o composto clorado, estão apresentadas na Figura 16.

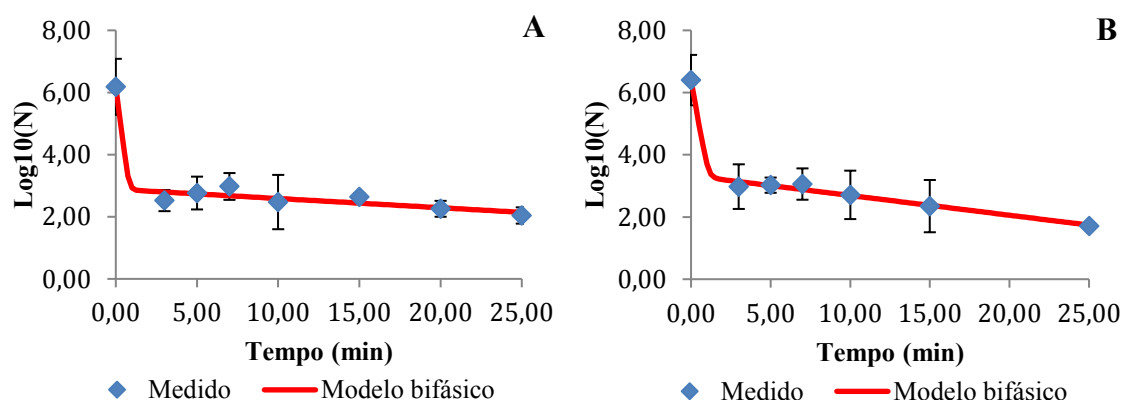


Figura 16 – Curvas de sobrevivência dos biofilmes de *Salmonella enterica* em monocultura (A) e em cocultura com *Enterococcus faecalis* (B), tratados com $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de dicloroisocianurato de sódio. As curvas foram construídas pelas médias das contagens de três repetições.

Como mostrado na Tabela 11, a população sensível passou de 99,95 % no biofilme em monocultura para 99,92 % em cocultura, ocorrendo pequena diminuição da fração sensível.

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos de inativação dos biofilmes de *S. enterica* aderidos em poliestireno tratados, tratados com dicloroisocianurato de sódio à $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Biofilme	f Fração sensível	k_{max1} (min^{-1})	D_1	k_{max2} (min^{-1})	D_2	Tempo (min) para redução de 4 ciclos log
Monocultura	0,9995	9,43	0,25	0,07	32,9	$\pm 23,75$
Cocultura	0,9992	6,65	0,34	0,15	15,35	$\pm 14,75$

k_{max1} : Velocidade específica da fração sensível

k_{max2} : Velocidade específica da fração resistente

D_1 : Valor em min para reduzir 90% da subpopulação sensível

D_2 : Valor em min para reduzir 90% da subpopulação resistente

Os parâmetros cinéticos de inativação foram obtidos a partir das médias das contagens de três repetições.

Houve também uma redução do tempo necessário em reduzir 4 ciclos log da população, passando de 23,75 min para 14,75 min. Esta redução foi devida, provavelmente, a velocidade da fração resistente que aumentou de $0,07 \text{ min}^{-1}$ em monocultura para $0,15 \text{ min}^{-1}$ em cocultura, resultando em um tempo menor de D_2 para essa população ser inativada. Em análise das reduções decimais totais houve maiores reduções em cocultura com 4,69 no tratamento com cloro em 25 minutos contra 4,14 em monocultura. Estes dados, juntamente com os parâmetros cinéticos de inativação de $k_{\max 2}$, indicam que na presença de *E. faecalis* não houve aumento de resistência de *S. enterica* ao sanitizante. Na população sensível houve uma menor velocidade de morte pois $k_{\max 1}$ diminuiu, assim nesta subpopulação houve um aumento na resistência, entretanto nos outros parâmetros isso é inverso.

Neste caso, *S. enterica* em cocultura com *E. faecalis* foi mais sensível em comparação com os biofilmes monocultura, pois apresentaram maiores reduções e um aumento na velocidade de morte ($k_{\max 2}$) das frações resistentes. Esse comportamento também foi observado em outros trabalhos, em que as bactérias se tornaram mais sensíveis em biofilmes multiespécies (TAIT, SUTHERLAND, 2002; ZHU et al., 2020)

Possíveis interações entre as cepas podem ter influenciado esses resultados com comportamento neutros ou ocorrido interações antagônicas, pois segundo Zhu et al., (2020) em estudos sobre os efeitos interespecíficos em biofilmes de duas espécies e sua resistência ao cloro o neutralismo teve efeito mínimo na resistência e a competição induziu a formação de biofilme fraco e reduziu a resistência ao cloro. Essa maior sensibilidade aos agentes sanitizantes foi observada por Tait, Sutherland, (2002) em que os biofilmes de duas espécies formados por cepas produtoras de bacteriocina exibiram uma diminuição no tamanho do biofilme e um aumento na sensibilidade aos agentes antimicrobianos hipoclorito, triclosan e cloreto de benzalcônio.

Entretanto, este comportamento pode ser diferente nos biofilmes em culturas mistas com outras espécies. No estudo de Govaert et al., (2019) a redução decimal no biofilme de duas espécies entre *Salmonella* Typhimurium e *L. monocytogenes* foi menor. Também no trabalho de Pang; Yang; Yuk, (2017) o biofilme de duas espécies formados por *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas fluorescens* apresentaram menores reduções decimais em comparação ao biofilme de espécie única de *S. Enteritidis* quando tratados com sanitizantes a base de compostos quaternários e cloro, indicando que possivelmente a presença de *P. aeruginosa* protegeu as células de *Salmonella* aos sanitizantes.

A eficiência das soluções sanitizantes é dependente da concentração, do tempo de contato, pH e da temperatura de aplicação (BREMER; MONK; BUTLER, 2002). Alguns

produtos à base de cloro são encontrados comercialmente e apresentam pH entre 9,5 e 10,5 o que proporcionam uma maior estabilidade química no armazenamento. Entretanto, os compostos clorados são mais efetivos em pH baixos, pois o ácido hipocloroso é dominante e a ação antimicrobiana está relacionada à sua liberação, este penetra nas células microbianas através da parede celular e membrana e causando danos aos componentes celular, lesões na capacidade de transporte da membrana e a geração de espécies de oxigênio ativo (YANG et al., 2018). Assim, o pH da solução clorada foi ajustado para 7,0, pois com pH mais baixo, há maior presença de ácido hipocloroso, que é a forma não dissociada com maior eficiência bacteriana e fungicida.

4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes em monocultura de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e *Enterococcus faecalis*

As imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de polietileno dos biofilmes em cocultura e monocultura encontram-se na Figura 17.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas para o biofilme em monocultura formado por *E. coli* mostram uma camada dupla das células em toda a superfície, mas sem arranjo tridimensional e o arranjo celular foi similar tanto na ausência quanto na presença de *E. faecalis* (Figura 8 A e B). Também foi visualizado a presença de EPS entre as células nos biofilmes em cocultura e monocultura, mas não houve diferença visível na quantidade de EPS. Essas imagens mostram que não houve modificações na estrutura do biofilme.

A organização espacial das células em monocultura de *L. monocytogenes* mostraram uma estrutura de adesão plana e homogênea após 48 h (Figura 8C). Em cocultura nenhuma diferença foi observada na estrutura do biofilme, da mesma forma as células apresentaram adesão plana e não foi possível diferenciar as células de *E. faecalis*.

A partir dessa hipótese que não houve modificações da adesão ou aumento de na quantidade de EPS, confirma que não houve sinergismo entre as espécies conforme os resultados apresentados no item 4.1 pois não aumentou a biomassa do biofilme em cocultura. Também confirma que, o aumento do tempo para reduzir 4 ciclos log dos biofilmes em cocultura sob ação do sanitizantes cloreto de benzalcônio não foi devido a uma maior produção de EPS em biofilmes cocultura.

