

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA ECOLOGIA MICROBIANA, *Listeria monocytogenes*
E *Salmonella* sp. EM INDÚSTRIAS DE PROCESSAMENTO DE
ALIMENTOS, FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES E
MÉTODOS DE CONTROLE**

LEONARDO ERENO TADIELO

Botucatu – SP
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA ECOLOGIA MICROBIANA, *Listeria monocytogenes*
E *Salmonella* sp. EM INDÚSTRIAS DE PROCESSAMENTO DE
ALIMENTOS, FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES E
MÉTODOS DE CONTROLE**

LEONARDO ERENO TADIELO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira
Pinto

Co-Orientadores: Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira
e Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Tadielo, Leonardo Ereno.

Avaliação da ecologia microbiana, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.* em indústrias de processamento de alimentos, formação de biofilmes multiespécies e métodos de controle / Leonardo Ereno Tadielo. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Coorientador: Juliano Gonçalves Pereira

Coorientador: Luciano dos Santos Bersot

Capes: 50505009

1. Biofilmes. 2. Contaminação (Tecnologia). 3. RNA Ribossômico 16S. 4. Indústria de Processamento de Alimentos. 5. Alimentos - Contaminação. 6. Ecologia microbiana.

Palavras-chave: Biofilmes; Contaminação industrial; Gene 16S rRNA; Métodos de controle; ambientes de processamento de alimentos.

Nome do Autor: Leonardo Ereno Tadielo

Título: AVALIAÇÃO DA ECOLOGIA MICROBIANA, *Listeria monocytogenes* E *Salmonella* sp. EM INDÚSTRIAS DE PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS, FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES E MÉTODOS DE CONTROLE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira

Presidente e Co-orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, FMVZ

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), câmpus Botucatu

Prof. Dr. Mateus MatiuZZi da Costa

Membro

Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF

Prof. Dr. Mateus de Souza Ribeiro Mioni

Membro

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), câmpus Jaboticabal

Profa. Dra. Camila Michele Appolinario

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, FMVZ

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), câmpus Botucatu

Prof. Dr. Fábio Sossai Possebon

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, FMVZ

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), câmpus Botucatu

Data da defesa de tese: 30 de junho de 2023.

Dedico aos meus pais, Almerindo e Tânia,
e a todos os jovens que sonham com um
futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, à Nossa Senhora Aparecida e aos meus protetores por me guiarem em todos os momentos, sendo fontes de fé, afeto, força, sabedoria e esperança.

Aos meus queridos e amados pais, Almerindo e Tânia, os quais são exemplos de amor, dedicação e zelo na construção de uma família. Seus exemplos contruibuiram para a construção da minha ética e educação. Esta etapa que se encerra é dedicada a vocês, sei o quanto abdicaram para proporcionar uma educação de qualidade aos seus filhos, podem ter certeza que todas minhas decisões foram tomadas a partir de vossos ensinamentos. Agradeço por entender os momentos de ausência, os quais foram necessários nesses últimos anos, mas vocês estão sempre nos meus pensamentos e orações.

A minha irmã, amiga e fiel confidente Letiani, agradeço por ser uma irmã presente, amorosa e preocupada. Obrigado por escutar todas minhas preocupações e aflições e sempre ser capaz de falar palavras que proporcionam calma e aconchego. Agradeço também por segurar sozinha a responsabilidade de decisões importantes nos momentos difíceis em que me fiz ausente. Só você sabe o tanto que lhe admiro e amo.

A minha namorada e amiga Emanoelli, por ser minha companheira em todas as horas, seja na vida pessoal ou profissional. Agradeço por me ouvir, me acalmar, me amar, puxar minha orelha, dar conselhos, sendo uma parceira tão especial. Sou muito grato em poder dividir a vida com você.

Aos meus amigos, em especial Jhennifer, Victor, Vanessa, Carol, Rosana e Thiago, por me acolher tão bem em Botucatu e Palotina, construindo uma segunda família. Apesar da distância nos últimos tempos sempre conseguimos dividir bons momentos. Agradeço por compartilhar energias positivas em minhas escolhas e conquistas.

Ao meu orientador Professor José Paes, primeiramente pelo aceite da orientação e pela confiança a mim depositada na execução do projeto. Agradeço por proporcionar os conhecimentos e exemplos de como contribuir para uma educação pública de qualidade.

Ao meu amigo e co-orientador Professor Juliano, muito obrigado por todos os ensinamentos, conselhos, ideias, paciência e amizade durante todos os anos que

trabalhamos juntos. Agradeço toda a colaboração e ajuda durante as etapas do projeto, nossas discussões foram fundamentais para o bom desempenho das atividades. Sua bondade, generosidade e liderança são virtudes que levarei para minha carreira profissional.

Ao meu amigo e co-orientador Professor Luciano, agradeço pela ajuda, acolhimento de ideias e entusiasmo na execução do projeto. Agradeço pelo papel fundamental na escolha do lugar para realização do doutorado. Obrigado por me acolher tão bem em Palotina durante todos os anos que convivemos e por todas as palavras e atos de apoio e confiança.

Ao Professor Fábio (Cid) por toda a amizade, acolhimento, paciência e discussões de ideias durante as análises moleculares e estatísticas do projeto.

A todos os integrantes do Serviço de Orientação a Saúde Pública (SOAP) da FMVZ, UNESP, vocês foram fundamentais na execução do projeto, seja nas coletas, preparação de meios, pipetagem, lavagem de vidrarias e discussões científicas. Ao Otávio, pelas ideias e auxílio técnico na execução das atividades laboratoriais de pesquisa.

A todos os integrantes do Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA) da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, em especial a Rosana, Jhennifer e Paulo, os quais foram fundamentais durante as primeiras etapas do projeto.

A Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, seus docentes e técnicos.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida por meio do Processo nº 2020/01529-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos professores pelo aceite em compor a banca de avaliação.

Por fim, à todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para conclusão dessa etapa, meu muito obrigado!

“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes mesmo de terminar.
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Distribuição de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. em produtos, ambientes, equipamentos e utensílios de diferentes indústrias brasileiras entre os anos de 2017-2023.....30

Tabela 2: Descrição da ecologia microbiana das superfícies de ambientes, equipamentos e utensílios em diferentes indústrias de alimentos. 40

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Local de coleta e número de amostras avaliadas de diferentes superfícies de equipamentos e utensílios em abatedouro de aves, abatedouro de suínos e laticínio.....79

Tabela 2: Índices de diversidade alfa (*Shannon's diversity*, *Observed OTUs* e *Evenness*) e beta (*Bray-Curtis distance* e *Jaccard distance*) das comunidades bacterianas de diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (*Poultry*), suínos (*Pork*) e laticínio (*Dairy*).....79

Tabela Suplementar 1: Genes alvo, sequências dos primers, função e especificidade utilizados para sorotificação, virulência e formação de biofilme dos isolados de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. 85

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Isolados de *L. monocytogenes* (LM), *Salmonella* spp. (SAL) e microbiota acompanhante (MA) utilizados para avaliar a dinâmica de formação de biofilmes puros e multiespécies em superfície de polipropileno a 10 °C.....127

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (MIC) de THY, CAR, AgNPs, ZnONPs, AL e AA em células de *L. monocytogenes* (LM), *Salmonella* spp. (SAL) e microbiota acompanhante (MA) em condição pura e multiespécies para os compostos individuais e em associação. 138

Tabela 3: Concentração bactericida mínima (MBC) de THY, CAR, AgNPs, ZnONPs, AL e AA em células de *L. monocytogenes* (LM), *Salmonella* spp. (SAL) e microbiota acompanhante (MA) em condição pura e multiespécies para os compostos individuais e em associação. 139

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1: Média e desvio padrão das contagens obtidas para aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, *E. coli* e *Pseudomonas* sp. em log UFC/cm² de diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (*Poultry*), suínos (*Pork*) e laticínio (*Dairy*). 80

Figura 2: Filos, classes, ordens e famílias bacterianas identificadas de diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (*Poultry*), suínos (*Pork*) e laticínio (*Dairy*). Apenas DR>1% em pelo menos uma das amostras foram incluídas, as demais foram identificadas como "Others". (Para interpretação das referências à cor nesta legenda da figura, o leitor deve consultar a versão online deste artigo). 81

Figura 3: Gêneros bacterianos identificados de diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (*Poultry*), suínos (*Pork*) e laticínio (*Dairy*). Apenas DR>1% em pelo menos uma das amostras foram incluídas, as demais foram identificadas como "Others". (Para interpretação das referências à cor nesta legenda da figura, o leitor deve consultar a versão online deste artigo). 82

Figura 4: Espécies bacterianas identificadas de diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (*Poultry*), suínos (*Pork*) e laticínio (*Dairy*). Apenas DR>1% em pelo menos uma das amostras foram incluídas, as demais foram identificadas como "Others". (Para interpretação das referências à cor nesta legenda da figura, o leitor deve consultar a versão online deste artigo). 83

Figura 5: Análise das coordenadas principais (PCoA) baseado na métrica de dissimilaridade dos testes *Bray-Curtis distance* (A) e *Jaccard distance* (B) em amostras de superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (Azul), suínos (Verde) e laticínio (vermelho). Diagrama de Venn (C) para gênero e espécies das OTUs com DR>1% identificados em cada indústria de processamento (*Poultry*, *Pork* e *Dairy*). Gêneros e espécies em negrito indicam que são microrganismos compartilhados em pelo menos uma das indústrias. *Indicam diferença estatística pelo teste *ANCOM Volcano Plot*. (Para interpretação das referências à cor nesta legenda da figura, o leitor deve consultar a versão online deste artigo). 84

CAPÍTULO 3

Figure 1: Comparison of overall contamination and type of surface for detection of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in 400 cm² and count for mesophilic aerobes, enterobacteria, and *Pseudomonas* spp. (log CFU cm²) before and after the pre-operational cleaning process. Distinct lowercase letters demonstrate statistical difference between phases ("Before" and "After" cleaning process) for the same group of samples ("General contamination" or "Smooth-type" or "Modular-type"). 116

Figure 2: Bacterial phyla, classes, orders, and families identified before and after the pre-operational cleaning process. Only RD > 1% in at least one of the samples was included, the remaining taxa were identified as “Others.” (For interpretation of color-coded references in this figure, the reader is referred to the online version of this article). 117

Figure 4: Bacterial species identified before and after the pre-operational cleaning process. Only DR > 1% in at least one of the samples were included, the remaining species were identified as “Others.” (For interpretation of color-coded references in this figure, the reader is referred to the online version of this article). 118

Figure 5: Principal coordinate analysis (PCoA) of bacterial communities on food conveyor belts based on the dissimilarity metric of the (A) Bray–Curtis and (B) Jaccard distance tests. (For interpretation of color-coded references in this figure, the reader is referred to the online version of this article). 119

Figure 6: Distribution of bacterial genera and species described by percentage of OTUs with DR >1% (number of reads converted into log10) before and after the pre-operational hygiene process in a poultry slaughterhouse (For interpretation of color-coded references in this figure, the reader is referred to the online version of this article). 119

CAPÍTULO 4

Figura 1: Médias e desvio padrão (log UFC/cm²) da dinâmica da formação de biofilmes puros e multiespécies em diferentes tempos de contato para *L. monocytogenes* (A), *Salmonella* spp. (B) e microbiota acompanhante (C) em superfície de polipropileno a 10 °C. Letras minúscula diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($P<0,05$) fixado a condição de crescimento do microrganismo (Puro ou multiespécie). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($P<0,05$) fixado o tempo de contato para o mesmo microrganismo. 136

Figura 2: Médias e desvio padrão (log UFC/cm²) da formação de biofilmes multiespécies em diferentes tempos de formação para população total (A), *L. monocytogenes* (B) e *Salmonella* spp. (C) com a interferência de THY+CAR e AL+AA, AgNPs+ZnONPs em superfície de polipropileno a 10 °C. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa ($P<0,05$) quando fixado o mesmo tempo de formação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa ($P<0,05$) quando fixado o mesmo tratamento. 141

Figura 3: Frequência relativa (FR) de microrganismos em biofilmes multiespécies formados sobre superfície de polipropileno a 10 °C e com a presença de AgNPs+ZnONPs THY+CAR e AL+AA em diferentes tempos de formação (3, 24, 120, 216 e 312 h). 145

Figura 4: Análise das coordenadas principais (PCoA) baseado na métrica de *Unweighted Unifrac distance* (A e B) e *Weighted Unifrac distance* (C e D) em biofilmes multiespécies formados sobre superfície de polipropileno a 10 °C (azul) e com a presença de AgNPs+ZnONPs (amarelo), THY+CAR (verde) e AL+AA (vermelho). 146

Figura 5: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em diferentes tempos de contato de biofilmes multiespécies formados sobre superfície de polipropileno a 10 °C (A-E) e com a presença de AgNPs+ZnONPs (F-J), THY+CAR (K-P) e AL+AA

(Q-U).....	147
Figura 6: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de AgNPs (A) e ZnONPs (B) e de biofilmes multiespécies formados sobre superfície de polipropileno a 10 °C com a presença de AgNPs+ZnONPs (C, D e F).....	148
Figura 7: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes multiespécies formados sobre superfície de polipropileno a 10 °C com a presença de THY+CAR.....	148

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Microrganismos indicadores de higiene.....	23
2.1.1 Aeróbios mesófilos.....	24
2.1.2 Enterobactérias e <i>Escherichia coli</i>	25
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> sp.....	25
2.2.1 Características de <i>L. monocytogenes</i>	25
2.2.2 Características de <i>Salmonella</i> sp.....	26
2.2.3 Ocorrência em surtos, alimentos e instalações	27
2.3 Ecologia microbiana relacionada as indústrias de alimentos.....	34
2.3.1 Conceito e técnicas.....	34
2.3.4 Ecologia microbiana encontrada nas superfícies de diferentes indústrias de alimentos	36
4 OBJETIVOS.....	43

CAPÍTULO 2

Resumo	46
1 Introdução.....	47
2 Material e métodos	49
2.1 Amostragem	49
2.2 Contagem de microrganismos indicadores da qualidade higienicossanitária .	50
2.3 Isolamento, sorotipificação e virulência de <i>L. monocytogenes</i>	51
2.4 Isolamento, sorotipificação e virulência de <i>Salmonella</i> sp.....	52
2.5 Identificação da ecologia microbiana.....	53
2.6 Determinação da capacidade de adesão e genes relacionados a formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> sp.....	54
2.7 Análises estatísticas	56
3 Resultados.....	57
3.1 A contagem de microrganismos indicadores de higiene foi influenciada pelo tipo de indústria	57
3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> sp. foram isoladas em diferentes locais nas indústrias.....	58

3.3 Os sorotipos de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp. identificados apresentaram fatores relacionadas à virulência e formação de biofilme	58
3.4 A ecologia microbiana das superfícies industriais e sua distribuição relativa foi diferente de acordo ao tipo de indústria.....	59
3.5 O tipo de indústria afetou a diversidade alfa e beta da ecologia microbiana ..	61
4 Discussão	62
5 Conclusões	70
Declaração de contribuição de autoria CRediT	71
Declaração de conflito de interesse	71
Agradecimentos.....	71
Referências.....	72
Highlights	88
Resumo gráfico.....	89

CAPÍTULO 3

Resumo	92
1 Introdução	93
2 Material e métodos	95
2.1 Características do abatedouro frigorífico e amostragem.....	95
2.2 Contagem de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae e <i>Pseudomonas</i> spp.	96
2.3 Detecção de <i>L. monocytogenes</i>	97
2.4 Detecção de <i>Salmonella</i> spp.	98
2.5 Identificação da ecologia microbiana por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA	98
2.6 Análises estatísticas	99
3 Resultados.....	101
3.1 Efeito do processo de higienização na presença de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp. e contagens de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae e <i>Pseudomonas</i> spp.	101
3.2 Descrição da ecologia microbiana em esteiras transportadoras de alimentos antes e após do processo de higienização	101
3.3 Diversidades alfa e beta da ecologia microbiana com base no processo de higienização	103
4 Discussão	104
5 Conclusão.....	110
Declaração de contribuição de autoria CRediT	110
Declaração de conflito de interesse	111

Agradecimentos.....	111
Referências.....	111
Highlights	121
CAPÍTULO 4	
Resumo	124
1 Introdução.....	125
2 Material e métodos	127
2.1 Isolados utilizados.....	127
2.2 Dinâmica de formação de biofilmes puros e multiespécies de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. e microbiota acompanhante em cupons de polipropileno	128
2.3 Obtenção e preparo das soluções de THY, CAR, AgNPs, ZnONPs, AL e AA	130
2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) para <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. e microbiota microbiana sob condição crescimento pura e multiespécies	130
2.5 Avaliação da inibição da formação de biofilmes multiespécies sob ação de THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA.....	132
2.6 Avaliação da distribuição dos microrganismos nos biofilmes multiespécies com ação de THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA	133
2.7 Avaliação da arquitetura dos biofilmes por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	134
3 Resultados e discussões	135
3.1 Dinâmica de formação de biofilmes puros e multiespécies de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. e microbiota acompanhante	135
3.2 Determinação da MIC e MBC	137
3.3 Avaliação do THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA sobre a inibição da formação, ecologia microbiana e arquitetura dos biofilmes multiespécies.....	139
5 Conclusões	152
Declaração de contribuição de autoria CRediT	152
Declaração de conflito de interesse	153
Agradecimentos.....	153
Referências.....	154
CAPÍTULO 5	
1 DISCUSSÃO GERAL.....	159
2 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	160
3 REFERÊNCIAS	161

TADIELO, L. E. **Avaliação da ecologia microbiana, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. em indústrias de processamento de alimentos, formação de biofilmes multiespécies e métodos de controle.** Botucatu, 2023. 170p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os objetivos do estudo foram avaliar a qualidade higienicossanitária, presença, virulência e fatores relacionados a formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. e identificar a ecologia microbiana em superfícies de equipamentos e utensílios de indústrias brasileiras de aves, suínos e derivados lácteos; avaliar a eficácia do processo de higienização pré-operacional (PHPO) de um abatedouro de aves; avaliar a dinâmica de formação de biofilmes de culturas puras e multiespécies de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante em superfície de polipropileno e avaliar a ação de Thymol e Carvacrol (THY+CAR), nanopartículas de Prata e Óxido de Zinco (AgNPs+ZnONPs) e ácido láctico e acético (AL+AA) na inibição da formação dos biofilmes multiespécies. Foram realizadas contagens de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp., pesquisa de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. e identificação da ecologia microbiana por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. A dinâmica de formação de biofilmes puros e multiespécies foi avaliada em superfícies de polipropileno por até 360 h a 10 °C e os efeitos inibitórios de THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA na formação de biofilmes multiespécies foram mensurados em 3 h, 24 h, 120 h, 216 h e 360 h, por meio da contagem das células viáveis, ecologia microbiana e arquitetura. A contagem de aeróbios mesófilos foi mais elevada no laticínio, seguido pelo abatedouro de suínos e aves. *Listeria monocytogenes* foi detectada nas três indústrias, o abatedouro de suínos apresentou a maior ocorrência, seguido por aves e laticínio. *Salmonella* sp. foi detectada apenas no laticínio. *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Aeromonas* foram contaminantes frequentes para o abatedouro de aves; *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Brevundimonas* para suínos e *Pseudomonas*, *Kocuria* e *Staphylococcus* para o laticínio. O PHPO do abatedouro de aves foi capaz de reduzir a contagem de todos os microrganismos indicadores e eliminar *Salmonella* sp., contudo, *L. monocytogenes* permaneceu em algumas superfícies. A ecologia microbiana antes PHPO foi

composta por microrganismos que estão associados ao processo de obtenção e elaboração dos cortes cárneos, como *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus* e *Enterococcus*. Após PHPO houve alteração da ecologia microbiana, destacando microrganismos que possuem maior adaptação as condições industriais, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*. A dinâmica de formação de biofilmes puros e multiespécies apresentou diferenças pontuais de acordo aos tempos de avaliação, no entanto, todos os biofilmes apresentaram contagens semelhantes em avaliações após 216 h, indicando efeito sinérgico das espécies no consórcio bacteriano de biofilmes multiespécies. THY+CAR foram os compostos que apresentaram maior inibição dos biofilmes multiespécies, seguido por AL+AA e AgNPs+ZnONPs. Esses compostos também inibiram o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. nos biofilmes multiespécies. A ecologia microbiana indicou que a família Yersiniaceae foi comum a todas as condições de crescimento, Moraxellaceae foi mais abundante nos biofilmes multiespécies sem tratamento e Pseudomonadaceae em THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA. Em relação a arquitetura dos biofilmes, THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA afetaram o desenvolvimento dos biofilmes, demonstrando baixo número de células bacterianas e matriz de exopolissacarídeos sob as superfícies. Nossos resultados fornecem informações importantes para entender o risco microbiológico de contaminação e seus impactos sobre a eficácia dos programas de higienização.

Palavras-chave: ambientes de processamento de alimentos, biofilmes, contaminação industrial, métodos de controle, gene 16S rRNA.