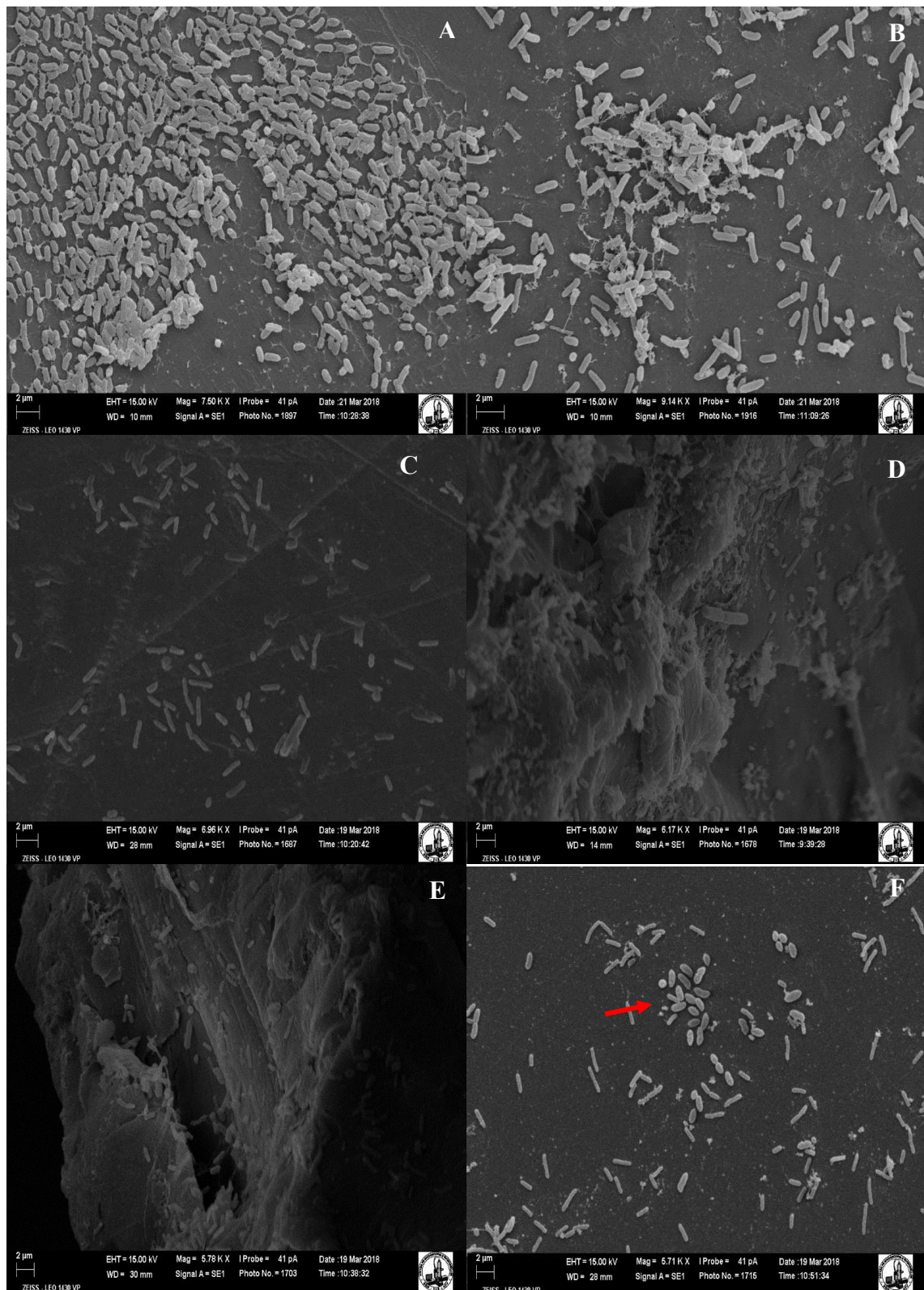


Figura 17 – Imagens por microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes de *E. coli* em monocultura (A) *E. coli* em cocultura com *E. faecalis* (B). *L. monocytogenes* em monocultura (C) *L. monocytogenes* em cocultura com *E. faecalis* (D). *Salmonella enterica* em monocultura (E) *S. enterica* e cocultura com *Enterococcus faecalis* (F). Condições de formação pH 7,2 a 35 °C.

Já Rieu et al., (2008), observou também por MEV que a associação de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em biofilmes foi diferente. Foram observados maiores bastonetes de *L. monocytogenes* (10 a 20 µm) em cocultura comparados as pequenas hastes de 2 a 4 µm encontrados em cultura pura. Ibusquiza et al., (2012), verificaram nas imagens de MEV que no biofilme formado por *L. monocytogenes* a estrutura do biofilme foi similar tanto na ausência quanto na presença de *P. putida* e que nenhuma modificação estrutural do biofilme foi observada.

Nas imagens de *S. enterica* Enteritidis é visualizado a adesão dispersas das bactérias em monocultura (Figuras 14E). A Figura 8F mostra *S. enterica* em cocultura e é possível verificar a presença nos biofilmes microcolônias de *E. faecalis* em locais específicos na superfície (seta vermelha) e *S. enterica* espalhados. Da mesma forma, não constatou mudança na arquitetura e na quantidade de EPS excretado em monocultura e cocultura, isto refletiu na inativação em monocultura e cocultura foram semelhantes.

5. Conclusão

Poucas ocorrências de efeitos sinérgicos foram encontradas na formação de biofilmes entre os isolados, em 144 combinações houve somente 4 efeitos sinérgicos. Houve sinergismo entre *S. enterica* e *L. monocytogenes* nas temperaturas de 15 °C em pH 8 e 9 e na temperatura de 25 °C em pH 8, também *E. coli* e *E. faecalis* na temperatura de 35 °C e pH 8.

E. faecalis promoveu baixas reduções decimais no controle da formação de biofilmes por bactérias patogênicas pelos três mecanismos estudados, ou seja competição, exclusão ou deslocamento, mostrando-se pouco efetivo no biocontrole dos biofilmes. No mecanismo de competição, reduções máximas foram alcançadas, *E. coli* apresentou redução decimal de 1,0 log, *L. monocytogenes* de 0,8 log em temperaturas a 35 °C e *S. enterica* redução de 0,4 log a 25 °C. Não ocorreu efeito inibitório no controle da formação de biofilme de *E. coli* e *S. enterica* pelo mecanismo de exclusão, entretanto, este mecanismo foi mais o efetivo para a redução do biofilme de *L. monocytogenes*, pois reduções decimais significativas ocorreram em todas as temperaturas. A redução máxima por exclusão competitiva de *L. monocytogenes* foi 0,7 log a 35 °C. O menor efeito inibitório de *E. faecalis* na formação de biofilme foi pelo mecanismo de deslocamento, uma vez formado os biofilmes patogênicos as células planctônicas de *E. faecalis* não foram efetivas nas reduções decimais significativa das bactérias.

A capacidade de coagregação de *E. faecalis* com os patógenos também foi baixa e, esta baixa porcentagem de coagregação (< 20%) pode indicar porque houve pouca capacidade de inibir ou diminuir a adesão desses patógenos pelos mecanismos de controle de biofilmes testados.

O modelo de Cerf permitiu uma descrição detalhada da cinética de inativação dos biofilmes de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. enterica* em monocultura ou cocultura com *E. faecalis* sob ação dos sanitizantes clorado orgânico e cloreto de benzalcônio pelo ajuste dos dados. Da mesma forma, o modelo bifásico forneceu informações sobre as taxas de inativação correspondentes às subpopulações sensíveis e resistentes e com base nas análises dos parâmetros cinéticos f , k_{max1} , k_{max2} , e valores D, além do tempo de redução de 4 ciclos log ficou claro que não houve aumento da resistência do composto clorado na inativação de todos os patógenos nos biofilmes em cocultura. Não houve um aumento de resistência para inativação de *E. coli* em biofilmes em cocultura com *E. faecalis* com tratamento cloreto de benzalcônio. Nos biofilmes de *Salmonella* em cocultura com *E. faecalis* também não apresentaram resistência ao cloreto de benzalcônio, entretanto, *Listeria* em biofilmes de espécies duplas demonstrou pelo parâmetro cinético tempo de redução de 4 ciclos log que houve um aumento da resistência ao cloreto de benzalcônio.

Estudos esclarecendo sobre o aumento da resistência em biofilmes de espécies duplas indicam a importância da composição das espécies nas interações nos biofilmes em sua resposta aos sanitizantes. Portanto, este estudo aumenta a compreensão do comportamento dos biofilmes em espécies mistas em condições encontradas no ambiente de processamento e sugere que essas interações entre esses micro-organismos tem um grande impacto na resistência ao sanitizante das células dos biofilmes.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas para o biofilme em monocultura e cocultura mostraram que não houve diferença na arquitetura dos biofilmes para as espécies estudadas.

CONCLUSÕES GERAIS

É essencial compreender os perigos e riscos associados à adesão e formação de biofilmes em superfícies que entram em contato com alimentos. Desta forma, modelos com abordagem probabilística podem ser empregados em estudos de avaliação de risco e contribuir no controle do processamento de alimentos, por isso, os modelos preditivos construídos neste estudo contribuem para a compreensão das condições que interferem a adesão e formação de biofilmes das bactérias, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* subsp. *enterica* e *E. faecalis*.

Apesar de poucos efeitos sinérgicos encontrados nos biofilmes provenientes da interação entre os pares das bactérias, o estudo é importante pois o assunto ainda é pouco compreendido e mostra que tais ocorrências podem surgir em ambientes que processam alimentos.

Verificou-se que a estirpe de *E. faecalis* isolada de leite de cabra com potencial antagonico devido à presença de genes produtores de bacteriocinas, exerceu baixas reduções decimais em relação ao controle de biofilmes de bactérias patogênicas. A baixa capacidade antagonica de *E. faecalis* em diminuir a formação de biofilmes desses patógenos foi correlacionada a pouca capacidade de coagregação.

A microbiologia preditiva também é importante na dinâmica de inativação de micro-organismos patogênicos e permite prever e otimizar o uso de sanitizantes. A cinéticas de inativação dos biofilmes patogênicos em monocultura e cocultura permitiu verificar que alguns parâmetros cinéticos são modificados devido as interações entre espécies que podem acontecer. O presente estudo apresenta uma ilustração da importância das interações entre espécies e a necessidade de avaliar a eficácia de sanitização e nortear protocolos de higienização com dados cinéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M. *et al.* Impact of growth temperature on the adhesion of colistin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from pigs to food-contact-surfaces. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 5, p. 679–690, jul. 2019.

ABDEL-NOUR, M. *et al.* The *Legionella pneumophila* collagen-like protein mediates sedimentation, autoaggregation, and pathogen-phagocyte interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1441–1454, 2014.

ACHEMCHAM, F. *et al.* Antimicrobial characterization and safety aspects of the bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* F420 isolated from Moroccan raw goat milk. **Canadian journal of microbiology**, v. 58, n. 5, p. 596–604, 2012.

ALONSO, V. P. P.; KABUKI, D. Y. Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates. **International Journal of Dairy Technology**, v. 72, n. 3, p. 472–478, 1 ago. 2019.

AL-SHABIB, N. A.; *et al.* Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 79, p. 325–332, 1 set. 2017.

AL-ZEYARA, S. A.; JARVIS, B.; MACKAY, B. M. The inhibitory effect of natural microflora of food on growth of *Listeria monocytogenes* in enrichment broths. **International journal of food microbiology**, v. 145, n. 1, p. 98–105, 31 jan. 2011.

ANDERSSON, S. *et al.* Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems. **FEMS Microbiology Letters**, v. 283, n. 1, p. 83–90, 2008.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes**. São Paulo: Varela, 2008.

ANTUNES, M. A. **Contaminação, crescimento e inativação de microrganismos na cadeia de produção de alface (*Lactuca sativa* L.) Variedade vitória de santo antão**. 2009. 200 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa-MG. 2009.

BALAKRISHNA, A. In vitro evaluation of adhesion and aggregation abilities of four potential probiotic strains isolated from guppy (*poecilia reticulata*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 5, p. 793–800, 2013.

BEHNKE, S. *et al.* Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with those of sessile biofilms and planktonic cells in single- and dual-species cultures. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7176–7184, out. 2011.

BELESSI, C-E. *et al.* Evaluation of growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* growing on stainless steel surfaces, detached from biofilms or in suspension, in response to pH and NaCl. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n.1, p. S53-S60, 2011.

- BLANA, V.; GEORGOMANOU, A.; GIAOURIS, E. Assessing biofilm formation by *Salmonella* enterica serovar Typhimurium on abiotic substrata in the presence of quorum sensing signals produced by *Hafnia alvei*. **Food Control**, v. 80, p. 83–91, 2017.
- BORGES, K. A. *et al.* Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 71–76, 1 jan. 2018.
- BRAGA, R. M.; DOURADO, M. N.; ARAÚJO, W. L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 86–98, dez. 2016.
- BREMER, P. J.; MONK, I.; BUTLER, R. Inactivation of *Listeria monocytogenes/Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 321–325, 2002.
- BRIDIER, A. *et al.* Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, v. 45, p. 167-178, 2015.
- BRIDIER, A.; BRIANDET, R, THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**. v. 27, n. 9, p. 1017–103, 2011.
- BUCHANAN, R. L.; WHITING, R.C. Concepts in Predictive Microbiology. **American Meat Science Association**. 50th Annual Reciprocal Meat Conference. v. 50, p. 93-95. 1997.
- CABALLERO GÓMEZ, N. *et al.* Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 51–58, maio 2012.
- CASTONGUAY, M. H. *et al.* Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 471–478, jun. 2006.
- CERF, O. A review. Tailing of survival curves of bacterial spores. **Journal of Applied Microbiology**, v. 42, p. 1-19, 1977.
- CERF, O.; CARPENTIER, B.; SANDERS, P. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “Resistance” has different meanings. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 247–254, 2010.
- CHEN, P. *et al.* Characterization of Mixed-Species Biofilm Formed by *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 8 nov. 2019.
- CLARKE, E. Levels of selection in biofilms: multispecies biofilms are not evolutionary individuals. **Biology {&} Philosophy**, v. 31, n. 2, p. 191–212, mar. 2016.
- COLAGIORGI, A.; *et al.* *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. **Pathogens**, v.6, n 3, p. 1-9, set. 2017.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J. SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, n. 226, p.1065–1073, 2008.

CORNFORTH, D. M.; FOSTER, K. R. Antibiotics and the art of bacterial war. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 35, p. 10827–10828, 2015.

CORNFORTH, D. M.; FOSTER, K. R. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. **Nature ReviewMicro**, v. 11, n. 4, p. 285–293, abr. 2013.

CORRADINI, M. G.; NORMAND, M. D.; PELEG, M. Modeling non-isothermal heat inactivation of microorganisms having biphasic isothermal survival curves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 391–399, 2007.

COSTA, J. C. M. *et al.* Aumento na formação de biofilmes por *Escherichia coli* em condições que mimetizam a glândula mamária mastítica. **Ciencia Rural**, v. 44, n. 4, p. 666–671, 2014.

COUGHLAN, L. M. *et al.* A. New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1641, p. 1–21, 2016.

DAS, J. K. *et al.* In vitro evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Gut pathogens**, v. 5, n. 1, p. 11, 2013.

DAVISON, W. M.; PITTS, B.; STEWART, P. S. Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 2920–2927, jul. 2010.

DEL RE, B. *et al.* Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 438–442, 2000.

DI BONAVENTURA, G. *et al.* 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, n. 6, p. 1552–1561, 2008.

DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLU, D.; LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Modelling biofilm formation of *Salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity. **Food Microbiology**, v. 53, p. 76–81, 2016.

DORTET, L.; VEIGA-CHACON, E. COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. **Encyclopedia of Microbiology**. Third Edition, Academic Press, p. 182–198, 2019.

DOYLE, M. P. Reduction by Competitive Bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* bacteria in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 4, p. 601–607, 2013.

- EKMEKCI, H.; ASLIM, B.; OZTURK, S. Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 2, p. 59–65, 2009.
- ELHARIRY, H. M. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. **Food microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1266–74, out. 2011.
- ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 990–1004, 2012.
- EVANS, M. *et al.* Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 3, p. 221–228, 1 mar. 2002.
- FAKRUDDIN, MD, *et al.* Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. **Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)**, v. 40, n. 2, p. 121-131, 2011.
- FAN, W.; HUANG, Z.; FAN, B. Effects of prolonged exposure to moderate static magnetic field and its synergistic effects with alkaline pH on *Enterococcus faecalis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 117–122, fev. 2018.
- FAN, Y. *et al.* Influence of different factors on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and the regulation of cheY gene. **Food Research International**, vol. 137, p. 109405, nov. 2020.
- FAÚLA, L. L.; SOARES, A. C.; DIAS, R. S. Panorama dos surtos de doença de transmissão alimentar (DTA) ocorridos em Minas Gerais, Brasil, no período de 2010 a 2014. **Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, v. 3, p. 84–94, 2015.
- FERNANDES, S. M. KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 5–12, 2015.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, p. 1749–1757 jun. 2009.
- FLAHAUT, S. *et al.* Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: Adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 812–814, 1997.
- FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.
- FLEMMING, H.-C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, 2016.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2ª ed. 2013.

- FOULQUIÉ MORENO, M. R. *et al.* Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 73–84, fev. 2003.
- FOX, E. M. *et al.* Phylogenetic profiles of in-house microflora in drains at a food production facility: Comparison and biocontrol implications of listeria-positive and -negative bacterial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 11, p. 3369–3374, 2014.
- GARCÍA-CAYUELA, T. *et al.* Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, n. 57, p.44-50, 2014.
- GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.
- GIAOURIS, E. *et al.* Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–14, 2013.
- GIAOURIS, E.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G. J. E. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. **Journal of food protection**, v. 68, n. 10, p. 2149–2154, 2005.
- GIAOURIS, E.; *et al.* Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 841, p. 1–26, 2015.
- GIBBS, A. C.C. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. **Journal of General Microbiology**, n.133, p.3207-3217, 1987.
- GILBERT, P. *et al.* Assessment of resistance towards biocides following the attachment of micro-organisms to, and growth on, surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 248–254, 2 ago. 2001.
- GILBERT, P.; MOORE, L. E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 703–715, 1 out. 2005.
- GOMES, L. C. *et al.* Impact of modified diamond-like carbon coatings on the spatial organization and disinfection of mixed-biofilms composed of *Escherichia coli* and *Pantoea agglomerans* industrial isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 277, p. 74–82, 2018.
- GÓMEZ, N. C. *et al.* Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. June, p. 1–15, 2016.
- GOVAERT, M. *et al.* Dual-Species Model Biofilm Consisting of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium: Development and Inactivation With Cold Atmospheric Plasma (CAP) **Frontiers in Microbiology**, 2019.