TADIELO, L.E. **Evaluation of microbial ecology, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. in food processing industries, multispecies biofilm formation and control methods** Botucatu, 2023. 170p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The objectives of the study were to evaluate the hygienic-sanitary quality, presence, virulence, and factors related to biofilm formation of *L. monocytogenes* and *Salmonella* sp. and identify the microbial ecology on surfaces of equipment and utensils of Brazilian industries of poultry, pork, and dairy; evaluate the effectiveness of the Sanitation Standard Operating Procedure (SSOP) of a poultry slaughterhouse; to evaluate the dynamics of biofilm formation in pure and multispecies cultures of *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and accompanying microbiota on a polypropylene surface and evaluate the action of Thymol and Carvacrol (THY+CAR), Silver and Zinc Oxide nanoparticles (AgNPs+ZnONPs) and lactic and acetic acid (AL+AA) in inhibiting the formation of multispecies biofilms. Counts of mesophilic aerobes, enterobacteria, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas* sp., research of *L. monocytogenes* and *Salmonella* sp., and identification of microbial ecology through 16S rRNA gene sequencing. The dynamics of pure and multispecies biofilm formation were evaluated on polypropylene surfaces for up to 360 h at 10 °C and the inhibitory effects of THY+CAR, AgNPs+ZnONPs, and AL+AA on multispecies biofilm formation were measured at 3 h, 24 h, 120 h, 216 h, and 360 h, through viable cell count, microbial ecology and architecture. The mesophilic aerobic count was higher in the dairy, followed by the pork and poultry slaughterhouses. *L. monocytogenes* was detected in the three industries, the pork slaughterhouse had the highest occurrence, followed by poultry and dairy. *Salmonella* sp. was detected only in dairy. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Aeromonas* were frequent contaminants in the poultry slaughterhouse; *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and *Brevundimonas* for pork and *Pseudomonas*, *Kocuria*, and *Staphylococcus* for dairy. The SSOP from the poultry slaughterhouse was able to reduce the count of all indicator microorganisms and eliminate *Salmonella* sp., however, *L. monocytogenes* remained on some surfaces. The microbial ecology before SSOP was composed of microorganisms that are associated with the process of obtaining and preparing meat cuts, such as

Aneurinibacillus, *Anoxybacillus*, and *Enterococcus*. After SSOP, there was a change in the microbial ecology, highlighting microorganisms that are more adapted to industrial conditions, such as *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Aeromonas*. The dynamics of the formation of pure and multispecies biofilms showed punctual differences according to the evaluation times, however, all biofilms presented similar counts in evaluations over 216 h, indicating a synergistic effect of the bacterial consortium of multispecies biofilms. THY+CAR were the compounds that showed the greatest inhibition of multispecies biofilms, followed by AL+AA and AgNPs+ZnONPs. These compounds also inhibited the development of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in multispecies biofilms. Regarding the architecture of biofilms, THY+CAR, AgNPs+ZnONPs, and AL+AA affected the development of biofilms, demonstrating low numbers of bacterial cells and EPS under the surfaces. Our results provide important information to understand the microbiological risk of contamination and its impacts on the effectiveness of sanitation programs.

Key words: biofilms, food processing environments, industrial contamination, microbiota, 16S rRNA gene sequencing.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa amplo espaço no cenário mundial da produção de alimentos, com grande impacto para o setor de produtos cárneos e lácteos. A expansão desses mercados, aliado aos índices de exportações, faz com que boas condições sanitárias das instalações, equipamentos e utensílios sejam fundamentais para garantir a segurança microbiológica de matérias primas alimentares e seus produtos finais. Dentre os fatores que afetam a inocuidade dos alimentos, microrganismos como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. merecem destaque, pois apresentam natureza ubíqua, sendo encontrados em vários produtos de origem animal e em superfícies de uso industrial. Muitos trabalhos descreveram a ocorrência e persistência desses patógenos nos ambientes de produção de alimentos no Brasil (MAGALHÃES et al., 2016; CARVALHO et al., 2019; SERENO et al., 2019; VOSS-RECH et al. 2019).

Diante disso, a análise microbiológica do ambiente de processamento de alimentos é uma importante aliada na avaliação da segurança dos produtos, por meio da identificação da população microbiana, possibilitando entender a ecologia microbiana do ecossistema e conferindo ações mais eficientes na produção de alimentos (FAGERLUND et al., 2017; GU et al, 2019). No Brasil, as indústrias de alimentos avaliam a qualidade microbiológica das suas instalações sobre a contagem bacteriana total, mas pouco se sabe da identidade desses microrganismos, bem como se os mesmos podem contribuir para o desenvolvimento e sobrevivência de patógenos.

A identificação da ecologia microbiana pela técnica de sequenciamento do 16S rRNA em amostras de superfícies industriais pode auxiliar no entendimento dos mecanismos de sobrevivência em nichos ecológicos residentes ou transitórios nessas instalações, por meio de mecanismos de sinergismo, competição, antagonismo ou não interferência no desenvolvimento de uma espécie em função de outra (FAGERLUND et al., 2017; RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2019; HASCOËT et al., 2019; ZWIRZITZ et al., 2021; CHERIFI et al., 2022). Além disso, possibilita auxiliar no diagnóstico de biofilmes microbianos nos ambientes de produção de alimentos.

Os biofilmes são ecossistemas microbianos complexos formados de uma ou mais espécies imersas em uma matriz de polímeros extracelulares, composta

principalmente por proteínas, polissacarídeos e DNA, sendo que o processo de formação depende da interação entre as células microbianas, superfície de fixação e condições ambientais (COSTERTON et al. 1999; FERREIRA et al., 2014). Essas estruturas conferem proteção, adaptabilidade e resistência aos microrganismos envolvidos nesta matriz frente aos métodos de controle, tornando-se fontes de contaminação entre ambientes e produtos (OLIVEIRA et al, 2010; KADAM et al., 2013; LEE et al., 2017).

Portanto, avaliar a qualidade higienicossanitária, presença, virulência e fatores relacionados a formação de biofilme de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. em ambientes industriais de processamento de aves, suínos, derivados lácteos, bem como identificar a ecologia microbiana residente nesses locais tornam-se importante para a cadeia produtiva de alimentos do Brasil e para a saúde pública, visto a ausência de dados. Além disso, colabora com testes para susceptibilidade dos microrganismos à medidas de controles, buscando alternativas para a prevenção e controle dos biofilmes industriais e com isso reduzir a contaminação das superfícies e produtos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microrganismos indicadores de higiene

Na indústria de alimentos, os padrões microbiológicos que utilizam microrganismos indicadores são usados para determinar a qualidade microbiológica, pois são grupos de microrganismos que indicam a qualidade do processo de obtenção, manipulação, refrigeração e armazenamento (FRANCO & LANDGRAF, 2008; HALKMAN & HALKMAN, 2014). Esses microrganismos também são utilizados como indicadores da eficácia do processo de higienização, pois são sensíveis aos métodos de controle rotineiramente empregados nessas instalações (MØRETRØ & LANGSRUD, 2017; AGÜERIA et al., 2021).

As indústrias de alimentos utilizam a avaliação de microrganismos indicadores em sua rotina pois sua análise apresenta importantes vantagens, tais como o baixo custo analítico, simplicidade na execução da técnica e rapidez na obtenção de resultados (HALKMAN & HALKMAN, 2014). Alguns fatores devem ser analisados para a escolha de quais microrganismos podem ser avaliados para avaliar a qualidade higienicossanitária das instalações, equipamentos e utensílios utilizados na indústria de alimentos, como (GERBA, 2009):

- os microrganismos devem ser facilmente detectáveis nos locais a serem avaliados;
- apresentar enumeração compatível que permita a comparação entre os processos de avaliação;
- ser detectáveis por métodos rápidos, baratos, amplamente distribuídos e de fácil interpretação;
- o critério de mensuração determinado deve ser pertinente a vários pontos e momentos de avaliação.

Nos últimos anos as indústrias de alimentos estão desenvolvendo programas de monitoramento ambiental, com a finalidade de verificar os procedimentos de limpeza e sanitização por meio de diversas amostragens, pesquisas de microrganismos indicadores e de alguns patógenos ambientais (MOTA et al., 2021). Para implementação desses programas nas indústrias de alimentos, Mota et al. (2021) propõe a execução de três etapas definidas como (1) pré-analíticas, (2) analíticas e

(3) pós-analíticas. Na etapa pré-analítica são indicadas as estratégias para implementação do programa, levando em consideração os perigos e riscos associados ao tipo de indústria de alimentos e aos produtos produzidos. A etapa analítica compreende a realização das amostragens e avaliação dos microrganismos a serem identificados por métodos convencionais ou moleculares. A etapa pós-analítica é definida como a interpretação e o gerenciamento dos dados obtidos. A realização desses programas para o monitoramento ambiental nas indústrias deve ser dinâmica, pois os programas podem sofrer alterações de acordo ao tipo de produto, local de avaliação, critérios de inclusão e exclusão e parâmetros microbiológicos, portanto devem ser atualizados e validados regularmente.

Atualmente, a legislação brasileira não descreve quais microrganismos e seus limites devem ser utilizados para mensurar a eficácia do processo de limpeza e sanitização. Algumas indústrias adotavam os limites preconizados pela Decisão da Comissão Europeia nº. 471 de 2001, que determinava a contagem máxima de 10 UFC/cm² para aeróbios mesófilos e 1 UFC/cm² para enterobactérias em superfícies de contato com alimentos (EC, 2001), contudo, tal norma foi revogada. Zacharski et al. (2018), avaliando o monitoramento ambiental de indústrias de lácteos na Irlanda definiram como microrganismos indicadores de qualidade higienicossanitária para superfícies a contagem de aeróbios mesófilos (limite de 30 UFC/cm²), enterobactérias (limite de 1 UFC/cm²) e *Staphylococcus aureus* (limite de 1 UFC/cm²). Soares et al. (2018) para avaliar o efeito da ausência de pulverização de água sobre a contaminação microbiana de esteiras transportadoras em abatedouro de aves no Brasil, realizaram a contagem de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e *Escherichia coli*. Corroborando este estudo, Rodrigues et al. (2018) utilizaram a contagem de aeróbios mesófilos, *S. aureus* e *E. coli*, juntamente com método de bioluminescência de ATP, para avaliar a contaminação das superfícies.

2.1.1 Aeróbios mesófilos

A avaliação de microrganismos aeróbios mesófilos reflete o estado de contaminação geral das instalações, equipamentos, utensílios e alimentos (HALKMAN & HALKMAN, 2014). Nesse grupo são enumerados praticamente todos os microrganismos viáveis, obtendo informações que avaliam a qualidade e eficácia

das medidas de controle utilizadas nesses ambientes, pois contagens elevadas significam deficiências nas etapas de limpeza e sanitização ou falhas durante a execução dos processos (AGÜERIA et al., 2021).

2.1.2 Enterobactérias e *Escherichia coli*

A família Enterobacteriaceae compreende um grupo de microrganismos bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos e oxidase negativa (HALKMAN & HALKMAN, 2014). Dentro desse grupo são encontrados bactérias patogênicas para humanos e animais como *Salmonella* spp., *E. coli* enteropatogênicas, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* sp. e *Cronobacter* sp., as quais representam risco para a saúde pública. Esses microrganismos são amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados no ambiente, animais, seus produtos e humanos (BAYLIS et al., 2011; MLADENOVIC et al., 2021). *Escherichia coli*, são microrganismos que apresentam como habitat principal a microbiota intestinal de animais de sangue quente, sendo portanto considerados contaminantes de origem fecal (FRANCO & LANDGRAF, 2008; HALKMAN & HALKMAN, 2014).

Desse modo, avaliações de Enterobacteriaceae e *E. coli* podem ser utilizadas como indicadores da eficácia das condições higiênicossanitárias estabelecidas pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF) e pelos Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO), pois são microrganismos eliminados facilmente pelos programas de limpeza e sanitização quando eficazes. Portanto, contagens elevadas indicam falhas nesses processos, favorecendo a colonização desses microrganismos em diversos nichos ecológicos persistentes (SAINI et al., 2011; MØRETRØ & LANGSRUD, 2017).

2.2 *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp.

2.2.1 Características de *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um bastonete curto Gram-positivo, catalase positiva, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e móveis a 25 °C devido a

presença de flagelos peritríquios (JAY, 2005). O gênero *Listeria* pertence a família Listeriaceae, sendo composto atualmente por 30 espécies, contudo, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* são as mais frequentes (PIRIE, 1940; LARSEN & SEELIGER, 1966; SEELIGER, 1981; ROCOURT & GRIMONT, 1983; SEELIGER et al., 1984). Devido *L. monocytogenes* apresentar diversos mecanismos genéticos relacionados a fatores de virulência e patogenicidade, é responsável por ocasionar quadros de listeriose em humanos e animais. Em indivíduos saudáveis provoca uma gastroenterite autolimitante febril, entretanto, nos indivíduos imunocomprometidos pode causar septicemia, infecções no sistema nervoso central e materno-fetais, promovendo quadros de meningites, encefalites, aborto e morte (BUCHANAN et al. 2017).

Listeria monocytogenes é dividida em 13 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) de acordo com antígenos somáticos e flagelares, apesar de todos os sorotipos apresentarem capacidade de causar doenças, 1/2a, 1/2b e 4b estão entre os sorotipos mais prevalentes em doenças e surtos (DOUMITH et al., 2004; MONTERO et al., 2015). Esses microrganismos apresentam mecanismos de tolerância as condições de estresse ambiental que colaboram para sua sobrevivência a amplas faixas de temperaturas (0-45 °C), privação de nutrientes, oscilações de pH (4,3-9,6), elevadas concentrações de sal (> 10% NaCl) e baixa atividade de água (>0,92) (KOUTSOUMANIS et al., 2004; CHAN et al., 2008; BUCUR et al., 2018).

Também possui a capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, resistir a antibióticos e tolerar a ação de sanitizantes, o que contribui para colonizar e persistirem diversos nichos ecológicos (ARYAL & MURIANA, 2019; HUA et al., 2019; SERENO et al., 2019; FAN et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2020; AGOSTINHO DAVANZO et al., 2021). Desse modo, *L. monocytogenes* é amplamente distribuída na natureza e pode ser encontrada na vegetação, solo, fezes de humanos e animais e água sendo fontes para a contaminação de alimentos de origem animal e vegetal, além de sobreviver em equipamentos e utensílios dos ambientes de processamento de alimentos (CHEN et al., 2019; CHURCHILL et al., 2019; PRATES et al., 2019; SERENO et al., 2019; MAĆKIW et al., 2021; TRUCHADO et al., 2022).

2.2.2 Características de *Salmonella* sp.

Salmonella sp. pertence a família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, oxidase negativa, catalase positivas, não formadores de esporos e fermentam a glicose produzindo gás (JAY, 2005). Com exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, são móveis por meio de flagelos (MCQUISTON et al., 2004). *Salmonella* é dividida em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo *S. enterica* subdividida em seis sub-espécies, denominadas *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (TINDALL et al., 2005). Desse modo, *S. enterica* apresenta mais de 2.600 sorotipos descritos em todo o mundo, onde grande maioria destes são capazes de causar doença em humanos e animais (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). As doenças relacionadas a *S. enterica* em humanos podem ser classificadas em três grupos: Febre tifóide, causada por *S. Typhi*; febre entérica, causada por *S. Paratyphi* A, B e C e salmoneloses, causadas pelos demais sorotipos (COBURN et al., 2007).

É um microrganismo onipresente, estando o trato gastrointestinal de animais como seu principal reservatório. Com isso, pode contaminar as plantas de abate e processamento industrial, produtos e superfícies de contato (IGLESIAS et al., 2017; CUNHA-NETO et al., 2018; PERIN et al., 2020; DE QUADROS et al., 2020). *Salmonella* sp. foi isolada em diversos produtos de origem animal e vegetal, como carnes, alimentos prontos para o consumo, lácteos, vegetais, frutas, legumes, cereais, chocolate e outros (YANG et al., 2020; PERIN et al., 2020; AGUILAR-VÁZQUEZ et al., 2022; ELAFIFY et al., 2022).

Isolados de *Salmonella* sp. apresentam resistência a diversos antibióticos, caracterizando microrganismos multirresistentes (MDR), ocasionado, principalmente, pelo uso excessivo de antibióticos na produção animal e na terapêutica clínica de humanos e animais (VIANA et al., 2019, PERIN et al., 2020; AGOSTINHO DAVANZO et al., 2021). No ambiente industrial, *Salmonella* sp. possui a capacidade de aderir e formar biofilme em diferentes superfícies, apresentando tolerância aos sanitizantes utilizados no processo de higienização, como o hipoclorito de sódio e amônio quaternário (ARYAL & MURIANA, 2019; OBE et al., 2021).

2.2.3 Ocorrência em surtos, alimentos e instalações

Listeria monocytogenes e *Salmonella* sp. são microrganismos que podem ser

veiculados por alimentos e causar doenças ao consumidor. Na União Européia (EU) no ano de 2021, *Salmonella* foi o segundo microrganismo relacionado a gastroenterites em humanos, ocasionando 60.050 casos com taxa de mortalidade de 0,18% (EFSA, 2022). Dentre os principais sorotipos relacionados aos casos estavam: *S. Enteritidis* (54.6%), *S. Typhimurium* (11.4%), *S. Typhimurium* variante nonofásica (1,4,[5],12:i:-) (8.8%), *S. Infantis* (2.0%) e *S. Derby* (0.93%). Para *L. monocytogenes* foi notificado 2.183 casos invasivos, obtendo taxa de letalidade de 13,7%, onde indivíduos com mais de 64 anos foram os mais acometidos (EFSA, 2022). Na última década, nos Estados Unidos (EUA), *Salmonella* ocasionou 2.432 surtos envolvendo 53.580 pessoas, acarretando em 83 mortes (CDC, 2022). Neste mesmo período, *L. monocytogenes* foi responsável por 78 surtos, 788 casos e 128 óbitos, em ambas as etiologias a origem alimentar foi a principal fonte (CDC, 2022). No Brasil, entre os anos de 2012 a 2021, *Salmonella* sp. foi relacionada como causa de 11,2% das doenças de transmissão hídrica e alimentar (BRASIL, 2022).

As indústrias que processam e beneficiam produtos de origem animal sob certificação do Serviço de Inspeção Federal (SIF) no Brasil participam do Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP), que visa reduzir a prevalência de agentes patogênicos, avaliar as ações de controle adotadas pelos estabelecimentos e gerenciar o risco a fim de preservar a segurança do alimentos. No ano de 2019, *Salmonella* foi responsável pela contaminação de 1,57% (24/1.532) das carcaças de bovinos, 6,2% (36/581) de suínos e 15,08% (427/2.831) de frangos de corte (BRASIL, 2020). *Listeria monocytogenes* foi identificada em 0,96% (10/1035) dos produtos prontos para o consumo, sendo os produtos cárneos (2,34%, 5/213) e lácteos (0,61, 5/810) os mais incriminados (BRASIL, 2020).

Estudos realizados em indústrias de diferentes regiões no Brasil entre os anos de 2017 e 2022 mostraram que a frequência de *Salmonella* sp. foi de 12,22% em produtos e 9,02% em ambientes, equipamentos e utensílios. *Salmonella* Typhimurium, *S. Heidelberg*, *S. Ndolo*, *S. Minnesota*, *S. Infantis*, *S. Abony* e *S. Agona* foram os principais sorotipos encontrados na indústria de aves (CUNHA-NETO et al., 2018; AGOSTINHO DAVANZO et al., 2021) e *S. Typhimurium*, *S. Infantis* e *S. Derby* em suínos (DE QUADROS et al., 2020; KICH et al., 2020). Os isolados demonstraram vasto perfil de virulência (VIANA et al., 2019) e resistência a diversos antibióticos utilizados na terapêutica clínica de humanos e animais (IGLESIAS et al., 2017; CUNHA-NETO et al., 2018; KICH et al., 2020; VIANA et al., 2019; DE QUADROS et

al., 2020; AGOSTINHO DAVANZO et al., 2021; DOS SANTOS et al., 2022), alguns destes isolados possuíam marcadores moleculares que descrevem a resistência aos antibióticos (AGOSTINHO DAVANZO et al., 2021; DOS SANTOS et al., 2022) e foram capazes de formar biofilmes em superfícies de poliestireno a 12 e 37°C (AGOSTINHO DAVANZO et al., 2021; DOS SANTOS et al., 2022).

Listeria monocytogenes apresentou frequência de 12,06% em produtos e 6,34% em ambientes, equipamentos e utensílios (Tabela 1). Os sorotipos mais frequentes na indústria de aves foram 1/2a, 1/2c, 1/2b e 3a (OLIVEIRA et al., 2018; MOURA et al., 2019; AGOSTINHO DAVANZO et al., 2021); 4b em suínos (SERENO et al., 2019) e 4b e 1/2b em laticínios (PRATES et al., 2019). Diversos isolados carreavam genes relacionados a virulência de *L. monocytogenes* (IGLESIAS et al., 2017; PRATES et al., 2019; SERENO et al., 2019), resistência a sulfosamidas e ampicilina (IGLESIAS et al., 2017; CARVALHO et al., 2019; SERENO et al., 2019), capacidade de aderir e invadir células caco-2 (AGOSTINHO DAVANZO et al., 2021), formar biofilme em superfícies plásticas e de aço inoxidável (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2017; SERENO et al., 2019; AGOSTINHO DAVANZO et al., 2021) e tolerância a ação de sanitizantes, como o ácido peracético (CARVALHO et al., 2019; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2017). Alguns isolados foram persistentes durante longos períodos de avaliação nas instalações de abatedouro de suínos (SERENO et al., 2019) e laticínio (PRATES et al., 2019).

267 Tabela 1: Distribuição de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. em produtos, ambientes, equipamentos e utensílios de diferentes indústrias
 268 brasileiras entre os anos de 2017-2023.

Microrganismo	Indústria	Amostras ou local de coleta	Frequência	Estado ou Região	Demais características e observações	Referência
<i>Salmonella</i> sp.	Produtos					
	Abatedouro de bovinos	Carcaças	8,5% (17/200)	Rio Grande do Sul (RS)	S. Senftenberg, S. Muenster, S. Anatum, S. Enterica (O:6,7), S. Ohio, S. Derby e S. Livingstone. Resistência a tetraciclina, sulfonamidas, ampicilina, cefoxitina, cefalotina e estreptomicina.	Iglesias et al. (2017)
	Abatedouro de aves	Carcaças	3,6% (31/850)	Mato Grosso (MT)	S. Infantis, S. Abony e S. Agona. Resistência a sulfonamida, trimetoprim e trimetoprima+sulfametoxazol.	Cunha-Neto et al. (2018)
	Laticínio	Produtos lácteos	0,1% (4/5421)	Minas Gerais (MG)	Sem observações	Santos et al. (2019)
	Abatedouro de suínos	Carcaças	17,2% (65/378)	Região Sul	S. Typhimurium e S. Infantis. Resistência a tetraciclina, ampicilina, ácido nalidíxico, e cloranfenicol.	Kich et al. (2020)
	Cortes congelados de frango		31,7% (95/300)	Paraná (PR)	S. Typhimurium, S. Heidelberg, S. Ndolo, S. Minnesota. Resistência a ácido nalidíxico, tetraciclina, doxiciclina, ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, ceftriaxona e ciprofloxacina. Genes de resistência a antibióticos (<i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{TEM}</i>).	Perin et al. (2020)

Salmonella sp.	Ambientes, equipamentos e utensílios					
	Abatedouro de suínos	Sala de dessosa (Faca, luvas de aço, tábuas, esteiras transportadoras)	2,5% (3/120)	Região Sul	Sorogrupo B3, genes de virulência (<i>invA</i> , <i>spaN</i> , <i>sipB</i> , <i>tolC</i> , <i>prgH</i> , <i>sopB</i> e <i>orgA</i>), resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina	Viana et al. (2019)
	Abatedouro de suínos	Amostras ambientais antes e após o processo de higienização	38,3% (23/60)	Região Sul	S. Derby, S. Typhimurium, S. Typhimurium variante monofásico 1,4 [5],12:i:-, S. Infantis e S. Panamá. Resistência a amoxicilina, cloranfenicol e doxiciclina. Sensibilidade ao ácido peracético e amônio quaternário.	de Quadros et al. (2020)
	Abatedouro de aves	Superfícies de esteiras transportadoras após higienização	1,2% (2/160)	Paraná (PR)	Sem observações	Viana et al. (2020)
	Abatedouro de aves	Instalações (pisos, paredes e ralos) e equipamentos (mesas, calhas e equipamentos)	0,8% (1/287)	Distrito Federal (DF) e Goiás (GO)	S. Minnesota, resistência ao ácido nalidixico, amoxicilina, ampicilina, cefalotina, cefazolina, ceftazidima. Genes de resistência a antibióticos. Fraca capacidade de adesão em poliestireno a 12 e 37 °C.	Agostinho Davanzo et al. (2021)
	Abatedouro de suínos	Superfícies industriais, equipamentos e utensílios	2,3% (1/44)	Distrito Federal (DF)	S. Typhi. Resistência ao ácido nalidíxico, cefazolina, cloranfenicol, doxiciclina, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina e sulfonamida. Genes de resistência a antibióticos (<i>tetB</i> , <i>tetC</i> , <i>tetM</i> e <i>ampC</i>). Moderada capacidade de adesão em poliestireno.	dos Santos et al. (2022)

Produtos						
L. monocytogenes	Abatedouro de bovinos	Carcaças	6,0% (12/200)	Rio Grande do Sul (RS)	Sorogrupo I (4b, 4d ou 4e) e II (1/2c ou 3c). Genes de virulência (<i>prfA</i> , <i>plcA</i> , <i>hlyA</i> , <i>mpl</i> , <i>actA</i> , <i>plc</i> , <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>inlC</i> , <i>inlJ</i> e <i>iap</i>). Resistência comum a sulfonamidas.	Iglesias et al., 2017
	Abatedouro de aves	Cortes cárneos frescos (peito e coxa)	23,1% (391/1694)	Santa Catarina (SC)	Sem observações.	Schafer et al. (2017)
	Abatedouro de aves	Carcaças	17,9% (35/195)	Bahia (BA)	Sorotipos 1/2a, 1/2c e 1/2b. Resistência a clindamicina.	Oliveira et al., 2018
	Abatedouro de bovinos	Carne fresca embalada	12,0% (6/50)	Mato Grosso (MT)	Sorogrupo IV. Tolerância ao hipoclorito de sódio.	Teixeira et al. (2020)
	Laticínio	Queijos	1,3% (1/78)	Minas Gerais (MG)	Sem observações	Campos et al. (2021)
	Ambientes, equipamentos e utensílios					
L. monocytogenes	Processamento de tilápia	Ambiente de desossa, inspeção e embalagem	2,1% (3/142)	São Paulo (SP)	Sorogrupo II, I e IV. Capacidade de adesão em poliestireno e aço inoxidável. Biofilmes com tolerância ao ácido peracético e ao hipoclorito de sódio.	Vázquez-Sánchez et al., (2017)
	Laticínio	Superfícies de contato com alimentos	0,2% (1/257)	São Paulo (SP) e Goiás (GO)	Alta similariedade genética com outros isolados encontrado em indústrias de lácteos.	Oxaran et al. (2017)
	Abatedouro de aves	Equipamentos e utensílios após higienização	5,2% (15/297)	Santa Catarina (SC)	Sem observações.	Schafer et al. (2017)
	Abatedouro frigorífico de suínos	Sala de desossa (Dreno, parede, mesa, esteiras transportadoras, luvas, caixas, faca e tábuas)	7,5% (18/240)	Paraná (PR)	Sorotipo 4b; Genes de virulência <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>inlC</i> , <i>inlJ</i> , <i>hlyA</i> , <i>plcA</i> , <i>actA</i> e <i>iap</i> . Isolados com 100% de similariedade por <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE), persistentes por sete meses e apresentando capacidade de adesão em poliestireno (100%). Resistência comum a ampicilina.	Sereno et al. (2019)

<i>L. monocytogenes</i>	Abatedouro frigorífico de aves	Sala de desossa (Facas, tábuas de corte, superfícies)	15,0% (9/60)	Mato Grosso (MT)	Sorotipos 1/2a e 3a, resistência a ampicilina e tolerância ao ácido peracético.	Moura et al. (2019); Carvalho et al. (2019)
	Processamento de charque	Superfície de contato com alimentos (facas, caixas, misturador, fatiador, mesa esteira transportadora e detector de metais)	1,8% (1/56)	Rio Grande do Sul (RS)	Genes de virulência (<i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>inlC</i> , <i>inlJ</i> , <i>hlyA</i> , <i>prfA</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>actA</i> e <i>mpl</i>).	Coradini et al. (2019)
	Abatedouro de aves	Superfícies de esteiras transportadoras após higienização	10,6% (17/160)	Paraná (PR)	Sem observações	Viana et al. (2020)
	Abatedouro de aves	Instalações (pisos, paredes e ralos de áreas sujas e limpas) e equipamentos (mesas de evisceração, calhas e maquinários)	8,8% (10/113)	Distrito Federal (DF) e Goiás (GO)	Sorotipos 1/2a e 3a. Capacidade de aderir (variação de 17,38% a 57,14%) e invadir (variação de 5,16% a 34,27%) células caco-2. Fraca capacidade de adesão em poliestireno a 12 e 37 °C.	Agostinho Davanzo et al. (2021)
	Produtos, ambientes, equipamentos e utensílios					
	Laticínio	Leite pasteurizado, queijos e superfícies ambientais, equipamentos e utensílios (tanque de resfriamento, tanque de coagulação, baldes, moldes, prateleiras de câmara fria)	7,1% (15/212)	Região Sul	Sorotipo 4b, 1/2b. Genes de virulência (<i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>inlC</i> , <i>inlJ</i> , <i>iap</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>hlyA</i> , <i>actA</i> , <i>mpl</i> e <i>prfA</i>), persistentes por dois meses nas instalações.	Prates et al., (2019)

272 *As pesquisas foram realizadas no *Science Direct*, *Pubmed* e *Google Scholar* com as palavras-chaves “*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *industry*,
273 *Brazil*”. Foram selecionados trabalhos publicados entre os anos de 2017-2023.

2.3 Ecologia microbiana relacionada as indústrias de alimentos

2.3.1 Conceito e técnicas

Anteriormente, a ecologia microbiana era definida como a associação de microrganismos multiespécies, que habitam determinado ambiente e interagem entre si (KONOPKA, 2009). Atualmente, o conceito se tornou mais amplo e foi definido como microbioma (BERG et al., 2020). O microbioma é composto pela associação entre a microbiota e a suas atividades/funções. A microbiota pode ser determinada mediante descrição taxonômica de quais bactérias, fungos, bolores e leveduras habitam determinado organismo, alimento ou superfície. A função das atividades desses microrganismos são mensuradas por meio de (1) elementos estruturais presentes nos microrganismos, como proteínas, lipídeos, polissacarídeos, ácidos nucleicos e elementos genéticos móveis; (2) metabólitos ou moléculas sinalizadoras, ao exemplo das toxinas e as (3) condições ambientais envolvidas, como temperatura, tipo de superfície de contato, pH, dentre outros. Desse modo, o microbioma é caracterizado por um ecossistema dinâmico envolvendo a interação da comunidade microbiana e o ambiente residente, no qual os microrganismos expressam diferentes atividades que moldam um nicho ecológico específico (SABATER et al., 2021).

Existem técnicas baseadas, principalmente, em análises de ácidos nucleotídeos que podem ser utilizadas para avaliar o microbioma, permitindo analisar os membros de um determinado ecossistema sem a necessidade de cultivo (COCOLIN et al., 2013). Técnicas como o sequenciamento do amplicon direcionado ou sequenciamento *shotgun* podem ser utilizadas para descrever a ecologia microbiana ou o microbioma de diferentes matrizes alimentares, em ambos, os ácidos nucleicos são extraídos diretamente das amostras (COCOLIN et al., 2013; SEQUINO et al., 2022).

Para a técnica do sequenciamento do amplicon, é necessária uma etapa de reação da cadeia da polimerase (PCR) com a finalidade de selecionar o alvo desejado, no caso das bactérias pode ser utilizado o gene 16S ribossomal RNA (CLAESSON et al., 2010). A partir da mistura do genoma de diferentes microrganismos extraídos em uma amostra, as leituras são comparadas com bancos genéticos de referência e a partir disso obtêm-se a composição taxonômica da microbiota, em unidades

taxonômicas operacionais (OTUs) (DE FILIPPIS et al., 2018). A partir do número de sequências obtidas para a mesma OTU, pode-se estimar os índices de distribuição relativa e absoluta das OTUs em determinada amostra ou grupos de amostras, bem como mensurar a alfa e beta diversidade microbiana encontradas nos ecossistemas (DE FILIPPIS et al., 2021; SEQUINO et al., 2022). Essa técnica apresenta menor custo por amostra, contudo, a caracterização da ecologia microbiana é influenciada pelo número de genes que codificam o gene 16S rRNA por genoma e pelo menor poder de discriminação a nível de espécie da ecologia (FERROCINO et al., 2022).

A técnica de sequenciamento *shotgun* caracteriza o material genético de toda a amostra. Desse modo, o DNA ou RNA (após síntese do cDNA) é fragmentado por meio de métodos enzimáticos ou mecânicos antes do sequenciamento. Esses fragmentos são sequenciados para obter as leituras, ao final do processo essa técnica pode mensurar todo o potencial genômico das populações microbiana encontrada nas amostras (DE FILIPPIS et al., 2018). Desse modo, fornece dados que auxiliam na interpretação da composição taxonômica das amostras, e identifica a presença e abundância de genes de interesse para reconstruir vias metabólicas e expressão de proteínas (DE FILIPPIS et al., 2018; SEQUINO et al., 2022). No entanto, as descrições das características funcionais e metabólicas podem demandar mais tempo de avaliação, visto ao baixo número de banco de dados pré-existentes para comparação.

Os indicadores de diversidade podem ser mensurados pela diversidade alfa e beta. A diversidade alfa avalia a abundância relativa de espécies microbianas no espaço e no tempo dentro da mesma comunidade, ou seja, na mesma amostra biológica. Essa análise leva em consideração a riqueza e a uniformidade dos microrganismos, sendo a riqueza avaliada pelo número de espécies diferentes presentes em determinada comunidade e a uniformidade é mensurada pelo tamanho da população de cada uma das espécies, avaliando a proporção da distribuição da abundância de espécies em uma comunidade (KIM et al., 2017; DALY et al., 2018). Desse modo, o índice de diversidade de *Shannon's* leva em consideração a riqueza da comunidade e os índices de *Simpson* e *Pielou's Evenness* levam em consideração a uniformidade das espécies em determinada comunidade (KIM et al., 2017). A diversidade beta avalia a mudança da diversidade entre comunidades distintas, servindo para comparar grupos de amostras diferentes com base nas abundâncias ou ocorrências das espécies (IKNAYAN et al., 2014). O índice de *Jaccard* compara qualitativamente indivíduos de dois ou mais grupos para observar quais desses

indivíduos são compartilhados ou distintos entre os grupos e o teste de *Bray-Curtis* avalia de forma quantitativa essa dissimilaridade (SOMERFIELD, 2008; IKNAYAN et al., 2014).

Essas ferramentas trazem informações relevantes para segurança dos alimentos, mediante dados mais abrangentes e confiáveis (FERROCINO et al., 2022). Desse modo, podem ser utilizadas para descrever a ecologia microbiana ou o microbioma de alimentos e instalações, bem como auxiliar nas avaliações da eficácia dos processos de higienização e de pontos críticos de controle para redução de patógenos (QUIJADA et al., 2018; BRIDIER et al., 2019; HASCOËT et al., 2019; CALERO et al., 2020; COBO-DÍAZ et al., 2021; CHERIFI et al., 2022).

2.3.4 Ecologia microbiana encontrada nas superfícies de diferentes indústrias de alimentos

A colonização bacteriana em diferentes instalações nas indústrias de alimentos é inerente ao processo de obtenção de alimentos, tornando-se um habitat natural para bactérias, vírus, fungos e algas (FERROCINO et al., 2022). Alguns fatores relacionados ao ambiente industrial podem influenciar sobre a composição, diversidade e abundância desses microrganismos, como a composição das superfícies e *design* dos equipamentos e utensílios, presença de resíduos orgânicos, tipo de matéria-prima processada, qualidade da água, manuseio incorreto de produtos químicos utilizados para a higienização, falhas operacionais dos colaboradores e fatores ambientais (DE FILIPPIS et al., 2021). Todas essas causas contribuem para a seleção de uma microbiota residente ou transitória adaptada a cada ambiente industrial, promovendo a formação de nichos ecológicos.

Há uma grande diversidade taxonômica entre as indústrias de alimentos e parece que o tipo de alimento processado em cada local pode interferir diretamente nesta ecologia (Tabela 2). Nos laticínios, as culturas iniciadoras utilizadas na preparação de queijos, iogurtes, leites fermentados e outros produtos são capazes de colonizar as superfícies (Tabela 2). Stellato et al. (2015), Kable et al. (2019) e Maes et al. (2019) identificaram a presença de *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus* e *Lactococcus* coabitando tanto amostras de superfícies de equipamentos e utensílios como de produtos. No ambiente de produção de queijos, microrganismos como

Halomonas, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* e *Staphylococcus equorum* que desempenham papel importante no processo de maturação de queijos de casca lavada, dominaram a microbiota das superfícies de uma queijaria na Áustria e foram isolados de produtos e equipamentos (QUIJADA et al. 2018). Nesses locais, devido ao tempo de adaptação microbiana, esses microrganismos são responsáveis por conferir características organolépticas desejáveis aos produtos (QUIJADA et al. 2018). Microrganismos que podem afetar a qualidade higienicossanitária dos produtos foram encontrados compondo a ecologia microbiana de um latícínio no Brasil (Tabela 2), dentre eles *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Enterococcus faecium* e enterobactérias foram os principais. Frazilio et al. (2019) identificaram que a principal causa de contaminação estava relacionada a baixa qualidade microbiológica do leite e falhas nos processos térmicos empregados, assim como tolerância ao processo de higienização.

Na indústria de suínos (Tabela 2), *Psychrobacter*, *Enhydrobacter* e *Moraxella* que são microrganismos dominantes da microbiota de suínos saudáveis, foram responsáveis por compor a microbiota residente das instalações de processamento de cortes cárneos de suínos na França, Espanha e Áustria (BRIDIER et al., 2019; COBO-DIÁZ et al., 2021; ZWIRZITZ et al., 2021). Outros constituintes dessas superfícies foram *Chryseobacterium*, *Anaerobacillus*, *Anoxybacillus*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Macroccoccus*, os quais estavam relacionados a contaminação durante o processo de manipulação dos cortes cárneos (CALERO et al., 2020; COBO-DIÁZ et al., 2021; ZWIRZITZ et al., 2021). A sobrevivência desses microrganismos nestes ambientes estava relacionada a capacidade de formar biofilme nas superfícies e tolerar a ação de sanitizantes (BRIDIER et al., 2019, CALERO et al., 2020; COBO-DIÁZ et al., 2021; ZWIRZITZ et al., 2021).

Pseudomonas e *Acinetobacter* foram os gêneros microbianos mais descritos compondo a ecologia microbiana das superfícies de laticínios (CLERO et al., 2012; STELLATO et al., 2015; FRAZILIO et al., 2019; KABLE et al., 2019; RODRIGUEZ-LOPES et al., 2019; WANG et al., 2019), de produtos lácteos prontos para o consumo (FAGERLUND et al., 2017; MAES et al., 2019), de abatedouros de suínos (BRIDIER et al., 2019; HASCOËT et al., 2019; CALERO et al., 2020; COBO-DIAZ et al., 2021; ZWIRZITZ et al., 2022; CHERIFI et al., 2022), de indústrias de carnes processadas (MAES et al., 2019; BOTTA et al. 2019; CARABALLO GUZMÁN et al., 2020), de ovos (MAES et al., 2019) e de carnes de frango, suína e bovina (WAGNER et al., 2020).

A presença desses microrganismos nesses ambientes pode ser oriunda da

contaminação da matéria-prima, visto que *Pseudomonas* e *Acinetobacter* são encontrados em solos, água e vegetações. No ambiente industrial, apresentam a capacidade de formar biofilme e toleram a ação de diferentes sanitizantes (Tabela 2). Fagerlund et al. (2017) demonstraram que diferentes superfícies de uma indústria de produtos prontos para o consumo eram fontes de contaminação de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* após o processo de limpeza e sanitização, em avaliações *in vitro* esses microrganismos dominaram a ecologia microbiana multiespécies dos biofilmes, apresentando tolerância ao ácido peracético e amônio quaternário. Outro fator que favorece a adaptação desses microrganismos ao ambiente industrial é a característica psicrófila, visto que nesses locais são empregadas baixas temperaturas durante a fabricação dos produtos (FAGERLUND et al., 2017; CABO-DÍAZ et al., 2021). Esses microrganismos são considerados importantes deteriorantes de alimentos, Maes et al. (2019) identificaram a produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas em isolados de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* oriundos das indústrias de produtos prontos para o consumo, laticínio, carnes frescas e ovos. *Pseudomonas* e *Acinetobacter* também foram os maiores reservatórios de genes de resistência β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos e quinolonas em uma indústria de processamento de carne suína na Espanha (CABO-DÍAZ et al., 2021).

A ecologia microbiana pode apresentar influência positiva ou negativa sobre a presença de patógenos nesses ambientes industriais (Tabela 2). *Acinetobacter* apresentou correlação positiva com o isolamento de *Salmonella* sp. em um abatedouro de suínos e *Enhydrobacter* foi considerado um inibidor do crescimento desse microrganismo nesta instalação (BRIDIER et al., 2019). *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Janthinobacterium*, *Brachybacterium* e *Carnobacterium* foram gêneros bacterianos relacionados com a presença de *L. monocytogenes* em diferentes indústrias de cortes cárneos de suínos (HASCOËT et al., 2019; ZWIRZITZ et al., 2021; CHERIFI et al., 2022) e laticínio (RODRÍGUES-LOPES et al., 2019). Assim como, Cherifi et al. identificou correlação negativa de seis gêneros microbianos, *Herminiimonas*, *Bryobacter*, *Caulobacter*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, com a presença de *L. monocytogenes* em abatedouro de suínos.

Desse modo, inúmeros métodos e locais de avaliação podem ser adotados para avaliar a ecologia microbiana das indústrias de alimentos. As informações geradas a partir dessas análises podem auxiliar para descrever a taxonomia dos microrganismos, avaliar rotas metabólicas, perfil de resistência a antibióticos e

442 marcadores de transferência de genes de virulência, bem como, avaliar pontos
443 específicos de contaminação recorrente por patógenos (Tabela 2). Essas
444 metodologias são aplicadas em diversos países, principalmente na Europa, Estados
445 Unidos e Canadá (Tabela 2), possivelmente pelo fácil acesso a novas biotecnologias,
446 baixo custo de execução e aplicabilidade entre os diferentes tipos de indústrias.
447 Entretanto, no Brasil essas ferramentas não são difundidas entre as indústrias, o que
448 faz com que estas análises apresentem alto custo de implementação e execução,
449 dificultando a realização das mesmas. Desse modo, deve-se fomentar a inclusão de
450 novas metodologias entre a comunidade científica brasileira e industrial por meio de
451 parcerias, com a finalidade de caracterizar os diferentes nichos ecológicos.

452 Tabela 2: Descrição da ecologia microbiana das superfícies de ambientes, equipamentos e utensílios em diferentes indústrias de alimentos.