GRANDE BURGOS, M. J. *et al.* The cyclic antibacterial peptide enterocin as-48: isolation, mode of action, and possible food applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n. 12, p. 22706-22727, 2014.

GRECO, M.; POSE, G.; PARDO, A. Growth characterization and predictive behavior of *Eurotium* species in a feedstuff matrix. **Revista Argentina de Microbiología**, 2020.

GUERRIERI, E. *et al.* Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. **Food Control**, v. 20, n. 9, p. 861–865, 1 set. 2009.

GUO, A. *et al* *Ralstonia insidiosa* induces cell aggregation of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 67, p. 303–309, 2016.

HABIMANA, O. *et al.* Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* 0157: H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4557–4559, 2010.

HADDAD, S. *et al.* Variations in biofilms harbouring *Listeria monocytogenes* in dual and triplex cultures with *Pseudomonas fluorescens* and *Lactobacillus plantarum* produced under a model system of simulated meat processing conditions, and their resistance to benzalkonium chloride. **Food Control**, v. 123, p. 107720, 1 maio 2021.

HANDLEY, P. S. *et al.* Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

HEIR, E. *et al.* *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 275, p. 46–55, 2018.

HOSSAIN, M. I. *et al.* Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Listeria monocytogenes* biofilm on lettuce, stainless-steel surfaces, and MBEC™ biofilm device. **LWT**, v. 118, p. 108864, 1 jan. 2020.

HUANG, Y. *et al.* The potential influence of two *Enterococcus faecium* on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 67, p. 18–24, 2016.

IBUSQUIZA, P. S. *et al.* Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. **Food Control**, n. 25, p. 202-210.2012.

ÍÑIGUEZ-MORENO, M. GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M.; GUERRERO-MEDINA, P. J.; AVILA-NOVOA, M. G. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 310–319, abr. 2018.

JAHID, I. K. *et al.* The Paradox of mixed-species biofilms in the context of food safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 5, 2014.

JAHID, I. K.; HAN, N.; HA, S. Do. Inactivation kinetics of cold oxygen plasma depend on incubation conditions of *Aeromonas hydrophila* biofilm on lettuce. **Food Research International**, v. 55, p. 181–189, 2014.

JANKOVIĆ, T.; FRECE, J.; ABRAM, M.; GOBIN, I. Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **International Journal of Sanitary Engineering Research**, v. 6, n. 1, p. 19–24, 2012.

JUNEJA, V. K. *et al.* Modelling the effect of pH, sodium chloride and sodium pyrophosphate on the thermal resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. **Food Research International**, v. 69, p. 289–304, 2015.

KATHARIOS-LANWERMEYER, S. *et al.* Mini-review: Microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development. **Biofouling**, v. 30, n. 10, p. 1235–1251, 2014.

KAYAOGU, G.; ERTEN, H.; ØRSTAVIK, D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 6, p. 389–396, 1 jun. 2005.

KIM, W. IL; *et al.* Inhibition of *Salmonella enterica* growth by competitive exclusion during early alfalfa sprout development using a seed-dwelling *Erwinia persicina* strain EUS78. **International Journal of Food Microbiology**, v. 312, p. 108374, 2 jan. 2020.

KIM, Y.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. Development of non-pathogenic bacterial biofilms on the surface of stainless steel which are inhibitory to *Salmonella enterica*. **Food Microbiology**, v. 69, p. 136–142, 2018.

KOCOT, A. M.; OLSZEWSKA, M. A. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing. **LWT-Food Science and Technology**, v. 84, p. 47-57, out. 2017.

KOCOT, A. M.; OLSZEWSKA, M. A. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with *Listeria innocua* in dual species biofilms and inactivation following disinfectant treatments. **LWT**, v. 118, p. 108736, 2020.

KOLENBRANDER, P. E. *et al.* Human oral multi-species biofilms: bacterial communities in health and disease. **The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptations**, p. 175–194, 2007.

KUAYEI, A. Y. **Limpeza e Sanitização na Indústria de Alimentos**. Volume 4 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017.

KUMAR, A.; *et al.* Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, n. September, 2017.

LEE, J.-Y.; KANG, D.-H. Development of an improved selective medium for the detection of *Shigella* spp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 311–317, jan. 2016.

LEVERENTZ, B. *et al.* Biocontrol of the Food-Borne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Poona on fresh-cut Apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1135 LP – 1140, 1 fev. 2006.

LI, J.; MCLANDBOROUGH, L. A. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, n. 2–3, p. 185–193, 15 dez. 1999.

LI, R. *et al.* E. Control of *Listeria monocytogenes* biofilm by paenibacterin, a natural antimicrobial lipopeptide. **Food Control**, v. 84, p. 529–535, 2018.

LINEBACK, C. B. *et al.* Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 154, 2018.

LIU, W. *et al.* Low-abundant species facilitates specific spatial organisation that promotes multi-species biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 17, p. 2893–2905, 2017.

LOURENÇO, A.; MACHADO, H.; BRITO, L. Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12 °C either in pure culture or in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed reduced susceptibility to sanitizers. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 142–148, 2011.

MAFU, A. A.; PLUMETY, C.; DESCHÊNES, L.; GOULET, J. Adhesion of pathogenic bacteria to food contact surfaces: Influence of pH of culture. **International Journal of Microbiology**, v. 2011, p. 972494, 2011.

MAI, T. L.; CONNER, D. E. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 282–286, 15 Dec. 2007.

MAKOVCOVA, J. *et al.* Dynamics of mono and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and gram-negative bacteria. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 819–832, 2017.

MALIK, A. *et al.* Coaggregation between *Acinetobacter johnsonii* S35 and *Microbacterium esteraromaticum* strains isolated from sewage activated sludge. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 1, p. 10–15, 2003.

MARINHO, A. R. *et al.* Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 423–426, 2013.

METSELAAR, K. I. *et al.* Performance of stress resistant variants of *Listeria monocytogenes* in mixed species biofilms with *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 24–30, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos - VE - DTA**. Brasília: [s.n.], 2014.

MORAES, J. O. *et al.* An ordinal logistic regression approach to predict the variability on biofilm formation stages by five *Salmonella enterica* strains on polypropylene and glass surfaces as affected by pH, temperature and NaCl. **Food Microbiology**, v. 83, p. 95–103, 1 out. 2019.

MORAES, J. O. *et al.* Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 281, p. 90–100, 20 set. 2018.

MYSZKA, K.; CZACZYK, K. Bacterial biofilms on food contact surfaces - a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 61, n. 3, p. 173–180, 2011.

NADELL, C. D. *et al.* The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. e14, 2008

NGUYEN, H. D. N.; YANG, Y. S.; YUK, H. G. Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 383–388, 1 jan. 2014.

NYENJE, M. E.; GREEN, E.; NDIP, R. N. Biofilm Formation and Adherence Characteristics of *Listeria ivanovii* Strains Isolated from Ready-to-Eat Foods in Alice South Africa. **The scientific WorldJOURNAL**. v. 2012, Article ID 873909, p.1-7, 2012.

OH, S. R. *et al.* Inhibitory effect of chlorine and ultraviolet radiation on growth of *Listeria monocytogenes* in chicken breast and development of predictive growth models. **Poultry Science**, v. 93, n. 1, p. 200–207, 2014.

OH, S. R.; PARK, S. Y.; HA, S.-D. Combined effects of chlorine and thiamine dilauryl sulfate on reduction of *Listeria monocytogenes* in chicken breast and development of predictive growth models. **Poultry Science**, v. 93, n. 6, p. 1503–1510, 2014.

OLIVEIRA, A. P. *et al.* Microbiologia Preditiva. **Enciclopédia Biofesra**, v. 17, n. 9, p. 1909–1928, 2013.

OXARAN, V. *et al.* Behavior of Foodborne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Mixed-Species Biofilms Exposed to Biocides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 24, p. e02038-18, 15 dez. 2018.

PANDE, S.; SHITUT, S.; FREUND, L.; WESTERMANN, M.; BERTELS, F.; COLESIE, C.; BISCHOF, I. B.; KOST, C. Metabolic cross-feeding via intercellular nanotubes among bacteria. **Nature Communications**, v. 6, p. 6238, 2015.

PANG, X. Y.; YANG, Y. S.; YUK, H. G. Biofilm formation and disinfectant resistance of *Salmonella* sp. in mono- and dual-species with *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 651–660, 1 set. 2017.

PANG, X.; WONG, C.; CHUNG, H. J.; YUK, H. G. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and its resistance to quaternary ammonium compounds in a simulated salmon processing environment. **Food Control**, vol. 98, p. 200–208, 1 Apr. 2019.

PAPAIOANNOU, E. *et al.* Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. **International Journal of Food Microbiology**, v. 267, p. 9–19, 2018.

PENG, J.-S.; TSAI, W.-C.; CHOU, C.-C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 11–18, 2002.