Indústria	País	Técnica	Ecologia microbiana	Observações	Referência
Laticínio	Portugal	Cultivo e sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados.	<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Stenotrophomonas</i>	Sem observações.	Cleto et al. (2012)
Laticínio	Itália	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Acinetobacter johnsonii</i> e <i>Psychrobacter</i> spp.	Sem observações	Stellato et al. (2015)
Produtos cárneos pronto para o consumo	França	Cultivo e sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados.	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Epilithonimonas</i>	Alta tolerância de <i>Pseudomonas</i> e <i>Acinetobacter</i> após C&D	Fagerlund et al. (2017)
Laticínio	Áustria	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Brevibacterium</i> spp., <i>Halomonas boliviensis</i> , <i>Halomonas meridiana</i> , <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> , <i>Halomonas malariantartica</i> , <i>Halomonas variabilis</i> , <i>Psychrobacter faecalis</i>	Ecologia microbiana central das superfícies industriais difere dos produtos	Quijada et al. (2018)
Abatedouro de suínos	França	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Enhydrobacter</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Rothia</i>	Correlação positiva da presença de <i>Salmonella</i> com <i>Acinetobacter</i> . Correlação negativa de <i>Salmonella</i> com <i>Enhydrobacter</i>	Bridier et al. (2019)
Laticínio	Brasil	Cultivo e sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas alcaligenes</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus hirae</i>	Considerada apenas as amostras de equipamentos e utensílios	Frazilio et al. (2019)
Indústria de suínos	Espanha	Cultivo e sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados.	<i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., diferentes enterobactérias, <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp.	Utilização de cupons de aço inoxidável na superfície, submetidos a colonização e C&D. Relação da presença de <i>L. monocytogenes</i> com	Hascoët et al. (2019)

<i>Pseudomonas</i>					
Laticínio	Estados Unidos	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Streptococcus, Bacillus, Pseudomonas, Anoxybacillus, Acinetobacter, Lactococcus</i>	Após processo CIP	Kable et al. (2019)
Indústria de produtos pronto para o consumo, laticínio, carne e ovos	Bélgica	Cultivo e sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados	Produtos pronto para o consumo: <i>Pseudomonas, Microbacterium</i> Laticínio: <i>Streptococcus, Microbacterium, Bacillus, Brevundimonas</i> Carne: <i>Stenotrophomonas, Pseudomonas, Microbacterium, Rothia</i> Ovos: <i>Staphylococcus, Stenotrophomonas, Pseudomonas</i>	Isolados apresentavam a produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas relacionadas de deterioração de alimentos	Maes et al. (2019)
Indústria de carne, pescado e laticínio	Espanha	Sequenciamento do gene 16S rRNA	Carne: <i>Lactobacillus, Psychrobacter, Microbacterium</i> Pescado: <i>Pseudoalteromonas, Paracoccus, Photobacterium</i> Laticínio: <i>Acinetobacter, Pseudomonas, Lactococcus</i>	Estudo realizado em amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i>	Rodríguez-López et al. (2019)
Laticínio	China	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Acinetobacter, Pseudomonas, Bacillus, Comamonas, Exiguobacterium</i>	Amostras de biofilmes	Wang et al., (2019)
Ambiente de três indústrias de processamento de carne	Itália	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Streptococcus, Staphylococcus, Propionibacterium, Acinetobacter, Carnobacterium, Brochothrix, Pseudomonas, Achromobacter e Psychrobacter</i>	<i>Acinetobacter, Psychrobacter e Pseudomonas</i> foram mais abundantes	Botta et al. (2020)
Abatedouro de suínos	Espanha	Sequenciamento <i>shotgun</i> (Extração total do DNA)	<i>Lactobacillus, Acinetobacter, Aerococcus, Staphylococcus, Macroccoccus</i>	Presença de genes de estresse ambiental (choque térmico, morte celular, formação de biofilme e resistência a antibióticos)	Calero et al. (2020)
Fábricas de massas e indústrias de produtos cárneos processados	Colômbia	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Pseudomonas, Acinetobacter, Leuconostoc, Lactobacillus, Streptococcus, Escherichia coli.</i>	Sem observações.	Caraballo Guzmán et al. (2020).
Processamento de carne bovina, suína e de aves	Áustria	Cultivo, MALDI-TOF e sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados.	<i>Brochothrix, Pseudomonas e Psychrobacter</i>	Amostras de biofilme após C&D	Wagner et al. (2020)

Indústrias de processamento de carne suína	Espanha	Sequenciamento <i>shotgun</i> (Extração total do DNA)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Psychrobacter</i>	<i>Pseudomonas</i> e <i>Stenotrophomonas</i> reduziram sua abundância ao longo do tempo de avaliação e <i>Acinetobacter</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Brevundimonas</i> e <i>Acidovorax</i> aumentaram. <i>Acinetobacter</i> e <i>Pseudomonas</i> foram os maiores reservatório de genes de resistência a β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos e quinolonas.	Cobo-Díaz et al. (2021)
Indústrias de processamento de carne suína	Áustria	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Anaerobacillus</i> , <i>Anoxybacillus</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Janthinobacterium</i> , <i>Brachybacterium</i> e <i>Carnobacterium</i> obtiveram correlação positiva com <i>L. monocytogenes</i> .	Zwirzitz et al. (2021)
Abatedouro de suínos	Canadá	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Chryseobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i> e <i>Acinetobacter</i> foram mais abundantes em amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> e <i>Sphingomonas</i> em amostras negativas. <i>Pseudomonas</i> interagiu positivamente com <i>L. monocytogenes</i> e <i>Hermiimonas</i> , <i>Bryobacter</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Mycobacterium</i> , negativamente.	Cherifi et al. (2022)

454 *As pesquisas foram realizadas no *Science Direct*, *Pubmed* e *Google Scholar* com as palavras-chaves “*Microbial ecology*, *microbiome*,
455 *food industry*, *Listeria monocytognes*, *Salmonella*”. Foram selecionados trabalhos publicados entre os anos de 2012-2023.

4 OBJETIVOS

- Avaliar a qualidade higienicossanitária das superfícies de equipamentos e utensílios após o processo de higienização pré-operacional em indústrias de processamento de aves, suínos e derivados lácteos; avaliar a presença, virulência e fatores relacionados a formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. e identificar a ecologia microbiana presente nestas instalações.

- Avaliar a eficácia do processo de higienização pré-operacional em uma indústria de processamento de cortes cárneos de aves, por meio da ecologia microbiana, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e microrganismos indicadores.

- Avaliar a dinâmica de formação de biofilmes puros e multiespécies de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante em superfície de polipropileno e avaliar a ação de Thymol e Carvacrol (THY+CAR), nanopartículas de Prata e Óxido de Zinco (AgNPs+ZnONPs) e Ácido Lático e Acético (AL+AA) na inibição da formação de biofilmes multiespécies, por meio da contagem das células viáveis, ecologia microbiana e arquitetura.

CAPÍTULO 2

Trabalho foi submetido para a revista *Food Research International*.
ISSN Online: 1095-9998.

Trabaho está formatado de acordo normas da revista
(<https://www.elsevier.com/journals/food-research-international/0963-9969/guide-for-authors>)

Caracterização da ecologia microbiana, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. de superfícies de equipamentos e utensílios em indústrias brasileiras de aves, suínos e derivados lácteos

Leonardo Ereno Tadielo^a, Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos^a, Fábio Sossai Possebon^a, Jhennifer Arruda Schmiedt^b, Lara Cristina Bastos Juliano^a, Camila Koutsodontis Cerqueira-Cézar^a, Janaina Prieto de Oliveira^a, Aryele Nunes da Cruz Encide Sampaio^a, Patrícia Regina Lopes Melo^a, Evelyn Fernanda Flores Caron^a, José Paes de Almeida Nogueira Pinto^a, Luciano dos Santos Bersot^b, Juliano Gonçalves Pereira^a

^a São Paulo State University (UNESP), Botucatu campus, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Distrito de Rubião Jr, SN, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^b Federal University of Paraná (UFPR), Palotina campus, Department of Veterinary Sciences, Rua Pioneiro, 2153, Jardim Dallas, 85950-000 Palotina, PR, Brazil.

*Corresponding authors

Juliano Gonçalves Pereira: juliano.pereira@unesp.br

Luciano dos Santos Bersot: lucianobersot@ufpr.br

21 **Resumo**

22 Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade higienicossanitária, presença,
23 virulência e fatores relacionados a formação de biofilme de *L. monocytogenes* e
24 *Salmonella* sp. e identificar a ecologia microbiana de indústrias brasileiras de aves,
25 suínos e laticínio. Foram coletadas 480 amostras de superfícies de equipamentos e
26 utensílios por meio de *swabs* estéreis para contagem de aeróbios mesófilos,
27 Enterobacteriaceae, *E. coli* e *Pseudomonas* sp. e detecção de *L. monocytogenes* e
28 *Salmonella* sp. A ecologia microbiana foi avaliada por sequenciamento do gene 16S
29 rRNA, avaliando a densidade relativa, alfa e beta diversidade. Para *L. monocytogenes*
30 e *Salmonella* sp. foi avaliado genes de virulência e formação de biofilme e
31 determinada a capacidade de adesão. A contagem de aeróbios mesófilos foi mais
32 elevada no laticínio, seguido pelo abatedouro de suínos e aves. *L. monocytogenes* foi
33 detectada nas três indústrias, o abatedouro de suínos apresentou a maior ocorrência,
34 seguido por aves e laticínio. *Salmonella* sp. foi detectada apenas no laticínio. Todos
35 os isolados de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. abrigavam genes de virulência e
36 formação de biofilme, com fraca capacidade de adesão. A diversidade alfa foi
37 abundante e o tipo de indústria influenciou na diversidade beta. *Pseudomonas*,
38 *Acinetobacter* e *Aeromonas* foram contaminantes frequentes para o abatedouro de
39 aves; *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Brevundimonas* para suínos e *Pseudomonas*,
40 *Kocuria* e *Staphylococcus* para o laticínio. Nossos resultados fornecem informações
41 importantes para entender o risco microbiológico de contaminação e seus impactos
42 sobre a eficácia dos programas de higienização.

43

44 **Keywords:** biofilmes, diversidade microbiana, indústria alimentícia, microbiota
45 acompanhante, limpeza e sanitização, ocorrência de patógenos

1 Introdução

Durante o processo de produção de alimentos na indústria há a passagem e contato dos produtos de origem animal com equipamentos e utensílios que podem servir de fontes constantes de contaminação microbiana para os alimentos (Maes et al., 2019; De Filippis, Valentino, Alvarez-Ordóñez, Cotter, & Ercolini, 2021). Uma vez contaminadas, estas superfícies também podem ser reservatórios de microrganismos deteriorantes e patogênicos (Vidal et al., 2017; Sereno et al., 2019; Song, Wang, & Xu, 2021; Agostinho Davanzo et al., 2021).

A fim de remover as sujidades e reduzir a contaminação a níveis aceitáveis, rotineiramente são aplicados os Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO) em superfícies que entram em contato com os alimentos por meio da limpeza e sanitização (Brasil, 2003; Møretrø & Langsrud, 2017). Contudo, falhas nestes procedimentos podem influenciar a sobrevivência de microrganismos afetando a qualidade e a inocuidade dos produtos finais (Saini et al., 2011; Agüeria, Libonatti, & Civit, 2020).

Normalmente, o controle da eficiência do PPHO é feito por meio da contagem de microrganismos indicadores ou por outros métodos, como a bioluminescência. Essas técnicas mensuram os microrganismos viáveis ou detectam indiretamente a presença deles (Corbitt, Bennion, & Forsythe, 2000; Rodrigues et al., 2018), contudo, a ecologia microbiana dificilmente pode ser mensurada. Uma alternativa que vem se popularizando é o uso da técnica do sequenciamento do gene 16S rRNA, que identifica de maneira geral a diversidade microbiana, permitindo sua quantificação em amostras diversas, podendo indicar mudanças na ecologia microbiana de acordo ao tipo de indústria, processo de obtenção, superfícies e momento de avaliação (Cobo-Díaz et al., 2021; Cherifi et al., 2022; Ferrocino, Rantsiou, & Cocolin, 2022).

Essa ferramenta tem sido utilizada para o monitoramento ambiental de indústrias que produzem alimentos prontos para o consumo, derivados lácteos e produtos cárneos *in natura* em países da União Europeia, Canadá e China e também para identificar microrganismos relacionados a biofilmes microbianos multiespécies nesses ambientes (Fagerlund, Møretrø, Heir, Briandet, & Langsrud, 2017; Hascoët, Ripolles-Avila, Guerrero-Navarro, & Rodríguez-Jerez, 2019; Maes et al., 2019; Wagner et al., 2020; Cobo-Díaz et al., 2021; Cherifi et al., 2022). No Brasil, alguns estudos foram realizados nas indústrias para descrever a ecologia microbiana de carcaças de frango (Kunert-Filho et al., 2022) e produtos lácteos (Endres et al., 2021; da Silva Abreu et al., 2021), no entanto, não foram encontradas pesquisas que tenham avaliado quais microrganismos estão associados a contaminação de equipamentos e utensílios após a higienização em indústrias de aves, suínos e derivados lácteos.

Sabe-se que microrganismos como *Pseudomonas* e *Acinetobacter* são listados entre os principais contaminantes do ambiente industrial de produtos cárneos e lácteos, pois compõem grande parte da diversidade microbiana presente em biofilmes devido a capacidade de tolerar a ação de sanitizantes normalmente empregados nas indústrias (Stellato, De Filippis, La Stora, & Ercolini, 2015; Hascoët et al., 2019; Cobo-Díaz et al., 2021; Cherifi et al., 2022), além de contribuírem com a persistência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* em superfícies colonizadas (Fagerland et al., 2017; Cobo-Díaz et al., 2021; Cherifi et al., 2022). *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. são microrganismos oportunistas em biofilmes pré-formados por outros microrganismos, possuindo capacidade de se adaptar e sobreviver a privação de nutrientes, baixas temperaturas, oscilações de pH, elevadas concentrações de sal, baixa atividade de água, resistência a antibióticos e tolerância a sanitizantes nestes ambientes (Kadam et al., 2013, Tamber, 2018, Sereno et al., 2019, Agostinho

Davanzo et al., 2021), sendo identificados em indústrias de aves (Schäfer et al., 2017; Moura et al., 2019; Viana et al., 2020; Agostinho Davanzo et al., 2021), suínos (Serenó et al., 2019; Viana et al., 2019; Dos Santos et al., 2022) e laticínios (Oxaran et al., 2017; Prates et al., 2019) no Brasil.

Desse modo, o monitoramento constante de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. e avaliação ecológica do ambiente de processamento de alimentos pode ser um importante fator para a avaliação da segurança dos produtos, bem como, a investigação da população das comunidades microbianas presentes de acordo aos diferentes alimentos processados e tipos de superfícies de contato permite entender a ecologia microbiana do ecossistema, conferindo ações mais eficientes na produção dos alimentos (Fagerlund et al., 2017; Gu et al, 2019).

Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a qualidade higienicossanitária das superfícies de equipamentos e utensílios após o processo de higienização pré-operacional em indústrias de processamento de aves, suínos e derivados lácteos; avaliar a presença, virulência e fatores relacionados a formação de biofilme de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. e identificar a ecologia microbiana presente nestas instalações.

2 Material e métodos

2.1 Amostragem

O estudo foi desenvolvido em três indústrias de alimentos localizadas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, sendo um abatedouro de aves, um abatedouro de suínos e um laticínio. Os abatedouros de aves e suínos tinham capacidade para abater em torno de 550 mil aves e 2 mil suínos por dia, respectivamente; o laticínio processava em torno de 65 mil litros de leite por dia. Todas as indústrias possuíam

certificação sanitária oficial por meio do Serviço de Inspeção Federal (SIF), as quais apresentavam habilitação para exportação. A temperatura média das salas de processamento das indústrias foi ajustada para 10 ± 1 °C durante o estudo. O processo de higienização nas três indústrias era constituído pela etapa de limpeza, por meio da lavagem inicial, detergente alcalino espumante e enxague final, seguido pela sanitização com ácido peracético 0,5% por 10 min. Foram coletadas um total de 480 amostras de diferentes superfícies de equipamentos e utensílios do abatedouro de aves (n=160), do abatedouro de suínos (n=160) e do laticínio (n=160) (Tabela 1), distribuídas em doze coletas (quatro coletas em cada indústria) entre setembro de 2020 a junho de 2021.

Cada amostra foi composta por 14 áreas de 100 cm² (moldes de 10 x 10 cm) da mesma superfície, perfazendo uma área total de 1.400 cm². As 14 áreas de 100 cm² originaram quatro sub-amostras, sendo três sub-amostras de 400 cm² submetidas a contagem de microrganismos indicadores, pesquisa de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. e uma sub-amostra de 200 cm² submetida as análises de identificação da ecologia microbiana (Figura suplementar 1). As amostras foram coletadas por fricção de swabs estéreis previamente hidratados com *Lethen Broth* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

2.2 Contagem de microrganismos indicadores da qualidade higienicossanitária

As amostras (4 swabs = 400 cm², Figura suplementar 1) das superfícies de equipamentos e utensílios foram submetidos a contagem de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. Para a contagem de aeróbios mesófilos foi adotado metodologia ISO 4833-1 (ISO, 2013), onde 1 mL de *Lethen Broth* (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi inoculado em placas contendo *Plate*

Count Agar (PCA, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) e incubados a $30\pm 1^{\circ}\text{C}/72\pm 3\text{h}$. A contagem de Enterobacteriaceae seguiu metodologia ISO 21528-2 (ISO, 2004), onde 1 mL da solução foi inoculada em placas de *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBGA, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) com posterior sobrecamada e incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}/24\pm 2\text{h}$. A contagem de *E. coli* foi de acordo ISO 16649-1 (ISO, 2018), onde 1 mL da solução foi inoculada em placas *Tryptone-bile-glucuronic Medium* (TBX, Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubado a $44\pm 1^{\circ}\text{C}/24\pm 1\text{h}$. A contagem de *Pseudomonas* sp. seguiu ISO 13720 (ISO, 2010) com modificações, onde 0,1 mL da solução foi inoculado na superfície de *Cetrimide Selective Agar* (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) e incubado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}/48\pm 2\text{h}$, cinco colônias características foram submetidas ao teste da oxidase para confirmação dos isolados como pertencentes à família Pseudomonadaceae (Oxidase positiva). Todos os resultados foram expressos em log UFC/cm².

2.3 Isolamento, sorotipificação e virulência de *L. monocytogenes*

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada de acordo com ISO 11.290-1 (ISO, 2017) com modificações. As amostras (4 swabs = 400 cm², Figura suplementar 1) foram hidratadas com 90 mL de *Listeria Enrichment Broth* (LEB, Difco™) e incubadas a $30\pm 1^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. Após, 0,1 mL do enriquecimento foi transferido para *Fraser Broth* (Oxoid Ltd., Basingstoke, England), incubando a $37\pm 1^{\circ}\text{C}/24-48\text{h}$. A partir dos tubos que apresentarem hidrólise da esculina (escurecimento do caldo), foi realizada a inoculação em placas contendo *Chromogenic Listeria Agar* (ALOA, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) e *Oxford Listeria Agar* (OXA, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) com incubação a $37\pm 1^{\circ}\text{C}/48\text{h}$. Colônias características foram selecionadas, purificadas em *Tryptic Soy Agar* suplementado com 0,6% *Yeast Extract* (TSA-YE,

Oxoid Ltd., Basingstoke, England) e submetidas à confirmação e identificação bioquímica (provas de produção de catalase, produção de β -hemólise, motilidade, coloração de Gram e fermentação de dextrose, xilose, ramnose e manitol). Os isolados confirmados como *L. monocytogenes* nas provas bioquímicas foram submetidos ao protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação de espécie e sorotipificação molecular de acordo Doumith et al. (2004) (Tabela Suplementar 1). Os resultados foram expressos em presença ou ausência de *L. monocytogenes* em 400 cm². Nos isolados identificados, foi determinado o perfil genotípico de virulência por meio da presença dos genes *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hlyA* e *actA* proposto por Liu, Lawrence, Austin, & Ainsworth (2007), Paziak-Domanska et al. (1999) e Suárez & Vazquez-Boland (2001) (Tabela Suplementar 1). Para controle positivo da extração, amplificação e eletroforese foi utilizado *L. monocytogenes* ATCC 7644.

2.4 Isolamento, sorotipificação e virulência de *Salmonella* sp.

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada de acordo com ISO 6579 (ISO, 2017). As amostras (4 swabs = 400 cm², Figura suplementar 1) foram hidratadas com 90 mL de *Buffered Peptone Water* (APT, Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubadas a 37±1°C/18±2h. Após incubação, 1 mL do enriquecimento foi transferido para o *Muller-Kauffmann Tetrathionat Novobiocin Broth* (MKTTn, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) e 0,1 mL para *Rappaport-Vassiliadis Soya Broth* (RVS, Oxoid Ltd., Basingstoke, England), incubados a 37±1°C/24±3h e 41,5±1°C/24±3h, respectivamente. Posteriormente, uma alíquota foi inoculada em *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* (XLD, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) e *Bismuth Sulfite Agar* (BS, Oxoid Ltd., Basingstoke, England), incubados a 37±1°C/24±3h. Após, as colônias características

foram submetidas à provas bioquímicas (lisina, produção de H₂S, fermentação de açúcar, utilização de citrato, ureia, vermelho de metila, *Voges-Proskauer*, produção de indol e motilidade) e confirmadas por PCR por meio da presença do gene *invA* (Swamy, Barnhart, Lee, & Dreesen, 1996) (Tabela Suplementar 1). Os resultados foram expressos em presença e ausência de *Salmonella* sp. em 400 cm². Os isolados confirmados como *Salmonella* sp. foram remetidos ao Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) para sorotipificação de acordo antígenos somáticos e flagelares.e também foram caracterizados de acordo o perfil de virulência por meio dos genes *orgA*, *tolC*, *sifA*, *sipA*, *sipB* e *svpB* segundo Skyberg, Logue, & Nolan (2006) (Tabela Suplementar 1). Como controle positivo da extração, amplificação e eletroforese foi utilizado *S. Typhimurium* ATCC 14028.

2.5 Identificação da ecologia microbiana

Para avaliação da ecologia microbiana após o processo de higienização pré-operacional nas três indústrias foi realizada a técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA, adotando o critério de avaliação de 12,50% do total de amostras coletadas (n=60, sendo 20 amostras de cada indústria). As amostras (2 *swabs* = 200 cm², Figura 1) foram remetidos a empresa Neoprospecta Microbiome Technologies, SA, Florianópolis, SC, Brasil, para a extração do DNA, sequenciamento e análise de bioinformática.

As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 min a 4 °C, o DNA foi extraído por meio de *beads* magnéticas. A identificação foi realizada utilizando o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina Inc., USA), utilizando o kit V2 de 300 ciclos, *single-end*, sem normalização das bibliotecas. O preparo das

bibliotecas foi realizado com a amplificação dos *primers* para região V3-V4 do gene 16S rRNA, 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG, segundo Wang & Qian, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, segundo Caporaso et al., 2012).

As sequências foram analisadas por meio do *pipeline Sentinel*, os arquivos *fastq* foram avaliados quanto à qualidade *Phred* (QP) usando o programa *FastQC* v.0.11.8 (Andrews, 2010). A seguir, os arquivos *fastq* foram submetidos à triagem de *primers* e sequências com baixa qualidade (*Phred* < 20). O *software* utilizado para tal finalidade foi construído em *Python* v.3.6, sendo este inspirado nas funcionalidades do projeto *BioPython* (Cock et al. 2009). As identificações taxonômicas foram realizadas com *blastn* v.2.6.0+ (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990), usando como referência um banco de dados próprio ou público. Quanto a definição de uma espécie, dentre os 20 *hits* retornados para cada *cluster*, uma instrução em *Python* avaliava se um dos três quesitos seriam atendidos pelos *hits*: 1) maior *bit-score*, 2) menor *e-value*, e 3) taxonomias com maior representação. Os *hits* que atenderam um dos itens anteriores, foram escolhidos como espécie representante. Foram removidos da análise da ecologia microbiana do laticínio as *reads* das OTUs de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacoccus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactococcus lactis* pois eram constituintes dos fermentos empregados para a fabricação dos queijos na indústria durante os últimos seis meses que antecederam as coletas.

2.6 Determinação da capacidade de adesão e genes relacionados a formação de biofilme de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp.

Os ensaios para determinação da capacidade de adesão dos isolados de *L. monocytogenes* (n=17), *Salmonella* spp. (n=5) foram realizados em microplacas de

246 poliestireno, segundo Stepanović, Vuković, Dakić, Savić, & Švabić-Vlahović (2000).
247 De cada isolado foram adicionados 10 µL em 3 mL de *Tryptone Soya Broth* (TSB,
248 Oxoid Ltd., Basingstoke, England) e incubado a $37\pm0,5^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. Após incubação, os
249 caldos foram ajustados em 0,5 na escala de McFarland e alíquotas em triplicata de
250 200 µL de cada isolado foram transferidas para poços da microplaca de poliestireno
251 de 96 poços com fundo chato (Nest[®], Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) e
252 incubados a $35\pm2^{\circ}\text{C}/24\pm2\text{h}$. Em cada placa, três poços foram preenchidos com 200
253 µL de TSB não inoculado, utilizados como controle negativo. Após o período de
254 incubação, os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato estéril
255 (PBS, pH 7,2) (250µL/poço), fixadas com 200 µL de metanol a 99% por 15 min e
256 submetidas à secagem em temperatura ambiente. Após esse período, os poços foram
257 corados com 200 µL de violeta de cristal 1% por 15 min. Para remoção do corante, os
258 poços foram lavados três vezes com água destilada estéril e mantidos em temperatura
259 ambiente para secagem. Para leitura, foram adicionados 160 µL por poço de álcool
260 etílico 99% (v/v) e a absorbância foi verificada em leitora de microplacas a 450 nm.
261 Foi utilizado *S. Typhimurium* ATTC 14028 como controle positivo para *Salmonella*
262 spp., *L. monocytogenes* ATCC 7644 para *L. monocytogenes*.

263 A classificação da adesão foi realizada de acordo com Stepanović et al. (2000),
264 onde a avaliação média dos resultados da absorbância de cada amostra (DOa) foi
265 comparado com a média da absorbância dos controles negativos acrescido de três
266 vezes o desvio padrão (DOcn). Para determinar o grau de adesão foi utilizada a
267 classificação proposta por Stepanović et al (2000): não aderente ($\text{DOa}\leq\text{DOcn}$),
268 fracamente aderente ($\text{DOcn}<\text{DOa}\leq 2.\text{DOcn}$), moderadamente aderente ($2.\text{DOcn}<$
269 $\text{DOa}\leq 4.\text{DOcn}$) e fortemente aderente ($4.\text{DOcn}<\text{DOa}$). Todos os testes foram
270 realizados em duas repetições e os resultados expressos em média.

Os isolados foram submetidos à PCR para identificação da presença de genes relacionados a formação de biofilme, como *prfA*, *flaA*, *agrBCDA* e *luxS* para *L. monocytogenes* e *adrA*, *agfD*, *sidA*, *csgBD*, *luxS* e *rpoS* para *Salmonella* sp. (Tabela Suplementar 1). Para extração do DNA dos isolados de *L. monocytogenes* foi adotada a metodologia descrita por Peres et al. (2010) com adição de lisozima (10 mg/mL, Ludwig Biotecnologia Ltda) e Proteinase K (10 mg/mL, Ludwig Biotecnologia Ltda), para *Salmonella* spp. seguiu-se o protocolo descrito por Dias et al. (2016). As condições das reações foram de acordo protocolos descritos para cada gene avaliado conforme descrito na Tabela suplementar 1. Para controle da extração, amplificação e eletroforese foi utilizado *S. Typhimurium* ATTC 14028 e *L. monocytogenes* ATCC 7644.

2.7 Análises estatísticas

A partir dos resultados da quantificação de aeróbios mesófilos, enterobacteriaceae e *Pseudomonas* sp. (log UFC/cm²) obteve-se a média e desvio padrão para cada grupo de microrganismo de acordo ao tipo de indústria (Poultry, Pork e Dairy). Para avaliar se houve diferença nas médias das contagens foi realizado o teste ANOVA seguido do teste Tukey, e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os resultados da presença de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. foram expressos em porcentagem e submetidos ao *Chi-Square Test* (SAS Institute, Cary, NC, US) para verificar a associação entre a prevalência de cada patógeno de acordo ao tipo de indústria (Poultry, Pork e Dairy) adotando significância de $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com auxílio do *Statistical Analysis Software* - SAS Institute (Cary, NC, US).

Os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA foram expressos em

reads para cada amostra e posteriormente foram tabulados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) realizando o cálculo da distribuição relativa (%DR) para filos, ordens, classes, famílias, gêneros e espécies para cada indústria (Poultry, Pork e Dairy). Foram avaliados a métrica de diversidade alfa, pelos testes de *Shannon's diversity index*, *Observed OTUs* e *Evenness* e métrica de diversidade beta, por meio dos testes de dissimilaridade de *Bray-Curtis distance* e *Jaccard distance*, com seus resultados expressos graficamente por meio da análise das coordenadas principais (PCoA). Para avaliar a existência de diferença na abundância para os gêneros e as espécies dos microrganismos identificados de acordo ao tipo de indústria (Poultry, Pork e Dairy) foi realizada a análise de ANCOM. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa QIIME 2 2017.4 (Bolyen et al. 2019). Foi realizado o diagrama de Venn para descrição de OTUs com DR>1% de acordo a distribuição dos gêneros e espécies em cada indústria por meio do programa Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

3 Resultados

3.1 A contagem de microrganismos indicadores de higiene foi influenciada pelo tipo de indústria

As contagens de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, *E. coli* e *Pseudomonas* sp. sofreram variação de acordo ao tipo de indústria (Figura 1). As amostras avaliadas no laticínio apresentaram as maiores contagens médias para todos os grupos avaliados, seguido pelo abatedouro de suínos e aves ($P<0,05$) (Figura 1)

3.2 *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. foram isoladas em diferentes locais nas indústrias

A frequência geral de amostras positivas para *L. monocytogenes* foi de 1,87% (n=9/480). Obtivemos o maior número de amostras com a presença do patógeno (n=5, 3,1%) no abatedouro de suínos, seguido por aves (n=3, 1,9%) e laticínio (n=1, 0,6%), sem diferença estatística ($P>0,05$). No abatedouro de suínos, detectamos *L. monocytogenes* em superfícies de corte (n=2, 1,25%), misturador de carne para fabricação de embutidos (n=2, 1,25%) e em esteiras plásticas transportadoras de cortes cárneos (n=1, 0,6%), essas superfícies apresentavam desgaste devido ao elevado tempo de uso. No abatedouro de aves, *L. monocytogenes* foi isolada em duas esteiras plásticas (n=3, 1,9%) que exibiam ranhuras e alterações na coloração. Já no laticínio, detectamos *L. monocytogenes* na superfície de equipamento utilizado para fabricação de queijos (n=1, 0,6%), equipamento este utilizado na etapa inicial da fabricação de diferentes queijos.

De uma forma geral, identificamos *Salmonella* sp. em 0,42% das amostras (n=2/480), tendo sido isolada em apenas duas amostras no laticínio (n=2, 1,2%), uma em cubas de aço inoxidável (n=1, 0,6%) empregados na etapa da salga dos queijos e a outra em prateleira plástica utilizada na maturação de queijos (n=1, 0,6%).

3.3 Os sorotipos de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. identificados apresentaram fatores relacionadas à virulência e formação de biofilme

Identificamos um total de 17 isolados de *L. monocytogenes* pertencentes a três sorogrupos distintos: I (1/2a, n=8, aves, suínos e laticínio), V (4b, n=7, suínos) e III (1/2b, n=2, suínos). Todos os isolados abrigavam genes relacionados à virulência, como o fator de internalização celular e disseminação célula a célula (*inlA*, *inlB*, *inlC*),

síntese de listeriolisina (*hlyA*) e polimerização de actina (*actA*). Todos os isolados apresentaram fraca capacidade de adesão em poliestireno e carreavam genes associados a adesão (*flaA*), formação de biofilme e tolerância as condições de estresse ambiental (*prfA*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* e *luxS*).

Identificamos cinco isolados de *Salmonella* sp., pertencentes aos sorotipos de *S. Muenchen* (80%, n=4, laticínio) e *S. enterica* subsp. *enterica* (20%, n=1, laticínio). Todos os isolados apresentaram genes relacionados ao reconhecimento e invasão celular (*invA*, *orgA*, *tolC*), formação de estrutura filamentosa (*sifA*) e sobrevivência e morte de macrófagos (*sipA*, *sipB*). De acordo ao perfil de adesão, 60% (n=3) dos isolados apresentaram fraca capacidade de adesão em poliestireno, contudo, todos carreavam os genes *adrA*, *agfA*, *agfD*, *sidA*, *csgB*, *csgD*, *luxS*, *rpoS* que estão associados a formação de biofilme.

3.4 A ecologia microbiana das superfícies industriais e sua distribuição relativa foi diferente de acordo ao tipo de indústria

A partir de 31 amostras (6,46%) determinamos a ecologia microbiana do estudo, sendo 12 do abatedouro de aves, 12 do abatedouro de suínos e sete de laticínio. As demais amostras foram retiradas do estudo pois não conseguimos obter DNA suficiente para o sequenciamento ou não passaram pelos critérios de qualidade durante as análises de bioinformática (nº de sequências ≤ 50 por amostra). Dessa forma, identificamos 601.234 sequências do gene 16S rRNA, sendo 28.625 oriundas do abatedouro de aves (Média=2.385, Mínimo=61, Máximo=11.955), 249.076 do abatedouro de suínos (Média=20.753, Mínimo=76, Máximo=223.082) e 323.533 do laticínio (Média=46.216, Mínimo=260, Máximo=221.003).

No abatedouro de aves as maiores densidades relativas (DR) que verificamos

foram para o filo Proteobacteria (88,84%) e a classe Gammaproteobacteria (75,59%) e as classes Pseudomonadales (61,96%), Enterobacteriales (6,61%) e Aeromonadales (5,27%) e as famílias, Pseudomonadaceae (45,21%), Moraxellaceae (16,97%) e Enterobacteriaceae (6,28%) foram as mais frequentes (Figura 2). No abatedouro de suínos, os filos Proteobacteria (87,85%) e Bacteroidetes (11,81%) e as classes, Gammaproteobacteria (69,80%), Alphaproteobacteria (14,76%) e Flavobacteriia (11,54%) foram os principais, as ordens, Pseudomonadales (64,25%), Flavobacteriales (11,54%) e Caulobacterales (12,43%) e as famílias, Moraxellaceae (40,66%), Pseudomonadaceae (23,59%) e Flavobacteriaceae (11,54%) foram as mais abundantes (Figura 2). No laticínio, Proteobacteria (69,69%), Actinobacteria (15,90%) e Firmicutes (14,20%) foram os filos mais frequentes, as classes Gammaproteobacteria (66,01%), Bacilli (18,62%) e Actinobacteria (15,09%) obtiveram as maiores DR, as ordens Pseudomonadales (55,12%), Actinomycetales (15,91%) e Enterobacteriales (11,45%) e as famílias, Pseudomonadaceae (53,96%), Micrococcaceae (15,68%) e Staphylococcaceae (15,68%) foram as mais abundantes (Figura 2).

Foram identificados 133 gêneros microbianos nas amostras do abatedouro de aves, desse total, apenas 13 foram os mais abundantes (DR>1%), sendo *Pseudomonas* (45,20%), *Acinetobacter* (16,54%), *Aeromonas* (5,27%) e *Mycobacterium* (3,63%) os principais (Figura 3). Em relação às espécies, das 311 que descrevemos, 16 obtiveram DR>1%, estando *P. fluorescens* (22,87%), *A. johnsonii* (13,82%), *P. putida* (6,18%), *A. salmonocida* (3,07%) e *P. caeni* (2,69%) com as maiores DR (Figura 4). Identificamos 63 gêneros no abatedouro de suínos, porém 11 abrigavam o maior número de sequências (DR>1%) e *Acinetobacter* (40,63%), *Pseudomonas* (23,60%) e *Brevundimonas* (12,32%) foram os principais (Figura 3).

Dentre as 177 espécies identificadas, apenas 17 obtiveram DR>1%, onde *A. johnsonni* (31,81%), *P. fluorescens* (12,75%), *P. peli* (7,81%), *B. vesicularis* (7,44%) e *B. bullata* (4,41%) foram as mais frequentes (Figura 4). No laticínio, identificamos 54 gêneros bacterianos, mas somente sete foram os mais abundantes (DR>1%), dentre os mais frequentes estavam *Pseudomonas* (53,95%), *Kocuria* (14,97%), *Staphylococcus* (10,79%) e *Enterobacter* (10,49%) (Figura 3). Entre as 108 espécies descritas, nove continham o maior número de sequências (DR>1%), estando *P. putida* (53,25%), *K. kristinae* (14,97%), *E. cloacae* (9,21%), *S. equorum* (5,58%) e *S. aureus* (5,18%) como as principais (Figura 4).

3.5 O tipo de indústria afetou a diversidade alfa e beta da ecologia microbiana

Os índices de *Shannon's diversity* (Aves=2,21±0,80; Suínos=2,34±0,31; Laticínio=1,29±1,06), *Observed OTUs* (Aves=9,67±4,52; Suínos=10,08±2,35; Laticínio=5,00±4,86) e *Evenness* (Aves=0,70±0,11; Suínos=0,71±0,06; Laticínio=0,63±0,35) indicaram que a diversidade alfa geral foi semelhante entre as três indústrias avaliadas (Tabela 2). A diversidade beta revelou agrupamentos estatísticos distintos entre as indústrias, tanto na avaliação geral como na comparação entre cada indústria (Tabela 2). A partir da métrica de dissimilaridade dos testes de *Bray-Curtis distance* (p=0,0001), *Jaccard distance* (p=0,0001) e a representação gráfica por meio da análise das coordenadas principais (PCoA) mostraram que cada indústria avaliada tendeu a agrupar suas amostras, promovendo três agrupamentos distintos, os quais demonstraram que a diversidade e abundância dos microrganismos identificados em cada indústria são diferentes entre os processos industriais de obtenção de cortes cárneos de aves, suínos e derivados lácteos (Figura 5A e 5B).

Dentre as OTUs com DR>1% foi realizado o diagrama de Venn para gênero e

espécie de acordo a presença das OTUs em cada indústria (Figura 5C). Apenas o gênero *Pseudomonas* (4,5%) e a espécie *P. putida* (2,7%) foram comuns à todas as indústrias. O abatedouro de aves e suínos compartilharam o maior número de gêneros semelhantes (n=7, 31,8%), porém, esse fato não foi observado na descrição das espécies, apresentando maior número de OTUs específicas para cada indústria (Aves, n=12, 32,4%; Suínos, n=17, 35,1%). O laticínio apresentou o menor número de gêneros (n=6, 27,3%) e espécies (n=8, 21,6%) em comum com as demais indústrias.

As análises de ANCOM demonstraram que existia maior abundância de alguns gêneros e espécies de microrganismos de acordo a cada indústria (Figura 5C). Com isso, *Arcobacter* (W=154) e *Mycobacterium* (W=142) foram os gêneros mais abundantes no abatedouro de aves, *Brevundimonas* (W=156) em suínos e *Staphylococcus* (W=146) no laticínio (Figura 5C). De acordo as espécies, *Arcobacter cryaerophilus* (W=407) foi mais abundante no abatedouro de aves e *Acinetobacter johnsonii* (W=432) e *Brevundimonas bullata* (W=409) em suínos (Figura 5C).

4 Discussão

As indústrias de processamento de produtos cárneos executam os PPHO com a finalidade de remover sujidades, reduzir microrganismos indicadores e eliminar patogênicos de forma eficiente e controlada (Brasil, 2003, Møretrø & Langsrud, 2017). No entanto, a legislação brasileira não possui parâmetros microbiológicos referenciais para o PPHO, ficando a escolha dos grupos microbianos a serem utilizados ao interesse das indústrias. Alguns trabalhos trazem que aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae e *E. coli* são bons indicadores da qualidade do processo de higienização devido sua sensibilidade aos agentes sanitizantes utilizados (Saini et al., 2011, Agüeria et al., 2020). Estudos realizados no Brasil relatam que em indústrias de

processamento de aves contagens acima de 10 UFC/cm² evidenciam falhas nos PPHO (Rodrigues et al., 2018; Soares et al., 2018).

Nossos dados indicaram que altas contagens médias de aeróbios mesófilos no abatedouro de suínos e no laticínio demonstrando falhas nos PPHO dessas indústrias (Figura 1). Adotando o parâmetro de contagem de <1 log UFC/cm² para avaliar a eficácia da higienização, 68% e 46% das amostras apresentaram contagens maiores que este parâmetro para aeróbios mesófilos; 14% e 8% para Enterobacteriaceae e 14% e 18% para *Pseudomonas* sp. no abatedouro de suínos e laticínio, respectivamente. Embora as indústrias avaliadas no estudo utilizassem o mesmo sanitizante em concentração e tempo semelhantes, essa variação nas contagens dos microrganismos indicadores de higiene pode estar associada ao tipo e a composição das superfícies, tempo de uso dos equipamentos, presença de matéria orgânica e falhas na execução dos protocolos de limpeza e sanitização (Møretrø & Langsrud, 2017; Agüeria et al., 2020). Diante disso, ações devem ser tomadas para identificar as possíveis causas e determinar medidas corretivas, com a finalidade de reduzir as contagens de microrganismos indicadores no abatedouro de suínos e no laticínio a níveis aceitáveis.

As falhas no PPHO também foram detectadas pela identificação de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. em diferentes equipamentos e utensílios. *Listeria monocytogenes* foi detectada nas três indústrias de alimentos com frequências variando de 0,2% a 5,3%, semelhante ao observado em outros estudos em indústrias de processamento de cortes cárneos de suínos (Sereno et al., 2019), aves (Schäfer et al., 2017; Moura et al., 2019; Viana et al., 2020) e laticínio (Oxaran et al., 2017; Prates et al., 2019) em diversas regiões do Brasil. Contudo, por mais que esses estudos demonstraram baixa ocorrência do patógeno, os isolados abrigavam genes

de virulência e resistência a antibióticos, apresentaram capacidade de aderir e formar biofilmes em superfícies plásticas e de aço inoxidável, além de exibir resistência a antibióticos e tolerância a sanitizantes como o ácido peracético (Oxaran et al., 2017; Sereno et al., 2019; Carvalho et al., 2019).

Em nosso estudo identificamos os sorogrupos I (1/2a, 47,06%), IV (4b, 41,18%) e III (1/2b, 11,76%) de *L. monocytogenes*, nestes sorogrupos estão os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b que são relacionados a 95% dos casos de listeriose em humanos em todo o mundo (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Confirmamos o potencial de virulência dos isolados pela detecção dos genes *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hlyA* e *actA*, sendo estes responsáveis pelas principais vias patogênicas de *L. monocytogenes* (Paziak-Domanska et al., 1999; Suárez & Vazquez-Boland, 2001; Liu et al., 2007). Esses genes já foram descritos em outros isolados de *L. monocytogenes* oriundos de superfícies de equipamentos e utensílios após o processo de higienização (Carvalho et al., 2019; Sereno et al., 2019; Prates et al., 2019), indicando que as indústrias servem de fonte de contaminação de *L. monocytogenes* potencialmente patogênica aos humanos.

As superfícies onde foram identificados os isolados de *L. monocytogenes* em nosso estudo apresentavam desgastes visíveis, presença de sulcos, alterações na coloração e incrustação o que podem ter contribuído para os resultados encontrados (Sereno et al., 2019; Fan et al., 2020; Carrascosa, Raheem, Ramos, Saraiva, & Raposo, 2021). Todos os isolados de *L. monocytogenes* identificados apresentaram fraca capacidade de adesão em poliestireno mas abrigaram genes codificadores para a adesão, formação de biofilme e tolerância a condições de estresse ambiental (*prfA*, *flaA*, *agrBCDA* e *luxS*), indicando que esses microrganismos poderiam estar compondo a microbiota de biofilmes microbianos nesses locais.