PEREIRA, L. A. S. *et al.* Sanitizing cinnamaldehyde solutions against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed on stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of food technology**, v. 22, p. 1–8, 2019.

PEREIRA, M. O. *et al.* Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in whey dairy beverage processed with ohmic heating. **LWT**, v. 127, p. 109420, 2020.

PÉREZ-IBARRECHE, M.; CASTELLANO, P.; VIGNOLO, G. Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 295–303, 2014.

PÉREZ-IBARRECHE, M. *et al.* Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 12, p. 1–6, 2016.

PERIN, L. M. *et al.* Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 121–126, 2014.

PERIN, L. M.; NERO, L. A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 36, 2014.

QUINTO, E. J.; MARÍN, J. M.; SCHAFFNER, D. W. Effect of the competitive growth of *Lactobacillus sakei* MN on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in model meat gravy. **Food Control**, v. 63, p. 34–45, maio 2016.

RAN, S.; HE, Z.; LIANG, J. Survival of *Enterococcus faecalis* during alkaline stress: Changes in morphology, ultrastructure, physiochemical properties of the cell wall and specific gene transcripts. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 11, p. 1667–1676, 1 nov. 2013.

RATKOWSKY, D.A. ROSS. T. Modelling the bacterial growth/no-growth interface **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 29-33, 1995.

RE, B. DEL; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 438–442, 2000.

REN, D.; MADSEN, J. S.; SØRENSEN, S. J.; BURMØLLE, M. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. **The ISME journal**, v. 9, n. 1, p. 81–89, 2015.

- RENDUELES, O.; GHIGO, J. M. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 972–989, 2012.
- RENDUELES, O.; GHIGO, J. Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1–18, 2015.
- RIEU, A. *et al.* Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p.76–82. 2008.
- RØDER, H. L. *et al.* Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. **Food microbiology**, v. 51, p. 18–24, out. 2015.
- RØDER, H. L.; SØRENSEN, S. J.; BURMØLLE, M. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start?. **Trends in Microbiology**, v. 24, p. 503-523, jul. 2016.
- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P. *et al.* Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. **Foods**, v.7, n. 6:85, p 1-19, 2018.
- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P.; CABO, M. L. Tolerance development in *Listeria monocytogenes*-*Escherichia coli* dual-species biofilms after sublethal exposures to pronase-benzalkonium chloride combined treatments. **Food Microbiology**, v. 67, p. 58–66, 1 out. 2017.
- ROMANOVA, N. A. *et al.* Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 3, p. 231–237, 2007.
- ROSADO DE CASTRO, M. *et al.* Biofilm formation on stainless steel as a function of time and temperature and control through sanitizers. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 9–16, 1 maio 2017.
- ROSSO, L. *et al.* Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 610–616, 1995.
- ROY, P. K. *et al.* Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101209, 1 jul. 2021.
- SADOWSKA, B. *et al.* Bacteria Competing with the Adhesion and Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiologica**, v. 55, n. 5, p. 497–501, 2010.
- SALVUCCI, E.; LEBLANC, J. G.; PÉREZ, G. Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 185–191, jul. 2016.
- SARAVANAN, N. *et al.* Role of microbial aggregation in biofilm formation by bacterial strains isolated from offshore finfish culture environment. **Indian Journal of Geo-Marine sciences**, v. 43, n. November, p. 2118–2129, 2014.

SILVA, N.B.M. **Avaliação da microbiota de alface (*Lactuca sativa*) comercializada no município de Alegre-ES**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Espírito Santo-ES. 2013.

SIMÕES, M. *et al.* A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT – Food Science and Technology*, v. 43, p. 573-583, 2010.

SKOWRON, K. *et al.* Disinfectant susceptibility of biofilm formed by *Listeria monocytogenes* under selected environmental conditions. *Microorganisms*, v. 7, n. 9, p. 1–16, 2019.

SORROCHE, F. G. *et al.* A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 12, p. 4092–4101, 2012.

SOUZA, P. B. A. **Avaliação de *Listeria monocytogenes* em melão e jaboticaba**. 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa-MG. 2014.

STANCIK, L. M. *et al.* pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 184, n. 15, p. 4246–4258, 2002.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, v. 20, n. 3, p. 339–343, 1 jun. 2003.

STEVENS, M. R. E. *et al.* Coaggregation occurs between microorganisms isolated from different environments. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 91, n. 11, p. 1–14, 2015.

TAIT, K.; SUTHERLAND, I. W. Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, n. 2, p. 345–352, 1 ago. 2002.

TAIYE MUSTAPHA, A. *et al.* Kinetic modeling of inactivation of natural microbiota and *Escherichia coli* on cherry tomato treated with fixed multi-frequency sonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 64, n. 105035, p. 1-9, 2020.

TATSAPORN, T.; KORNKANOK, K. Using Potential Lactic acid bacteria biofilms and their compounds to control biofilms of foodborne pathogens. *Biotechnology Reports*, v. 26, p. e00477, 1 jun. 2020.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

VATANSEVER, C.; TURETGEN, I. Investigating the effects of different physical and chemical stress factors on microbial biofilm. *Water SA*, v. 44, n. 2, p. 308–317, 1 abr. 2018.

- VEEN, S. VAN DER; ABEE, T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 421–431, jan. 2011.
- VERMEULEN, A. et al. Modelling the influence of the inoculation level on the growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of pH, aw and acetic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p. 83–89, 2009.
- WANG, R. et al. Mixed Biofilm Formation by Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Enhanced Bacterial Resistance to Sanitization due to Extracellular Polymeric Substances. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 9, p. 1513–1522, 1 set. 2013.
- WECKWERTH, P. H. et al. In Vitro alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 5, p. 474–476, set. 2013.
- WOO, J.; AHN, J. Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 307–313, jun. 2013.
- XIONG, R. et al. A mathematical model for bacterial inactivation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p.45–55, 1999.
- YANG, X. et al. Biofilm formation and susceptibility to biocides of recurring and transient *Escherichia coli* isolated from meat fabrication equipment. **Food Control**, v. 90, p. 205–211, 2018.
- YOUNES, J. A. et al. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2012.
- ZHANG, Z.; NADEZHINA, E.; WILKINSON, K. J. Quantifying diffusion in a biofilm of *Streptococcus mutans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1075 LP – 1081, 1 mar. 2011.
- ZHAO, T. et al. Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant control of *Listeria* spp. by Competitive-Exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3314–3320, 2006.
- ZHAO, T. et al. Reduction by Competitive Bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and listeria bacteria in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 4, p. 601–607, 2013.
- ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 3996–4003, 2004.
- ZHU, Z. et al. Effects of interspecific interactions on biofilm formation potential and chlorine resistance: Evaluation of dual-species biofilm observed in drinking water distribution systems. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101564, 1 dez. 2020.

ANEXOS

ANEXO A1. Resposta da formação do biofilme de *E. coli* em função do pH e temperatura.

Repetição	pH	Temperatura	ΔDO	IFRB Eq. 6	Binário
1	4	5	0,01	0,0	0
2	4	5	-0,01	0,0	0
3	4	5	-0,01	0,0	0
4	4	5	-0,03	0,0	0
1	5	5	0,01	0,0	0
2	5	5	-0,01	0,0	0
3	5	5	0,00	0,0	0
4	5	5	-0,02	0,0	0
1	6	5	0,01	0,0	0
2	6	5	0,00	0,0	0
3	6	5	0,00	0,0	0
4	6	5	0,01	0,0	0
1	7	5	0,01	0,0	0
2	7	5	0,01	0,0	0
3	7	5	0,00	0,0	0
4	7	5	-0,02	0,0	0
1	8	5	0,03	0,0	0
2	8	5	0,05	0,1	1
3	8	5	-0,01	0,0	0
4	8	5	0,00	0,0	0
1	9	5	-0,02	0,0	0
2	9	5	0,00	0,0	0
3	9	5	-0,01	0,0	0
4	9	5	-0,01	0,0	0
1	4	15	0,00	0,0	0
2	4	15	0,07	0,1	1
3	4	15	-0,01	0,0	0
4	4	15	-0,01	0,0	0
1	5	15	0,01	0,0	0
2	5	15	0,09	0,2	1
3	5	15	0,03	0,1	1
4	5	15	0,04	0,0	0
1	6	15	-0,01	0,0	0
2	6	15	0,09	0,1	1
3	6	15	0,08	0,2	1
4	6	15	0,05	0,0	0
1	7	15	0,00	0,0	0
2	7	15	0,10	0,2	1
3	7	15	0,05	0,1	1
4	7	15	0,03	0,0	0
1	8	15	0,07	0,1	1
2	8	15	0,06	0,1	1
3	8	15	0,16	0,4	1
4	8	15	0,11	0,1	1