Salmonella sp. foi isolada apenas no laticínio (n=2, 1,2%), a qual foi identificada como *S. Muenchen* e *S. enterica* subs. *enterica*. *S. Muenchen* foi relacionada ao ambiente de fazenda (Rodrigues-Rivera et al., 2016) e em instalações de processamento de leite cru (Sonnier et al., 2018) nos Estados Unidos. No Brasil, houve relato da infecção em bezerros (Castro & Hofer, 1996). O isolamento deste sorotipo em nosso estudo demonstrou sua circulação no ambiente de produção de leite e derivados no Brasil, pois foi isolado em prateleira plástica utilizada para a maturação de queijos, onde os produtos permanecem até estarem prontos para a comercialização. Além disso, esses microrganismos carregaram genes associados a virulência (*invA*, *orgA*, *tolC*, *sifA*, *sipAB*) e formação de biofilme (*adrA*, *agfAD*, *sidA*, *csgBD*, *luxS* e *rpoS*) mas apresentaram fraca capacidade de adesão em poliestireno. Estas características de virulência e adesão que identificamos demonstram a importância de se investigar constantemente estes microrganismos em diferentes ambientes, equipamentos e utensílios utilizados nas indústrias de alimentos após PPHO a fim de elucidar os principais pontos críticos para adotar medidas de controle e ações corretivas mais efetivas.

A diversidade microbiana encontrada após PPHO nas indústrias de alimentos pode sofrer influência do tipo de matéria-prima processada, superfície de contato, tempo de uso dos equipamentos, deposição de matéria orgânica indesejável e de falhas nos programas de limpeza e sanitização (Fagerland et al., 2017; Gu et al., 2019; Maes et al., 2019; De Filippis et al., 2021). No Brasil, estudos que utilizaram a técnica do sequenciamento do gene 16S rRNA descreveram a ecologia microbiana de produtos elaborados a partir de processos tecnológicos inovadores ou de regiões específicas (Sant'Anna et al., 2019; Endres et al., 2021; da Silva Abreu et al., 2021) ou dependentes de cultivo prévio por meio do isolamento da cultura (Frazilio, de

Almeida, Niño-Arias & De Martinis, 2019). Contudo, nossa pesquisa é a primeira a descrever a ecologia microbiana de diferentes equipamentos e utensílios utilizados na elaboração de cortes cárneos de aves e suínos e no processo tecnológico de leite e derivados após PPHO em diferentes indústrias brasileiras utilizando a técnica do sequenciamento do gene 16S rRNA.

Nas indústrias avaliadas demonstramos uma ecologia microbiana diversa e abundante, indicando que a diversidade alfa foi semelhante entre as indústrias (Tabela 2). No entanto, as análises de diversidade beta (Tabela 2) demonstraram que cada indústria apresentava uma ecologia microbiana própria promovendo o agrupamento das amostras de acordo ao tipo de indústria, levando em consideração a identidade dos microrganismos e suas densidades absolutas e relativas em cada habitat (Figura 5A e 5B). Desse modo, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Aeromonas* foram os microrganismos mais abundantes na ecologia microbiana do abatedouro de aves, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Brevundimonas* para suínos e *Pseudomonas*, *Kocuria* e *Staphylococcus* para o laticínio (Figura 5C),

As altas DR do gênero *Pseudomonas* nas amostras em todas as indústrias avaliadas (53,25% no laticínio, 45,20% em aves e 23,60% em suínos) sugere que esse microrganismo pertence à microbiota residente dessas instalações (Figura 3). Nossos resultados confirmaram que *Pseudomonas* está entre um dos principais contaminantes das superfícies de diferentes equipamentos e utensílios em indústrias, assim como demonstrado em outras pesquisas em indústria de aves (Song et al., 2021), suínos (Hascoët et al., 2019; Cherifi et al., 2022) e laticínios (Stellato et al., 2015). A presença de *Pseudomonas* nas amostras em nosso estudo pode ser provenientes da contaminação das matérias-primas processadas nesses ambientes, pois é um microrganismo constituinte da microbiota dos frangos de corte e do leite cru

(Machado et al., 2015; Vidal et al., 2017; Handley, Park, Kim, Ricke, 2018; Wages, Feye, Park, Kim, & Ricke, 2019). A característica psicrotrófica de *Pseudomonas* pode ter colaborado para esse microrganismo se tornar dominante entre as populações microbianas encontradas nos ambientes de processamento de alimentos, visto que nesses locais rotineiramente são utilizadas temperaturas inferiores a 10 °C (Lerma, Benomar, Muñoz, Gálvez, & Abriouel, 2015; Wickramasinghe, Ravensdale, Coorey, Chandry, & Dykes, 2019).

Verificamos que o tipo de indústria exerceu influência nas espécies de *Pseudomonas* detectadas (Figura 4). Na indústria de aves, *P. fluorescens* (22,87%), *P. putida* (6,18%) e *P. caeni* (2,69%) foram mais abundantes; em suínos, *P. fluorescens* (12,75%) e *P. peli* (7,81%) e em amostras do laticínio, *P. putida* (53,25%) foi a mais frequente. Estes microrganismos apresentam a capacidade de aderir, formar biofilme e tolerar a ação de sanitizantes (Fagerland et al., 2017; Wang et al., 2018), fatores que podem ter contribuído para a permanência nos equipamentos e utensílios analisados em nosso estudo. Alguns autores sugerem a identificação de *Pseudomonas* como potencial microrganismo indicador da qualidade do processo de produção e beneficiamento de cortes cárneos (Handley et al., 2018; Wages et al., 2019) e, com base nisso, fornecemos dados importantes para indicar que esse microrganismo seja também utilizado como indicador da qualidade da higiene das superfícies de processamento de alimentos após PPHO.

Acinetobacter foi um gênero abundante no abatedouro de suínos e aves, proporcionando DR médias de 40,63% e 16,54%, respectivamente (Figura 3). Em especial, no abatedouro de suínos, verificamos pela análise de ANCON que *A. johnsonii* (31,81%) foi a principal espécie descrita entre as mais abundantes (Figura 5C). Esse microrganismo está associado a microbiota de carne suína durante o abate

(Li et al., 2016) e ambientes industriais (Cobo-Díaz et al., 2021; Cherifi et al., 2022), além disso, apresentam alta dominância em biofilmes microbianos, pois possuem fatores de estresse ambiental (Fagerland et al., 2017; Calero et al., 2020; Jia, Liu, Feng, & Wang., 2022).

Também no abatedouro de suínos demonstramos que o gênero *Brevundimonas* (12,32%) e as espécies de *B. vesicularis* (7,44%) e *B. bullata* (4,41%) foram contaminantes importantes (Figura 3 e 4). O gênero *Brevundimonas* foi descrito como componente da microbiota principal de ralos, pisos e equipamentos em indústrias de processamento de cortes cárneos de suínos (Cobo-Díaz et al., 2021), produtos prontos para o consumo (Fagerland et al., 2017) e laticínios (Maes et al., 2019). Comprovamos, pela análise de ANCON, que *B. bullata* foi uma espécie abundante no abatedouro de suínos (Figura 5C), sendo necessários mais estudos para a compreensão de quais são os fatores relacionados com a ocorrência da espécie nesses ambientes.

Os gêneros *Mycobacterium* (3,63%) e *Arcobacter* (2,99%) e a espécie de *Arcobacter cryaerophilus* (1,49%) foram descritos como outros microrganismos contaminantes das esteiras transportadoras de alimentos no abatedouro de aves, o qual demonstramos ser, pela análise de ANCOM, a espécie mais abundante em relação a outras espécies identificadas para esta indústria (Figura 5C). *Mycobacterium* é uma bactéria presente no solo, poeira e matrizes alimentares, promovendo a formação de biofilmes em superfícies que recebem constante contato com a água (Pavlik, Ulmann, Hubelova, & Weston, 2022). *Arcobacter cryaerophilus* é patogênica para humanos e animais (Van den Abeele, Vogelaers, Van Hende, & Houf, 2014), os conteúdos gastrointestinais dos frangos de corte são relacionados como os principais reservatórios deste microrganismo, promovendo a contaminação das carcaças

durante a evisceração (Schönknecht, Alter, & Gölz, 2020). Nesse sentido, boas práticas de fabricação devem ser constantemente avaliadas, visando a redução da contaminação microbiana desses microrganismos nas indústrias de processamento de aves.

No laticínio, os gêneros *Kocuria* (14,97%), *Staphylococcus* (10,79%) e *Enterobacter* (10,49%) e as espécies de *K. kristinae* (14,97%), *E. cloacae* (9,21%), *S. equorum* (5,58%) e *S. aureus* (5,18%) foram outros microrganismos identificados nas superfícies avaliadas (Figura 3 e 4). *Kocuria kristinae* está associado à microbiota do leite cru em rebanhos brasileiros, considerado um microrganismo termodúrico deteriorante (Ribeiro Júnior, Tamanini, De Oliveira, Alfieri, & Beloti, 2018) e foi identificada como fonte de contaminação microbiana do ar em uma indústria de processamento de leite pó na Suíça (Brandl et al., 2014). *Enterobacter cloacae* pertence ao grupo das enterobactérias, sendo um microrganismo oportunista causador de mastite (Schukken et al., 2011) e promove a contaminação do ambiente industrial por meio do leite contaminado (Souad, Mossadak, & Leila, 2021). Demonstramos que gênero *Staphylococcus* foi considerado abundante no laticínio pela análise de ANCOM (Figura 5C). *Staphylococcus* abriga inúmeras espécies, sendo *S. aureus* um patógeno associado a casos de infecções intramamárias promovendo a contaminação das instalações e produtos por meio do leite contaminado (Kümmel et al., 2016), sendo capaz de produzir toxinas termoestáveis, frequentemente relacionado a surtos de origem alimentar em humanos (Abril et al., 2020).

Nossos resultados, fornecem informações sobre a colonização bacteriana das indústrias de aves, suínos e laticínicos indicando uma ecologia microbiana rica e abundante. Os gêneros e espécies identificados podem apresentar capacidade para

o desenvolvimento de biofilmes microbianos, por meio disso facilitar a adesão bacteriana ou a tolerância aos fatores de estresse ambiental dos microrganismos patogênicos (Hascoët et al., 2019, Maes et al., 2019, Pang, Chen, & Yuk, 2020, Cherifi et al., 2022). Desse modo, é importante continuar os estudos visando avaliar a dinâmica de formação de biofilmes multiespécies para entender por meio de avaliações fenotípicas e genotípicas quais fatores podem estar associados a sobrevivência dos microrganismos patogênicos por meio da ecologia microbiana residente, bem como, estabelecer medidas de controle mais eficientes para garantir a segurança dos alimentos visando a eliminação de microrganismos patogênicos e deteriorantes.

5 Conclusões

Nosso estudo identificou falhas nos PPHO no abatedouro de suínos e laticínio, principalmente relacionados as altas contagens de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* sp.. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. foram identificadas em baixas frequências, contudo, possuíam fatores relacionados à virulência e formação de biofilmes que podem contribuir para a tolerância aos métodos de controle empregados nestes ambientes. O tipo de indústria demonstrou influência sobre a diversidade microbiana, sendo *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Aeromonas* importantes contaminantes para o abatedouro de aves; *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Brevundimonas* para suínos e *Pseudomonas*, *Kocuria* e *Staphylococcus* para o laticínio. Desse modo, a identificação dos microrganismos que habitam diferentes ambientes industriais foi importante para entender o risco microbiológico de contaminação e seus impactos sobre a eficácia dos PPHO, além disso, promove o auxílio para estudos futuros que buscam melhorar as estratégias de controle

646 microbiológico para o ambiente industrial de produção de alimentos.

647 **Declaração de contribuição de autoria CRediT**

648 Leonardo Ereno Tadielo: Conceituação, Investigação, Metodologia, Redação –
649 rascunho original, Redação – revisão e edição. Emanneli Aparecida Rodrigues dos
650 Santos: Metodologia, Investigação, Redação – revisão e edição. Fábio Sossai
651 Possebon: Metodologia, Investigação, Redação – revisão e edição. Jhennifer Arruda
652 Schmiedt: Metodologia, Redação – revisão e edição. Lara Cristina Bastos Juliano:
653 Metodologia, Redação – revisão e edição. Camila Koutsodontis Cerqueira-Cézar:
654 Metodologia, Redação – revisão e edição. Janaina Prieto de Oliveira: Metodologia,
655 Redação – revisão e edição. Aryele Nunes da Cruz Encide Sampaio: Metodologia,
656 Redação – revisão e edição. Patrícia Regina Lopes Melo: Metodologia, Redação –
657 revisão e edição. Evelyn Fernanda Flores Caron: Metodologia, Redação – revisão e
658 edição. José Paes de Almeida Nogueira Pinto: Conceituação, Investigação,
659 Metodologia, Supervisão, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição.
660 Luciano dos Santos Bersot: Conceituação, Investigação, Metodologia, Supervisão,
661 Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. Juliano Gonçalves Pereira:
662 Conceituação, Investigação, Metodologia, Supervisão, Redação – rascunho original,
663 Redação – revisão e edição.

664

665 **Declaração de conflito de interesse**

666 Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

667

668 **Agradecimentos**

669 A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil

(bolsa de doutorado para Leonardo Ereno Tadielo) por meio do Processo FAPESP nº 2020/01529-9; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brasil); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brasil); Projeto CAPES-PRINT AUXPE 88881.310254/2018-01,

675

676 Referências

- 677 ABPA, 2022. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual, 2022. Disponível em: <
678 <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2022/05/Relatorio-Anual-ABPA-2022-vf.pdf>>. Acesso em
679 03 de janeiro de 2023.
- 680 Abril, A., G. Villa, T., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., & Carrera, M.
681 (2020). *Staphylococcus aureus* exotoxins and their detection in the dairy industry and
682 mastitis. *Toxins*, 12(9), 537. <https://doi.org/10.3390/toxins12090537>
- 683 Agostinho Davanzo, E. F., Dos Santos, R. L., Castro, V. H. D. L., Palma, J. M., Pribul, B. R., Dallago,
684 B. S. L., Fuga, B., Medeiros, M., Almeida, S. S. T., da Costa, H. M. B., Rodrigues, D. P. Lincopan,
685 N, Perecmanis, S., & Santana, A. P. (2021). Molecular characterization of *Salmonella* spp. and
686 *Listeria monocytogenes* strains from biofilms in cattle and poultry slaughterhouses located in the
687 federal District and State of Goiás, Brazil. *PLoS One*, 16(11), Article e0259687.
688 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259687>
- 689 Agüeria, D. A., Libonatti, C., & Civit, D. (2021). Cleaning and disinfection programmes in food
690 establishments: a literature review on verification procedures. *Journal of Applied*
691 *Microbiology*, 131(1), 23-35. <https://doi.org/10.1111/jam.14962>
- 692 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search
693 tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
694 [2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- 695 Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Acesso em:
696 <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>.
- 697 Autret, N., Raynaud, C., Dubail, I., Berche, P., & Charbit, A. (2003). Identification of the agr locus of
698 *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infection and Immunity*, 71(8), 4463-4471.
699 <https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4463-4471.2003>
- 700 Barak, J. D., Gorski, L., Naraghi-Arani, P., & Charkowski, A. O. (2005). *Salmonella enterica* virulence
701 genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental*
702 *Microbiology*, 71(10), 5685-5691 <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5685-5691.2005>.
- 703 Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H.,
704 Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn,
705 C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., Da Silva,
706 R., Diener, C., Dorrestein, P. C., Douglas, G. M., Durall, D. M., Duvallet, C., Edwardson, C., Ernst,
707 M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J. M., Gibbons, S. M., Gibson, D. L., Gonzalez, A., Gorlick,
708 K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S. Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G. A., Janssen, S.,
709 Jarmusch, A. K., Jiang, L., Kaehler, B. D., Kang, K. B., Keefe, C. R., Keim, P., Kelley, S., T.,
710 Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M. G. I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.,
711 Löffler, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B. D., McDonald, D., McIver, L. J.,
712 Melnik, A. V., Metcalf, J. L., Morgan, S. C., Morton, J. T., Naimey, A. T., Navas-Molina, J. A.,
713 Nothias, L. F., Orchanian, S. B., Pearson, T., Peoples, S. L., Petras, D., Preuss, M. L., Priesse,
714 E., Rasmussen, L. B., Rivers, A., Robeson, M. S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer,
715 A., Sinha, R., Song, S. J., Spear, J. R., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Torres, P. J., Trinh, P.,
716 Tripathi, A., Turnbaugh, P. J., Ul-Hasan, S., Hooft, J. J. V., Vargis, F., Vázquez-Baeza, Y.,
717 Vogtmann, E., Hoppel, M. V., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K. C.,
718 Williamson, C. H. D., Willis, A. D., Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., &
719 Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data

- science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Brandl, H., Fricker-Feer, C., Ziegler, D., Mandal, J., Stephan, R., & Lehner, A. (2014). Distribution and identification of culturable airborne microorganisms in a Swiss milk processing facility. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 240-246. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7028>
- Brasil, 2003. Resolução nº 10, de 22 de maio de 2003. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA.
- Calero, G. C., Gómez, N. C., Lerma, L. L., Benomar, N., Knapp, C. W., & Abriouel, H. (2020). In silico mapping of microbial communities and stress responses in a porcine slaughterhouse and pork products through its production chain, and the efficacy of HLE disinfectant. *Food Research International*, 136, Article 109486. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109486>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J., A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6(8), 1621-1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021). Microbial biofilms in the food industry—A comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(04), 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>
- Carvalho, F. T., Vieira, B. S., Vallim, D. C., Carvalho, L. A., Carvalho, R. C., Pereira, R. C., & Figueiredo, E. E. (2019). Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. *LWT-Food Science and Technology*, 109, 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.099>
- Castro, J. A. B., & Hofer, E. (1996). Perfil de resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* enterotoxigênica (ST) e *Salmonella* sp Em bezerros no agreste meridional de pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 16(4), 127-131.
- Cherifi, T., Arsenault, J., Quessy, S., & Fravalo, P. (2022). Co-Occurrence of *L. monocytogenes* with Other Bacterial Genera and Bacterial Diversity on Cleaned Conveyor Surfaces in a Swine Slaughterhouse. *Microorganisms*, 10(3), 613. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030613>
- Cobo-Díaz, J. F., Alvarez-Molina, A., Alexa, E. A., Walsh, C. J., Mencía-Ares, O., Puente-Gómez, P., Prieto, B., Crispie, F., Ruiz, L., González-Raurich, M., López, M., Prieto, M., Cotter, P., & Alvarez-Ordóñez, A. (2021). Microbial colonization and resistome dynamics in food processing environments of a newly opened pork cutting industry during 1.5 years of activity. *Microbiome*, 9(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01131-9>
- Cock, P. J., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., & De Hoon, M. J. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422-1423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>
- Corbitt, A. J., Bennion, N., & Forsythe, S. J. (2000). Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Letters in Applied Microbiology*, 30(6), 443-447. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00744.x>
- da Silva Abreu, A. C., Carazzolle, M. F., Crippa, B. L., Barboza, G. R., Rall, V. L. M., de Oliveira Rocha, L., & Silva, N. C. C. (2021). Bacterial diversity in organic and conventional Minas Frescal cheese production using targeted 16S rRNA sequencing. *International Dairy Journal*, 122, Article 105139. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105139>
- De Filippis, F., Valentino, V., Alvarez-Ordóñez, A., Cotter, P. D., & Ercolini, D. (2021). Environmental microbiome mapping as a strategy to improve quality and safety in the food industry. *Current Opinion in Food Science*, 38, 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.11.012>
- Dias, R. C., Dos Santos, B. C., Dos Santos, L. F., Vieira, M. A., Yamatogi, R. S., Mondelli, A. L., Sadatsune, T., Sforcin, J. M., Gomes, T. A. T., & Hernandez, R. T. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Apmis*, 124(4), 299-308. <https://doi.org/10.1111/apm.12501>
- Dos Santos, R. L., Davanzo, E. F. A., Palma, J. M., Castro, V. H. D. L., da Costa, H. M. B., Dallago, B. S. L., Perecmanis, S., & Santana, Â. P. (2022). Molecular characterization and biofilm-formation analysis of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* isolated from Brazilian swine slaughterhouses. *Plos One*, 17(9), Article e0274636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274636>

- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819-3822. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>
- Endres, C. M., Castro, Í. M. S., Trevisol, L. D., Severo, J. M., Mann, M. B., Varela, A. P. M., Frazzon, A. P. G., Mayer, F. Q., & Frazzon, J. (2021). Molecular characterization of the bacterial communities present in sheep's milk and cheese produced in South Brazilian Region via 16S rRNA gene metabarcoding sequencing. *LWT-Food Science and Technology*, 147, Article 111579. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111579>
- Fagerlund, A., Møretrø, T., Heir, E., Briandet, R., & Langsrud, S. (2017). Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17), Article e01046-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01046-17.24>
- Fan, Y., Qiao, J., Lu, Z., Fen, Z., Tao, Y., Lv, F., Zhao, H., Zhang, C., & Bie, X. (2020). Influence of different factors on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and the regulation of cheY gene. *Food Research International*, 137, 109405. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109405>
- Ferrocino, I., Rantsiou, K., Coccolin, L. (2022). Microbiome and -omics application in food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 377, Article 109781. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109781>
- Frazilio, D. A., de Almeida, O. G. G., Niño-Arias, F. C., & De Martinis, E. C. P. (2019). Finding a common core microbiota in two Brazilian dairies through culture and DNA metabarcoding studies. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5326-5335. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04003-1>
- Gu, G., Ottesen, A., Bolten, S., Wang, L., Luo, Y., Rideout, S., Lyu, S., & Nou, X. (2019). Impact of routine sanitation on the microbiomes in a fresh produce processing facility. *International Journal of Food Microbiology*, 294, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.002>
- Halatsi, K., Oikonomou, I., Lambiri, M., Mandilara, G., Vatopoulos, A., & Kyriacou, A. (2006). PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdhA*. *FEMS Microbiology Letters*, 259(2), 201-207. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00266.x>
- Handley, J. A., Park, S. H., Kim, S. A., & Ricke, S. C. (2018). Microbiome profiles of commercial broilers through evisceration and immersion chilling during poultry slaughter and the identification of potential indicator microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 345. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00345>
- Hascoët, A. S., Ripolles-Avila, C., Guerrero-Navarro, A. E., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Microbial ecology evaluation of an iberian pig processing plant through implementing SCH sensors and the influence of the resident microbiota on *Listeria monocytogenes*. *Applied Sciences*, 9(21), Article 4611. doi.org/10.3390/app9214611
- ISO. 1998. ISO 15214. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 °C. Geneva: ISO
- ISO. 2004. ISO 21528-2. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count technique. Geneva: ISO
- ISO. 2010. ISO 13720. Meat and meat products — Enumeration of presumptive *Pseudomonas* spp. Geneva: ISO
- ISO. 2013. ISO 4833-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. Geneva: ISO
- ISO. 2017. ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Geneva: ISO
- ISO. 2017. ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.: Detection method. Geneva: ISO
- ISO. 2018. ISO 16649-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide: Detection method. Geneva: ISO
- Jia, J., Liu, M., Feng, L., & Wang, Z. (2022). Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation of *Acinetobacter johnsonii*. *Gene*, 808, Article 145985. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145985>
- Ribeiro Júnior, J., Tamanini, R., De Oliveira, A. L. M., Alfieri, A. A., & Beloti, V. (2018). Genetic diversity of thermophilic spoilage microorganisms of milk from Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6927-6936. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13948>
- Kadam, S. R., den Besten, H. M., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition,

- serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>
- Kümmel, J., Stessl, B., Gonano, M., Walcher, G., Bereuter, O., Fricker, M., Grunert, T., Wagner, M., & Ehling-Schulz, M. (2016). *Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Frontiers in Microbiology*, 7, Article 1603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01603>
- Kunert-Filho, H. C., Furian, T. Q., Sesterhenn, R., Chitolina, G. Z., Willsmann, D. E., Borges, K. A., Salle, C. T. P., Moraes, H. A. S., & do Nascimento, V. P. (2022). Bacterial community identification in poultry carcasses using high-throughput next generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 364, Article 109533. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109533>
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1322-1339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04907.x>
- Jerma, L. L., Benomar, N., Muñoz, M. D. C. C., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2015). Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Food Microbiology*, 51, 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.010>
- Li, L., Olsen, R. H., Ye, L., Yan, H., Nie, Q., Meng, H., & Shi, L. (2016). Antimicrobial resistance and resistance genes in aerobic bacteria isolated from pork at slaughter. *Journal of Food Protection*, 79(4), 589-597. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-455>
- Liu, D., Lawrence, M. L., Austin, F. W., & Ainsworth, A. J. (2007). A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 71(2), 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.007>
- Machado, S. G., da Silva, F. L., Bazzolli, D. M., Heyndrickx, M., Costa, P. M. D. A., & Vanetti, M. C. D. (2015). *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. *Journal of Food Science*, 80(8), 1842-1849. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12957>
- Maes, S., Heyndrickx, M., Vackier, T., Steenackers, H., Verplaetse, A., & Reu, K. D. (2019). Identification and spoilage potential of the remaining dominant microbiota on food contact surfaces after cleaning and disinfection in different food industries. *Journal of Food Protection*, 82(2), 262-275. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-226>
- Mørretrø, T., & Langsrud, S. (2017). Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1022-1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
- Moura, G., Tomborelli, P., Carvalho, R. C., Sigarini, C., Carvalho, F., Vieira, B., & Figueiredo, E. E. (2019). *Listeria monocytogenes* and other species as persistent contaminants in the processing of chicken meat. *Journal of Applied Poultry Research*, 28(2), 470-478. <https://doi.org/10.3382/japr/pfy071>
- Nahar, S., Jeong, H. L., Kim, Y., Ha, A. J. W., Roy, P. K., Park, S. H., Ashrafudoulla, M., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D. (2021). Inhibitory effects of Flavourzyme on biofilm formation, quorum sensing, and virulence genes of foodborne pathogens *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli*. *Food Research International*, 147, Article 110461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110461>
- Oliveira, D. C. V., Fernandes Junior, A., Kaneno, R., Silva, M. G., Araujo Junior, J. P., Silva, N. C. C., & Rall, V. L. M. (2014). Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(6), 478-483. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1710>
- Oxaran, V., Lee, S. H. I., Chaul, L. T., Corassin, C. H., Barancelli, G. V., Alves, V. F., Oliveira, C. A. F., Gram, L., & De Martinis, E. C. P. (2017). *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. *Food Microbiology*, 68, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.012>
- Pang, X., Chen, L., & Yuk, H. G. (2020). Stress response and survival of *Salmonella* Enteritidis in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens* following repeated exposure to quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 325, Article 108643. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108643>
- Papadopoulou, O. S., Iliopoulos, V., Mallouchos, A., Panagou, E. Z., Chorianopoulos, N., Tassou, C. C., & Nychas, G. J. E. (2020). Spoilage potential of *Pseudomonas* (*P. fragi*, *P. putida*) and LAB (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*) strains and their volatilome profile during storage of sterile pork meat using GC/MS and data analytics. *Foods*, 9(5), Article 633. <https://doi.org/10.3390/foods9050633>

- Pavlik, I., Ulmann, V., Hubelova, D., & Weston, R. T. (2022). Nontuberculous mycobacteria as saprozoites: A review. *Microorganisms*, 10(7), Article 1345. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071345>
- Paziak-Domańska, B., Bogusławska, E., Więckowska-Szakiel, M., Kotłowski, R., Różalska, B., Chmiela, M., Kur, J., Dabrowski, W., & Rudnicka, W. (1999). Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. *FEMS Microbiology Letters*, 171(2), 209-214. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13434.x>
- Peres, N. D., Lange, C. C., Brito, M. A. V. P., Brito, J. R. F., Arcuri, E. F., & Cerqueira, M. M. O. P. (2010). Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62, 973-979. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000400029>
- Pieta, L., Garcia, F. B., Riboldi, G. P., de Oliveira, L. A., Frazzon, A. P. G., & Frazzon, J. (2014). Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation, stress-response, and virulence in *Listeria monocytogenes* strains grown at different temperatures. *Annals of Microbiology*, 64(4), 1707-1714. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0814-2>
- Prates, D. D. F., Haubert, L., de Fátima Würfel, S., Cavicchioli, V. Q., Nero, L. A., & da Silva, W. P. (2019). *Listeria monocytogenes* in dairy plants in Southern Brazil: Occurrence, virulence potential, and genetic diversity. *Journal of Food Safety*, 39(6), Article e12695. <https://doi.org/10.1111/jfs.12695>
- Rieu, A., Lemaître, J. P., Guzzo, J., & Piveteau, P. (2008). Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.006>
- Rodrigues, L. B., Santos, L. R. D., Rizzo, N. N., Ferreira, D., Oliveira, A. P. D., Levandowski, R., Webber, B., & Nascimento, V. P. D. (2018). ATP-bioluminescence and conventional microbiology for hygiene evaluation of cutting room surfaces in poultry slaughterhouse. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46, Article 1534. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81882>
- Rodriguez-Rivera, L. D., Cummings, K. J., Loneragan, G. H., Rankin, S. C., Hanson, D. L., Leone, W. M., & Edrington, T. S. (2016). *Salmonella* prevalence and antimicrobial susceptibility among dairy farm environmental samples collected in Texas. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(4), 205-211. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2037>
- Saini, P. K., Marks, H. M., Dreyfuss, M. S., Evans, P., Cook Jr, L. V., & Dessai, U. (2011). Indicator organisms in meat and poultry slaughter operations: their potential use in process control and the role of emerging technologies. *Journal of Food Protection*, 74(8), 1387-1394. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-433>
- Sant'Anna, F. M., Wetzels, S. U., Cicco, S. H. S., Figueiredo, R. C., Sales, G. A., Figueiredo, N. C., Nunes, C. A., Schmitz-Esser, S., Mann, E., Wagner, M., & Souza, M. R. (2019). Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. *Food Microbiology*, 82, 349-362. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.016>
- Schäfer, D. F., Steffens, J., Barbosa, J., Zeni, J., Paroul, N., Valduga, E., Junges, A., Backes, G. T., & Cansian, R. L. (2017). Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 393-398. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.024>
- Schönknecht, A., Alter, T., & Götz, G. (2020). Detection of *Arcobacter* species in different intestinal compartments of broiler chicken during slaughter and processing. *Microbiology Open*, 9(10), e1106. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1106>
- Schukken, Y. H., Bennett, G. J., Zurawski, M. J., Sharkey, H. L., Rauch, B. J., Thomas, M. J., Ceglowski, B., Saltman, R. L., Belomestnykh, N., & Zadoks, R. N. (2011). Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 6203-6215. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4290>
- Sereno, M. J., Viana, C., Pegoraro, K., da Silva, D. A. L., Yamatogi, R. S., Nero, L. A., & dos Santos Bersot, L. (2019). Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil. *Food Microbiology*, 84, Article 103234. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.018>
- Skyberg, J. A., Logue, C. M., & Nolan, L. K. (2006). Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Diseases*, 50(1), 77-81. <https://doi.org/10.1637/7417.1>
- Soares, V. M., Viana, C., Pereira, J. G., Destro, M. T., Nero, L. A., dos Santos Bersot, L., & Pinto, J. P. D. A. N. (2018). Absence of a continuous water spray system does not influence the

- microbiological contamination of the conveyor belts in chicken slaughterhouses. *LWT-Food Science and Technology*, 97, 414-418. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.035>
- Song, X., Wang, H., & Xu, X. (2021). Investigation of microbial contamination in a chicken slaughterhouse environment. *Journal of Food Science*, 86(8), 3598-3610. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15842>
- Sonnier, J. L., Karns, J. S., Lombard, J. E., Kopral, C. A., Haley, B. J., Kim, S. W., & Van Kessel, J. A. S. (2018). Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and pathogenic *Escherichia coli* in bulk tank milk and milk filters from US dairy operations in the National Animal Health Monitoring System Dairy 2014 study. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 1943-1956. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13546>
- Souad, R., Mossadak, H. T., & Leila, B. (2021). Assessing hygiene indicators in two dairies in Algeria in producing pasteurized milk. *Veterinary World*, 14(9), Article 2317. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2317-2324>
- Stellato, G., De Filippis, F., La Storia, A., & Ercolini, D. (2015). Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7893-7904. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-15>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Suárez, M., González-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., & Vázquez-Boland, J. A. (2001). A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology*, 3(12), 853-864. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00160.x>
- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), 1236-1243. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.011>
- Swamy, S. C., Barnhart, H. M., Lee, M. D., & Dreesen, D. W. (1996). Virulence determinants *invA* and *spvC* in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3768-3771. <https://doi.org/10.1128/aem.62.10.3768-3771.1996>
- Tamber, S. (2018). Population-wide survey of *Salmonella enterica* response to high-pressure processing reveals a diversity of responses and tolerance mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(2), 1-12. <https://doi.org/10.1128/AEM.01673-17>
- Van den Abeele, A. M., Vogelaers, D., Van Hende, J., & Houf, K. (2014). Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008–2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), Article 1731. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140433>
- Viana, C., Sereno, M. J., Pegoraro, K., Yamatogi, R. S., Call, D. R., dos Santos Bersot, L., & Nero, L. A. (2019). Distribution, diversity, virulence genotypes and antibiotic resistance for *Salmonella* isolated from a Brazilian pork production chain. *International Journal of Food Microbiology*, 310, Article 108310. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108310>
- Viana, C., Soares, V. M., Pereira, J. G., Tadielo, L. E., Nero, L. A., Pinto, J. P. D. A. N., & dos Santos Bersot, L. (2020). Effect of a water spray system on the presence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* on conveyor belts in chicken slaughterhouses. *LWT-Food Science and Technology*, 122, Article 109017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109017>
- Vidal, A., Saran Netto, A., Vaz, A. C., Capodifoglio, E., Gonçalves, A., Rossi, G. A., Figueiredo, A. S., & Ruiz, V. L. (2017). *Pseudomonas* spp.: contamination sources in bulk tanks of dairy farms. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37, 941-948. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000900008>
- Wages, J. A., Feye, K. M., Park, S. H., Kim, S. A., & Ricke, S. C. (2019). Comparison of 16S rDNA next sequencing of microbiome communities from post-scalding and post-picker stages in three different commercial poultry plants processing three classes of broilers. *Frontiers in Microbiology*, 10, 972. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00972>
- Wagner, E. M., Pracser, N., Thalgueter, S., Fischel, K., Rammer, N., Pospíšilová, L., Alispahic, M., Wagner, M., & Rychli, K. (2020). Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 328, Article 108668. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108668>
- Wang, X. Y., & Xie, J. (2020). Growth kinetics and spoilage potential of co-culturing *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas fluorescens* from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during refrigerated storage. *Current Microbiology*, 77(8), 1637-1646. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01978-5>
- Wang, H., Cai, L., Li, Y., Xu, X., & Zhou, G. (2018). Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants. *Food Control*, 91, 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.035>

- 1016 Wang, Y., & Qian, P. Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design
1017 for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PloS One*, 4(10), Article e7401.
1018 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
1019 Wickramasinghe, N. N., Ravensdale, J., Coorey, R., Chandry, S. P., & Dykes, G. A. (2019). The
1020 predominance of psychrotrophic pseudomonads on aerobically stored chilled red meat.
1021 *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1622-1635.
1022 <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12483>

1023 Tabela 1: Local de coleta e número de amostras avaliadas de diferentes superfícies de equipamentos
1024 e utensílios em abatedouro de aves, abatedouro de suínos e laticínio.

Collection point	n°	%
Poultry slaughterhouse (n=160)		
Modular polypropylene conveyor belt	86	54,0
Smooth polypropylene conveyor belt	74	46,0
Pork slaughterhouse (n=160)		
Smooth polypropylene conveyor belt	48	30,0
Stainless steel table	36	23,0
Plastic boxes	23	14,0
Cutting boards	23	14,0
Meat storage container	18	11,0
Meat grinder	6	4,0
Meat mixer	6	4,0
Dairy (n=160)		
Milk and cheese storage container	56	35,0
Cheese making equipment	56	35
Cheese molds	28	17,5
Cheese maturing surface	20	12,5

1025

1026

1027 Tabela 2: Índices de diversidade alfa (*Shannon's diversity*, *Observed OTUs* e *Evenness*) e beta (*Bray-*
1028 *Curtis distance* e *Jaccard distance*) das comunidades bacterianas de diferentes superfícies utilizadas
1029 no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de
1030 aves (*Poultry*), suínos (*Pork*) e laticínio (*Dairy*).

Groups	Alpha diversity			Beta diversity	
	<i>Shannon's diversity</i> ¹	<i>Observed OTUs</i> ¹	<i>Evenness</i> ¹	<i>Bray-Curtis distance</i> ²	<i>Jaccard distance</i> ²
	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
General	0,1022	0,0501	0,3793	0,0001	0,0001
Poultry x Pork	0,7290	1,0000	0,3556	0,0001	0,0001
Poultry x Dairy	0,0759	0,0505	0,2610	0,0001	0,0001
Pork x Dairy	0,0425	0,0156	0,3028	0,0001	0,0001

1031 ¹Teste *Kruskal-Wallis* adotando significância estatística quando $p < 0,05$. ²Teste *pseudo-F* adotando
1032 significância estatística quando $p < 0,05$.

1033

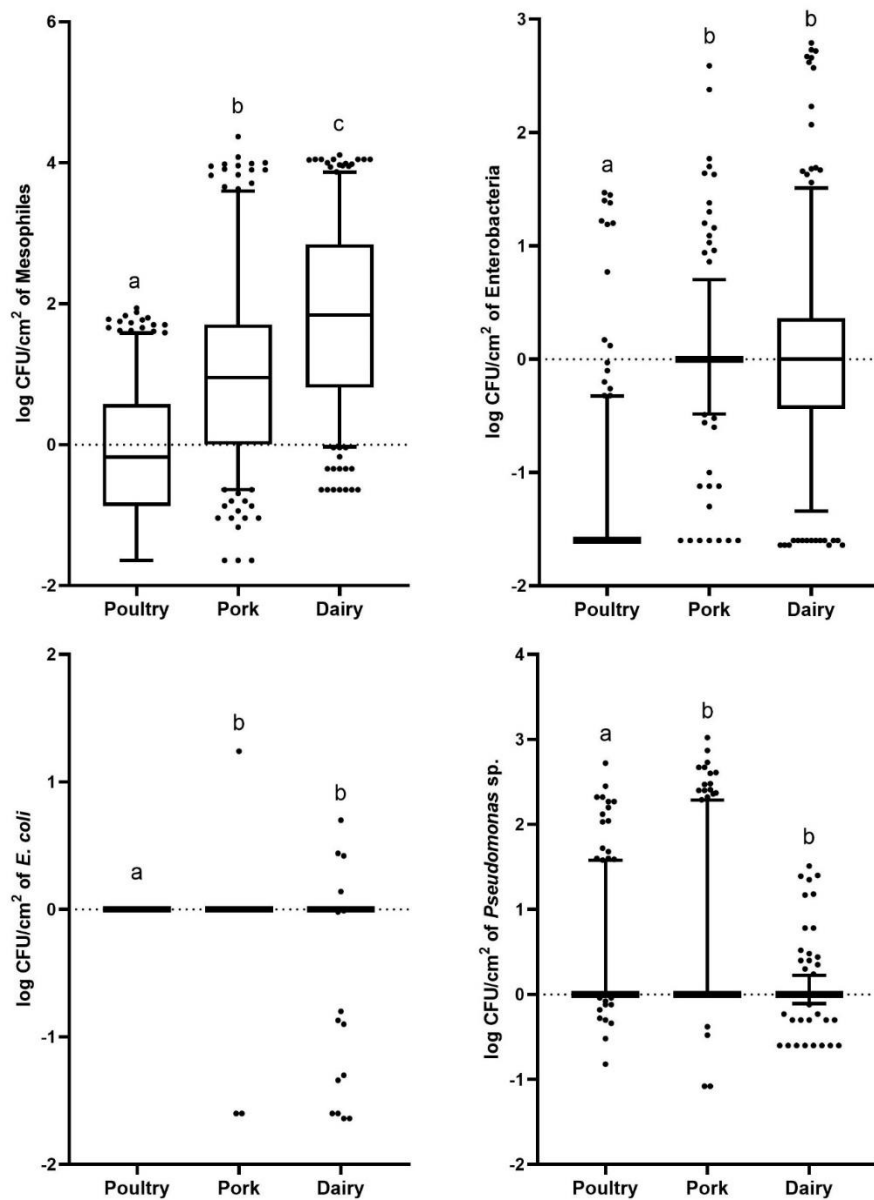


Figura 1: Média e desvio padrão das contagens obtidas para aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, *E. coli* e *Pseudomonas* sp. em log UFC/cm² de diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (*Poultry*), suínos (*Pork*) e laticínio (*Dairy*).