1	9	15	0,02	0,0	0
2	9	15	0,04	0,1	1
3	9	15	0,09	0,2	1
4	9	15	0,01	0,0	0
1	4	25	-0,01	0,0	0
2	4	25	0,06	0,1	1
3	4	25	0,02	0,1	1
4	4	25	-0,05	-0,1	0
1	5	25	0,36	0,3	1
2	5	25	0,22	0,4	1
3	5	25	0,05	0,1	1
4	5	25	0,09	0,1	1
1	6	25	0,29	0,2	1
2	6	25	0,18	0,3	1
3	6	25	0,13	0,3	1
4	6	25	0,06	0,1	1
1	7	25	0,33	0,2	1
2	7	25			
3	7	25	0,20	0,5	1
4	7	25	0,11	0,1	1
1	8	25	0,16	0,1	1
2	8	25	0,24	0,4	1
3	8	25	0,11	0,3	1
4	8	25			
1	9	25	0,32	0,2	1
2	9	25	0,20	0,3	1
3	9	25	0,08	0,2	1
4	9	25			
1	4	35	0,04	0,0	0
2	4	35	0,05	0,1	1
3	4	35	0,01	0,0	0
4	4	35	0,00	0,0	0
1	5	35	0,24	0,2	1
2	5	35	0,21	0,3	1
3	5	35	0,18	0,5	1
4	5	35	0,16	0,2	1
1	6	35	0,33	0,2	1
2	6	35	0,19	0,3	1
3	6	35	0,12	0,3	1
4	6	35	0,14	0,1	1
1	7	35	0,31	0,2	1
2	7	35	0,12	0,2	1
3	7	35	0,17	0,4	1
4	7	35	0,09	0,1	1
1	8	35	0,14	0,1	1
2	8	35	0,05	0,1	1
3	8	35	0,16	0,4	1

4	8	35	0,16	0,2	1
1	9	35	0,28	0,2	1
2	9	35	0,11	0,2	1
3	9	35	0,09	0,2	1
4	9	35	0,11	0,1	1
1	4	45	0,00	0,0	0
2	4	45	0,00	0,0	0
3	4	45	0,00	0,0	0
4	4	45			
1	5	45	0,02	0,0	0
2	5	45	0,02	0,0	0
3	5	45	0,04	0,1	1
4	5	45			
1	6	45			
2	6	45	0,03	0,0	0
3	6	45	0,05	0,1	1
4	6	45	0,02	0,0	0
1	7	45	0,03	0,0	0
2	7	45	0,01	0,0	0
3	7	45	0,05	0,1	1
4	7	45	0,01	0,0	0
1	8	45	0,09	0,1	1
2	8	45	0,02	0,0	0
3	8	45	0,02	0,0	0
4	8	45	0,06	0,1	1
1	9	45	1,41	1,0	1
2	9	45	0,61	1,0	1
3	9	45	0,40	1,0	1
4	9	45	0,97	1,0	1

ANEXO A2. Resposta da formação do biofilme de *Listeria monocytogenes* em função do pH e temperatura.

Repetição	pH	Temperatura	ΔDO	IFRB Eq. 6	Binário
1	4	5	0,02	0,1	0
2	4	5	0,00	0,0	0
3	4	5	0,00	0,0	0
4	4	5	0,03	-0,2	0
1	5	5	0,01	0,1	0
2	5	5	0,01	0,0	0
3	5	5	0,01	0,0	0
4	5	5	0,01	-0,1	0
1	6	5	0,01	0,0	0
2	6	5	0,02	0,0	0
3	6	5	0,00	0,0	0
4	6	5	0,00	0,0	0
1	7	5	0,00	0,0	0
2	7	5	0,00	0,0	0
3	7	5	0,01	0,0	0
4	7	5	0,01	-0,1	0
1	8	5	0,01	0,0	0
2	8	5	0,00	0,0	0
3	8	5	0,00	0,0	0
4	8	5	0,03	-0,2	0
1	9	5	0,00	0,0	0
2	9	5	0,00	0,0	0
3	9	5	0,01	0,0	0
4	9	5	0,03	-0,2	0
1	4	15	0,00	0,0	0
2	4	15	0,07	0,1	1
3	4	15	0,01	0,0	0
4	4	15	0,00	0,0	0
1	5	15	0,00	0,0	0
2	5	15	0,03	0,0	0
3	5	15	0,02	0,1	1
4	5	15	0,00	0,0	0
1	6	15	0,06	0,3	1
2	6	15	0,04	0,1	1
3	6	15	0,06	0,2	1
4	6	15	0,00	0,0	0
1	7	15	0,08	0,4	1
2	7	15	0,03	0,0	0
3	7	15	0,05	0,2	1
4	7	15	0,01	0,1	1
1	8	15	0,03	0,1	1
2	8	15	0,02	0,0	0
3	8	15	0,09	0,3	1
4	8	15	0,05	0,3	1

1	9	15	0,02	0,1	1
2	9	15	0,04	0,1	1
3	9	15	0,08	0,3	1
4	9	15	0,07	0,4	1
1	4	25	0,01	0,0	0
2	4	25	0,01	0,0	0
3	4	25	0,02	0,0	0
4	4	25	0,02	0,1	1
1	5	25	0,01	0,0	0
2	5	25	0,05	0,1	1
3	5	25	0,12	0,4	1
4	5	25	0,03	0,2	1
1	6	25	0,07	0,3	1
2	6	25	0,09	0,1	1
3	6	25	0,06	0,2	1
4	6	25	0,07	0,4	1
1	7	25	0,12	0,6	1
2	7	25	0,13	0,2	1
3	7	25	0,08	0,3	1
4	7	25	0,09	0,5	1
1	8	25	0,06	0,3	1
2	8	25	0,49	0,7	1
3	8	25	0,22	0,7	1
4	8	25	0,06	0,3	1
1	9	25	0,16	0,8	1
2	9	25	0,18	0,3	1
3	9	25	0,21	0,7	1
4	9	25	0,16	1,0	1
1	4	35	0,03	0,1	1
2	4	35	0,02	0,0	0
3	4	35	0,01	0,0	0
4	4	35	0,01	-0,1	0
1	5	35	0,11	0,5	1
2	5	35	0,12	0,2	1
3	5	35	0,13	0,4	1
4	5	35	0,13	0,8	1
1	6	35	0,21	1,0	1
2	6	35	0,13	0,2	1
3	6	35	0,08	0,3	1
4	6	35	0,10	0,6	1
1	7	35	0,12	0,6	1
2	7	35	0,26	0,4	1
3	7	35	0,15	0,9	1
4	7	35	0,08	0,5	1
1	8	35	0,07	0,3	1
2	8	35	0,67	1,0	1
3	8	35	0,28	0,9	1

4	8	35	0,11	0,7	1
1	9	35	0,07	0,4	1
2	9	35	0,14	0,2	1
3	9	35	0,30	1,0	1
4	9	35	.		
1	4	45	0,01	0,0	0
2	4	45	0,01	0,0	0
3	4	45	0,00	0,0	0
4	4	45	.		
1	5	45	0,03	0,2	1
2	5	45	0,03	0,0	0
3	5	45	0,05	0,2	1
4	5	45	.		
1	6	45	0,08	0,4	1
2	6	45	0,05	0,1	1
3	6	45	0,03	0,1	1
4	6	45	0,05	0,3	1
1	7	45	0,06	0,3	1
2	7	45	0,03	0,0	0
3	7	45	0,05	0,2	1
4	7	45	0,03	0,2	1
1	8	45	0,04	0,2	1
2	8	45	0,05	0,1	1
3	8	45	0,06	0,2	1
4	8	45	0,05	0,3	1
1	9	45	0,04	0,2	1
2	9	45	0,01	0,0	0
3	9	45	0,03	0,1	1
4	9	45	0,03	0,2	1

ANEXO A3. Resposta da formação do biofilme de *Salmonella* em função do pH e temperatura.

Repetição	pH	Temperatura	ΔDO	IFRB Eq. 6	Binário
1	4	5	0,01	0,0	0
2	4	5	0,00	0,0	0
3	4	5	0,00	0,0	0
4	4	5	-0,02	-0,2	0
1	5	5	0,01	0,0	0
2	5	5	-0,01	0,0	0
3	5	5	-0,01	0,0	0
4	5	5	-0,01	-0,1	0
1	6	5	0,00	0,0	0
2	6	5	0,00	0,0	0
3	6	5	0,00	0,0	0
4	6	5	0,00	0,0	0
1	7	5	-0,01	0,0	0
2	7	5	-0,01	0,0	0
3	7	5	-0,01	0,0	0
4	7	5	0,00	0,0	0
1	8	5	-0,01	0,0	0
2	8	5	0,01	0,0	0
3	8	5	-0,02	0,0	0
4	8	5	-0,02	-0,1	0
1	9	5	-0,01	0,0	0
2	9	5	0,03	0,0	0
3	9	5	-0,01	0,0	0
4	9	5	-0,02	-0,1	0
1	4	15	0,01	0,0	0
2	4	15	0,03	0,0	0
3	4	15	-0,01	0,0	0
4	4	15	0,00	0,0	0
1	5	15	0,00	0,0	0
2	5	15	0,03	0,0	0
3	5	15	0,01	0,0	0
4	5	15	0,03	0,2	1
1	6	15	0,08	0,3	1
2	6	15	0,04	0,0	0
3	6	15	0,02	0,0	0
4	6	15	0,02	0,1	1
1	7	15	0,05	0,2	1
2	7	15	0,06	0,1	1
3	7	15	0,00	0,0	0
4	7	15	0,02	0,2	1
1	8	15	0,03	0,1	1
2	8	15	0,06	0,1	1
3	8	15	0,02	0,0	0
4	8	15	0,03	0,2	1

1	9	15	0,00	0,0	0
2	9	15	0,03	0,0	0
3	9	15	-0,02	0,0	0
4	9	15	0,03	0,2	0
1	4	25	-0,01	0,0	0
2	4	25	-0,03	0,0	0
3	4	25	0,01	0,0	0
4	4	25	0,02	0,2	1
1	5	25	0,05	0,2	1
2	5	25	0,07	0,1	1
3	5	25	0,04	0,1	1
4	5	25	0,00	0,0	0
1	6	25	0,31	1,0	1
2	6	25	0,11	0,2	1
3	6	25	0,04	0,1	1
4	6	25	0,03	0,3	1
1	7	25	0,32	1,0	1
2	7	25	0,12	0,2	1
3	7	25	0,07	0,1	1
4	7	25	0,05	0,4	1
1	8	25	0,14	0,4	1
2	8	25	0,19	0,3	1
3	8	25	0,08	0,2	1
4	8	25	0,02	0,1	1
1	9	25	0,28	0,9	1
2	9	25	0,18	0,3	1
3	9	25	0,10	0,2	1
4	9	25	.		
1	4	35	0,07	0,2	1
2	4	35	0,01	0,0	0
3	4	35	-0,01	0,0	0
4	4	35	0,02	0,1	1
1	5	35	0,21	0,7	1
2	5	35	0,08	0,1	1
3	5	35	0,17	0,3	1
4	5	35	.		
1	6	35	0,27	0,9	1
2	6	35	0,11	0,2	1
3	6	35	0,09	0,2	1
4	6	35	0,05	0,4	1
1	7	35	0,21	0,6	1
2	7	35	0,12	0,2	1
3	7	35	0,08	0,1	1
4	7	35	0,04	0,3	1
1	8	35	0,08	0,3	1
2	8	35	0,10	0,1	1
3	8	35	0,16	0,3	1

4	8	35	.		
1	9	35	0,18	0,6	1
2	9	35	.		
3	9	35	0,12	0,9	1
4	9	35	.		
1	4	45	0,01	0,0	0
2	4	45	0,01	0,0	0
3	4	45	0,00	0,0	0
4	4	45	.		0
1	5	45	0,03	0,1	1
2	5	45	0,00	0,0	0
3	5	45	0,01	0,0	0
4	5	45	.		
1	6	45	0,13	0,4	1
2	6	45	0,02	0,0	0
3	6	45	0,00	0,0	0
4	6	45	0,01	0,1	1
1	7	45	0,02	0,1	1
2	7	45	0,02	0,0	0
3	7	45	0,01	0,0	0
4	7	45	0,01	0,0	0
1	8	45	0,02	0,1	1
2	8	45	0,03	0,0	0
3	8	45	0,00	0,0	0
4	8	45	0,02	0,2	1
1	9	45	.		
2	9	45	0,71	1,0	1
3	9	45	0,54	1,0	1
4	9	45	0,13	1,0	1

ANEXO A4. Resposta da formação do biofilme de *E. Faecalis* em função do pH e temperatura.

Repetição	pH	Temperatura	ΔDO	IRFB Eq. 6	Binário
1	4	5	0,01	0,0	0
2	4	5	-0,01	0,0	0
3	4	5	-0,01	0,0	0
4	4	5	-0,03	-0,1	0
1	5	5	0,02	0,0	0
2	5	5	-0,01	0,0	0
3	5	5	0,00	0,0	0
4	5	5	-0,02	-0,1	0
1	6	5	0,00	0,0	0
2	6	5	0,01	0,0	0
3	6	5	0,00	0,0	0
4	6	5	0,00	0,0	0
1	7	5	-0,01	0,0	0
2	7	5	0,00	0,0	0
3	7	5	0,00	0,0	0
4	7	5	-0,02	-0,1	0
1	8	5	0,00	0,0	0
2	8	5	0,03	0,1	1
3	8	5	0,01	0,0	0
4	8	5	-0,03	-0,1	0
1	9	5	-0,02	0,0	0
2	9	5	0,00	0,0	0
3	9	5	-0,01	0,0	0
4	9	5	-0,01	0,0	0
1	4	15	0,00	0,0	0
2	4	15	0,07	0,2	1
3	4	15	0,00	0,0	0
4	4	15	-0,01	-0,1	0
1	5	15	0,01	0,0	0
2	5	15	0,05	0,1	1
3	5	15	0,02	0,0	0
4	5	15	0,00	0,0	0
1	6	15	-0,01	0,0	0
2	6	15	0,06	0,2	1
3	6	15	0,07	0,1	1
4	6	15	0,00	0,0	0
1	7	15	0,01	0,0	0
2	7	15	0,07	0,2	1
3	7	15	0,05	0,0	0
4	7	15	0,01	0,0	0
1	8	15	0,04	0,0	0
2	8	15	0,20	0,5	1
3	8	15	0,16	0,7	1

4	8	15	0,01	0,0	0
1	9	15	0,03	0,0	0
2	9	15	0,19	0,5	1
3	9	15	0,30	0,3	1
4	9	15	0,03	0,1	1
1	4	25	-0,01	0,0	0
2	4	25	0,04	0,1	1
3	4	25	0,04	0,0	0
4	4	25	0,01	0,1	1
1	5	25	0,23	0,2	1
2	5	25	0,14	0,4	1
3	5	25	0,05	0,1	1
4	5	25	0,11	0,5	1
1	6	25	0,19	0,2	1
2	6	25	.		1
3	6	25	0,08	0,1	1
4	6	25	0,11	0,5	1
1	7	25	0,23	0,2	1
2	7	25	0,18	0,5	1
3	7	25	0,09	0,1	1
4	7	25	0,07	0,3	1
1	8	25	0,13	0,1	1
2	8	25	0,19	0,5	1
3	8	25	0,26	0,3	1
4	8	25	0,13	0,6	1
1	9	25	0,32	0,3	1
2	9	25	0,38	1,0	1
3	9	25	0,32	0,3	1
4	9	25	0,20	0,9	1
1	4	35	0,06	0,0	0
2	4	35	0,02	0,1	1
3	4	35	0,07	0,1	1
4	4	35	0,01	0,0	0
1	5	35	0,14	0,1	1
2	5	35	0,11	0,3	1
3	5	35	0,15	0,7	1
4	5	35	0,11	0,5	1
1	6	35	0,16	0,1	1
2	6	35	0,12	0,3	1
3	6	35	0,13	0,1	1
4	6	35	0,08	0,4	1
1	7	35	0,13	0,1	1
2	7	35	0,07	0,2	1
3	7	35	0,10	0,1	1
4	7	35	0,09	0,4	1
1	8	35	0,10	0,1	1
2	8	35	0,07	0,2	1

3	8	35	0,25	0,2	1
4	8	35	0,17	0,8	1
1	9	35	0,17	0,1	1
2	9	35	0,39	1,0	1
3	9	35	0,22	0,2	1
4	9	35	0,10	0,4	1
1	4	45	0,00	0,0	0
2	4	45	0,00	0,0	0
3	4	45	0,00	0,0	0
4	4	45	.		
1	5	45	0,02	0,0	0
2	5	45	0,01	0,0	0
3	5	45	0,01	0,0	0
4	5	45	.		
1	6	45	0,08	0,1	1
2	6	45	0,04	0,1	1
3	6	45	0,01	0,0	0
4	6	45	0,03	0,1	1
1	7	45	0,02	0,0	0
2	7	45	0,02	0,1	1
3	7	45	0,04	0,0	0
4	7	45	0,02	0,1	1
1	8	45	0,05	0,0	0
2	8	45	0,04	0,1	1
3	8	45	0,04	0,0	0
4	8	45	0,02	0,1	1
1	9	45	1,26	1,0	1
2	9	45	0,07	0,2	1
3	9	45	1,03	1,0	1
4	9	45	0,18	0,8	1

ANEXO B1. Valores médios da densidade óptica a 590 nm dos biofilmes formados por espécies únicas e em combinações

Temperatura 15°C																		
Monocultura/ Cocultura	pH 4			pH 5			pH 6			pH 7			pH 8			pH 9		
	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo
<i>E. faecalis</i>	0,166	0,009	-	0,155	0,012	-	0,164	0,013	-	0,176	0,018	-	0,179	0,015	-	0,198	0,028	-
<i>E. coli</i>	0,182	0,008	-	0,213	0,025	-	0,213	0,030	-	0,237	0,031	-	0,236	0,041	-	0,271	0,022	-
<i>L. monocytogenes</i>	0,218	0,003	-	0,228	0,000	-	0,205	0,016	-	0,223	0,016	-	0,223	0,004	-	0,224	0,012	-
<i>S. enterica</i>	0,173	0,018	-	0,214	0,014	-	0,209	0,042	-	0,213	0,024	-	0,218	0,034	-	0,211	0,029	-
<i>E. coli/ E. faecalis</i>	0,178	0,009	Não	0,209	0,018	Não	0,195	0,021	Não	0,181	0,026	Não	0,220	0,025	Não	0,180	0,005	Não
<i>L. monocytogenes/ E. faecalis</i>	0,198	0,021	Não	0,195	0,024	Não	0,178	0,020	Não	0,183	0,015	Não	0,209	0,008	Não	0,220	0,017	Não
<i>L. monocytogenes/ E. coli</i>	0,185	0,011	Não	0,191	0,017	Não	0,196	0,024	Não	0,183	0,009	Não	0,236	0,015	Não	0,247	0,011	Não
<i>S. enterica / E. faecalis</i>	0,168	0,007	Não	0,177	0,011	Não	0,190	0,014	Não	0,201	0,013	Não	0,248	0,022	Não	0,201	0,039	Não
<i>S. enterica / E. coli</i>	0,187	0,014	Não	0,193	0,022	Não	0,189	0,024	Não	0,207	0,025	Não	0,261	0,012	Não	0,240	0,027	Não
<i>S. enterica/ L. monocytogenes</i>	0,196	0,018	Não	0,182	0,025	Não	0,222	0,040	Não	0,190	0,001	Não	0,294	0,028	Sim	0,279	0,036	Sim

^a Ensaios para a formação de biofilmes realizados em 4 repetições.

ANEXO B2. Valores médios da densidade óptica a 590 nm dos biofilmes formados por espécies únicas e em combinações

Temperatura 25 °C																		
Monocultura/ Cocultura	pH 4			pH 5			pH 6			pH 7			pH 8			pH 9		
	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo
<i>E. faecalis</i>	0,175	0,020	-	0,175	0,013	-	0,197	0,015	-	0,199	0,012	-	0,211	0,026	-	0,199	0,025	-
<i>E. coli</i>	0,176	0,005	-	0,198	0,011	-	0,191	0,004	-	0,198	0,022	-	0,250	0,040	-	0,250	0,039	-
<i>L. monocytogenes</i>	0,216	0,024	-	0,251	0,023	-	0,243	0,025	-	0,214	0,022	-	0,307	0,071	-	0,331	0,067	-
<i>S. enterica</i>	0,175	0,013	-	0,200	0,005	-	0,345	0,027	-	0,351	0,027	-	0,329	0,002	-	0,295	0,015	-
<i>E. coli/ E. faecalis</i>	0,164	0,019	Não	0,193	0,015	Não	0,189	0,012	Não	0,205	0,010	Não	0,251	0,019	Não	0,193	0,020	Não
<i>L. monocytogenes/ E. faecalis</i>	0,204	0,027	Não	0,204	0,017	Não	0,191	0,004	Não	0,197	0,024	Não	0,236	0,025	Não	0,206	0,013	Não
<i>L. monocytogenes/ E. coli</i>	0,175	0,022	Não	0,190	0,022	Não	0,228	0,024	Não	0,225	0,021	Não	0,312	0,036	Não	0,298	0,040	Não
<i>S. enterica / E. faecalis</i>	0,175	0,028	Não	0,191	0,006	Não	0,279	0,014	Não	0,239	0,031	Não	0,302	0,037	Não	0,293	0,053	Não
<i>S. enterica / E. coli</i>	0,185	0,029	Não	0,207	0,016	Não	0,293	0,012	Não	0,288	0,024	Não	0,328	0,015	Não	0,265	0,047	Não
<i>S. enterica/ L. monocytogenes</i>	0,203	0,028	Não	0,228	0,035	Não	0,351	0,035	Não	0,375	0,009	Não	0,533	0,134	Sim	0,368	0,026	Não

^a Ensaios para a formação de biofilmes realizados em 4 repetições.

ANEXO B3. Valores médios da densidade óptica a 590 nm dos biofilmes formados por espécies únicas e em combinações

Temperatura 35°C																		
Monocultura/ Cocultura	pH 4			pH 5			pH 6			pH 7			pH 8			pH 9		
	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo
<i>E. faecalis</i>	0,160	0,011	-	0,172	0,013	-	0,179	0,030	-	0,176	0,019	-	0,214	0,050	-	0,214	0,039	-
<i>E. coli</i>	0,180	0,018	-	0,199	0,023	-	0,211	0,045	-	0,221	0,017	-	0,214	0,023	-	0,231	0,029	-
<i>L. monocytogenes</i>	0,283	0,025	-	0,251	0,032	-	0,325	0,048	-	0,231	0,035	-	0,329	0,024	-	0,368	0,038	-
<i>S. enterica</i>	0,201	0,019	-	0,209	0,021	-	0,418	0,060	-	0,562	0,100	-	0,782	0,089	-	0,462	0,038	-
<i>E. coli</i> / <i>E. faecalis</i>	0,183	0,010	Não	0,187	0,008	Não	0,182	0,024	Não	0,228	0,018	Não	0,269	0,017	Sim	0,229	0,030	Não
<i>L. monocytogenes</i> / <i>E. faecalis</i>	0,261	0,008	Não	0,213	0,020	Não	0,217	0,019	Não	0,217	0,018	Não	0,261	0,042	Não	0,244	0,044	Não
<i>L. monocytogenes</i> / <i>E. coli</i>	0,220	0,006	Não	0,219	0,010	Não	0,268	0,045	Não	0,247	0,026	Não	0,263	0,016	Não	0,293	0,017	Não
<i>S. enterica</i> / <i>E. faecalis</i>	0,193	0,012	Não	0,202	0,013	Não	0,416	0,076	Não	0,385	0,056	Não	0,393	0,000	Não	0,366	0,072	Não
<i>S. enterica</i> / <i>E. coli</i>	0,196	0,011	Não	0,249	0,037	Não	0,388	0,037	Não	0,374	0,087	Não	0,416	0,110	Não	0,463	0,084	Não
<i>S. enterica</i> / <i>L. monocytogenes</i>	0,245	0,019	Não	0,298	0,035	Não	0,489	0,109	Não	0,424	0,016	Não	0,485	0,016	Não	0,473	0,036	Não

^a Ensaios para a formação de biofilmes realizados em 4 repetições.

ANEXO B4. Valores médios da densidade óptica a 590 nm e desvio padrão dos biofilmes formados por espécies únicas e em combinações

Temperatura 45°C																		
Monocultura/ Cocultura	pH 4			pH 5			pH 6			pH 7			pH 8			pH 9		
	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo	Média do Biofilme ^a	Desvio Padrão	Sinergismo
<i>E. faecalis</i>	0,125	0,007	-	0,131	0,011	-	0,176	0,012	-	0,199	0,023	-	0,199	0,031	-	0,208	0,018	-
<i>E. coli</i>	0,144	0,014	-	0,168	0,023	-	0,181	0,011	-	0,198	0,003	-	0,203	0,014	-	0,225	0,025	-
<i>L. monocytogenes</i>	0,233	0,020	-	0,256	0,029	-	0,251	0,010	-	0,260	0,022	-	0,308	0,014	-	0,204	0,038	-
<i>S. enterica</i>	0,154	0,014	-	0,178	0,028	-	0,288	0,074	-	0,251	0,044	-	0,225	0,016	-	0,229	0,020	-
<i>E. coli</i> / <i>E. faecalis</i>	0,161	0,026	Não	0,166	0,019	Não	0,189	0,007	Não	0,208	0,005	Não	0,202	0,012	Não	0,219	0,029	Não
<i>L. monocytogenes</i> / <i>E. faecalis</i>	0,206	0,026	Não	0,213	0,028	Não	0,238	0,009	Não	0,243	0,005	Não	0,215	0,005	Não	0,257	0,026	Não
<i>L. monocytogenes</i> / <i>E. coli</i>	0,207	0,020	Não	0,196	0,001	Não	0,250	0,014	Não	0,242	0,017	Não	0,225	0,010	Não	0,241	0,034	Não
<i>S. enterica</i> / <i>E. faecalis</i>	0,159	0,004	Não	0,170	0,011	Não	0,258	0,045	Não	0,214	0,019	Não	0,211	0,011	Não	0,205	0,018	Não
<i>S. enterica</i> / <i>E. coli</i>	0,161	0,015	Não	0,178	0,011	Não	0,229	0,020	Não	0,219	0,020	Não	0,232	0,011	Não	0,232	0,016	Não
<i>S. enterica</i> / <i>L. monocytogenes</i>	0,255	0,006	Não	0,196	0,015	Não	0,270	0,034	Não	0,271	0,057	Não	0,256	0,41	Não	0,266	0,030	Não

^a Ensaios para a formação de biofilmes realizados em 4 repetições.