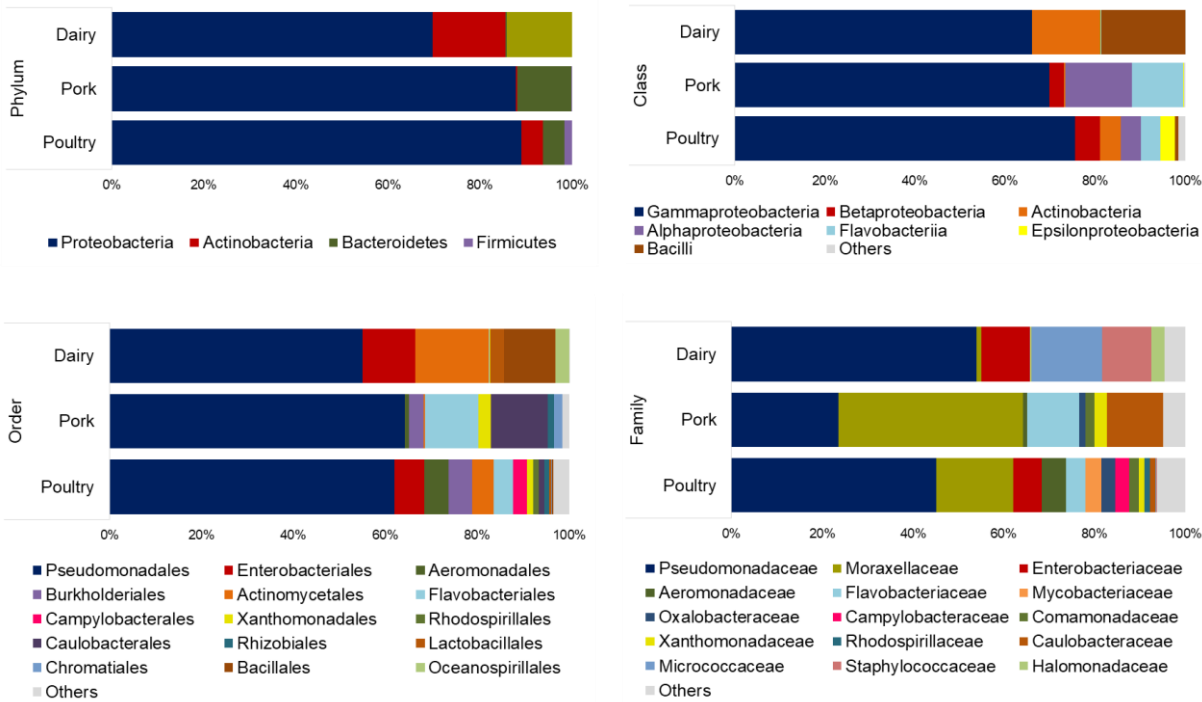
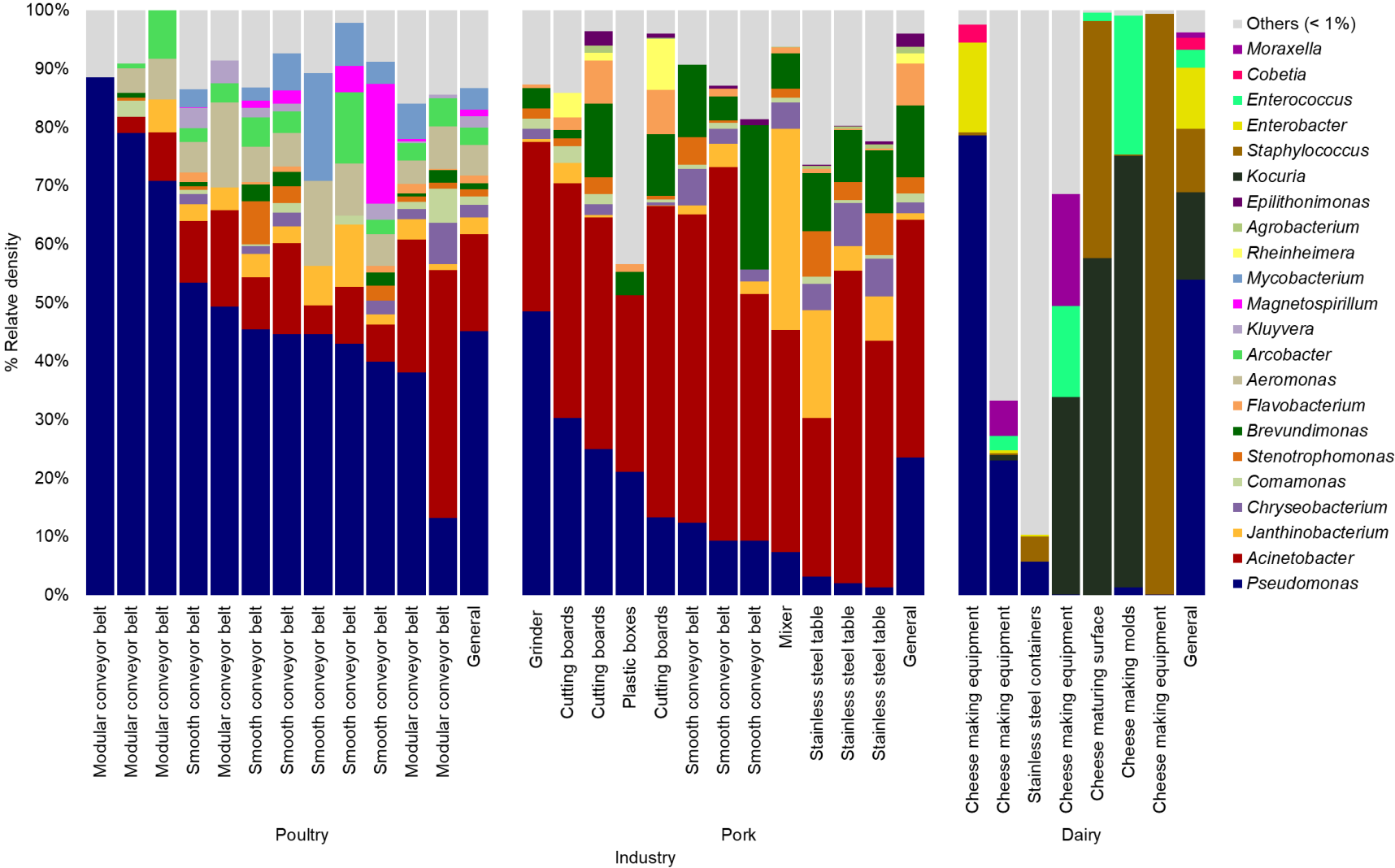


Figura 2: Filos, classes, ordens e famílias bacterianas identificadas de diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (*Poultry*), suínos (*Pork*) e laticínio (*Dairy*). Apenas DR>1% em pelo menos uma das amostras foram incluídas, as demais foram identificadas como “Others”. (Para interpretação das referências à cor nesta legenda da figura, o leitor deve consultar a versão online deste artigo).



1047

1048

1049

1050

Figura 3: Gêneros bacterianos identificados de diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (Poultry), suínos (Pork) e laticínio (Dairy). Apenas DR>1% em pelo menos uma das amostras foram incluídas, as demais foram identificadas como “Others”. (Para interpretação das referências à cor nesta legenda da figura, o leitor deve consultar a versão online deste artigo).

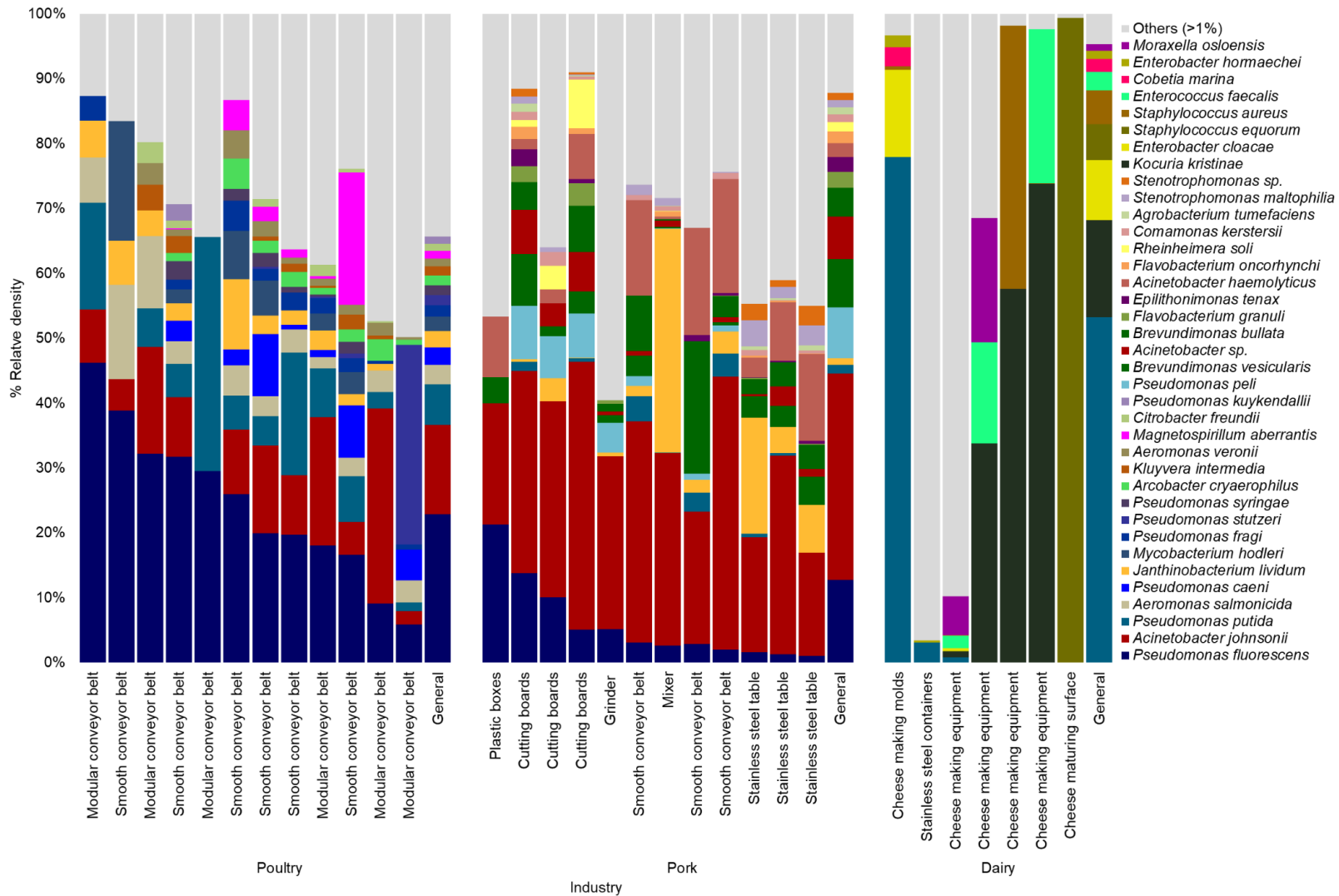


Figura 4: Espécies bacterianas identificadas de diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (*Poultry*), suínos (*Pork*) e laticínio (*Dairy*). Apenas DR>1% em pelo menos uma das amostras foram incluídas, as demais foram identificadas como “Others”. (Para interpretação das referências à cor nesta legenda da figura, o leitor deve consultar a versão online deste artigo).

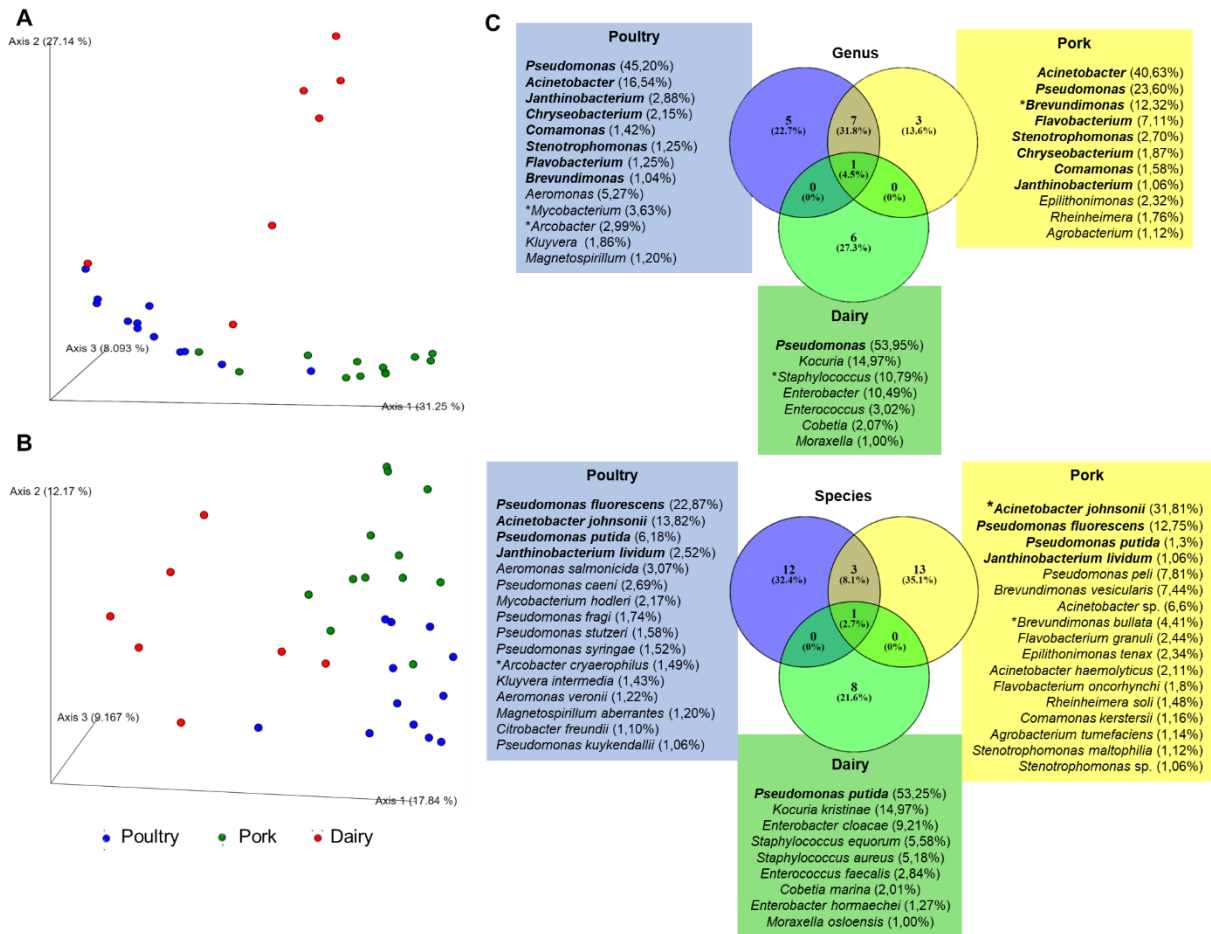
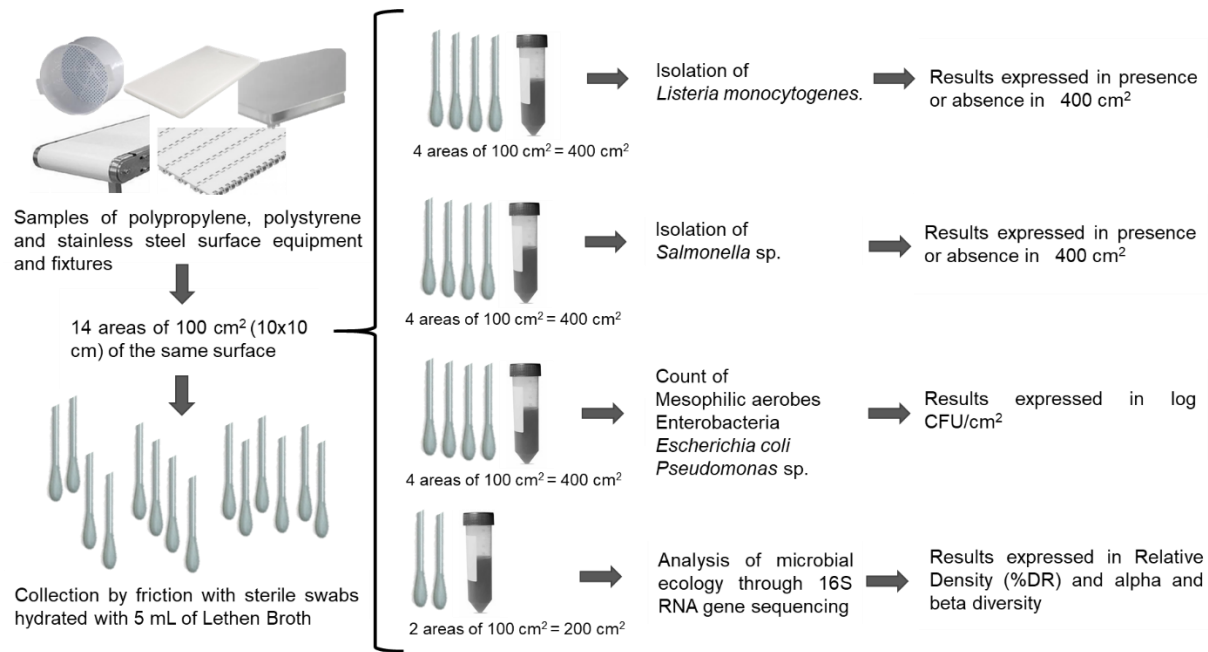


Figura 5: Análise das coordenadas principais (PCoA) baseado na métrica de dissimilaridade dos testes *Bray-Curtis distance* (A) e *Jaccard distance* (B) em amostras de superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacional em abatedouro de aves (Azul), suínos (Verde) e laticínio (vermelho). Diagrama de Venn (C) para gênero e espécies das OTUs com DR>1% identificados em cada indústria de processamento (Poultry, Pork e Dairy). Gêneros e espécies em negrito indicam que são microrganismos compartilhados em pelo menos uma das indústrias. *Indicam diferença estatística pelo teste *ANCOM Volcano Plot*. (Para interpretação das referências à cor nesta legenda da figura, o leitor deve consultar a versão online deste artigo).

1064 Tabela Suplementar 1: Genes alvo, sequências dos primers, função e especificidade utilizados para sorotificação, virulência e formação de biofilme dos
1065 isolados de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp.

Microrganismo	Gene	Sequência 5' → 3'	Função	pb	Temp Anel (°C)	Referência
<i>L. monocytogenes</i>	<i>prs</i>	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTGCGG	Identificação: Comum a espécie	370	53	Doumith et al. (2004)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>lmo0737</i>	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTCTGCTTGCCATTTC	Sorotificação: 1/2a, 1/2c, 3a e 3c	691	53	Doumith et al. (2004)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>lmo1118</i>	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTCGGCATACTTA	Sorotificação:1/2c e 3c	906	53	Doumith et al. (2004)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>ORF2819</i>	F: AGCAAAATGCCAAACTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	Sorotificação:1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e	471	53	Doumith et al. (2004)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>ORF2110</i>	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: ATCCATCCCTTACTTTGGAC	Sorotificação:4b, 4d e 4e	597	53	Doumith et al. (2004)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlA</i>	F: ACGAGTAACGGGACAAATGC R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	Internalização celular	800	55	Liu et al. (2007)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlB</i>	F: TGGGAGAGTAACCCAACCAC R: GTTGACCTTCGATGGTTGCT	Internalização celular	884	55	Liu et al. (2007)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlC</i>	F: AATCCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTCACTA	Internalização celular e disseminação célula a célula	517	55	Liu et al. (2007)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	F: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA R: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	Síntese de listeriolisina	456	60	Paziak-Domanska et al. (1999)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>actA</i>	F: CGCCGCGGAAATTAATAAAGA R: ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG	Polimerização de actina	839	60	Suarez e Vazquez-Boland (2001)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>prfA</i>	F: GGAAGCTTGGCTCTATTTGC R: ACAGCTGAGCTATGTGCGAT	Regulação da formação de biofilme	145	58	Pieta et al. (2014)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>flaA</i>	F: GTAAGCATCCAAGCGTCTGA R: AAGAATCAGCATCAGCAACG	Produção de flagelos e adesão inicial	148	58	Pieta et al. (2014)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>agrA</i>	F: CGGGTACTTGCCGTGTATGAA R: TGAATAGTTGGCGCTGTCTC	Quorum sensing e formação de biofilme	149	58	Pieta et al. (2014)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>agrB</i>	F: AGGTACATTTGGATTATACTGCTCAAC R: TCTTCAACCGATTAAAGGCAAACT	Quorum sensing e formação de biofilme	81	58	Autret et al. (2003)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>agrC</i>	F: ATTGACAAGATTTGATGGATAGTATAGATT R: CACAAGTTAACGCCGCTTCA	Quorum sensing e formação de biofilme	88	56	Autret et al. (2003)

<i>L. monocytogenes</i>	<i>agrD</i>	F: AAATCAGTTGGTAAATTCCTTTCTAG R: AATGGACTTTTGGTTCGTATACA	<i>Quorum sensing</i> e formação de biofilme	113	56	Rieu et al. (2007)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>luxS</i>	F: AAGCACCTTTTGTGAGACTGG R: CCGTTAGTGTGTAGCGATGA	<i>Quorum sensing</i> e formação de biofilme	273	60	Jiang et al., 2021
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	F: TTGTTACGGCTATTTTGACCA R: CTGACTGCTACCTTGCTGATG	Identificação	521	42	Swamy et al. (1996)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>orgA</i>	F: TTTTGGCAATGCATCAGGGAACA R: GGCGAAAGCGGGGACGGTATT	Reconhecimento e invasão	255	66,5	Skyberg et al. (2006)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>tolC</i>	F: TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC R: CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC	Reconhecimento e invasão	161	66,5	Skyberg et al. (2006)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>sifA</i>	F: TTTGCCGAACGCGCCCCACACG R: GTTGCCTTTCTTGCGCTTCCACCCATCT	Formação da estrutura de filamentos	449	66,5	Skyberg et al. (2006)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>sipA</i>	F: CCAGGGGTCGTTAGTGATTGCGTGAGATG R: CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	Sobrevivência em macrófagos	550	66,5	Skyberg et al. (2006)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>sipB</i>	F: GGACGCCGCCGGGAAAACTCTC R: AACTCCCGTCGCCGCCTTCACAA	Entrada em células não fagocíticas e morte de macrófagos	875	66,5	Skyberg et al. (2006)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>spvB</i>	F: CTATCAGCCCCGACGGAGAGCAGTTTTTA R: GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	Crescimento no hospedeiro	717	66,5	Skyberg et al. (2006)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>adrA</i>	F: GAAGCTCGTCGCTGGAAGTC R: TTCCGCTTAATTTAATGGCCG	Produção de celulose	92	58	Latasa et al. (2005)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>agfA</i>	F: GAAGCTCGTCGCTGGAAGTC R: TTCCGCTTAATTTAATGGCCG	Produção de fímbrias, adesão e formação de biofilme	101	58	Latasa et al. (2005)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>agfD</i>	F: TGCGGACTCGGTGCTGTTGT R: CAGGAACACGTGGTCAGCGG	Produção de fímbrias, adesão e formação de biofilme	123	60	Oliveira et al. (2014)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>sdiA</i>	F: AATATCGCTTCGTACCAC R: GTAGGTAAACGAGGAGCAG	<i>Quorum sensing</i>	274	52	Halatsi et al. (2006)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>csgD</i>	F: TCCTGGTCTTCAGTAGCGTAA R: TATGATGGAAGCGGATAAGAA	Produção e maturação do biofilme	168	56	Barak et al. (2005)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>csgB</i>	F: TCCTGGTCTTCAGTAGCGTAA R: TATGATGGAAGCGGATAAGAA	Produção e maturação do biofilme	168	56	Barak et al. (2005)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>luxS</i>	F: CGGGTTGCAAAAACGATGA R: GTTGAGGTGGTCGCGCATA	<i>Quorum sensing</i>	150	56	Nahar, et al (2021)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>rpoS</i>	F: GAATCTGACGAACACGCTCA R: CCACGCAAGATGACGATATG R: TCAATCATCCGCCTGTTCA	Estresse, crescimento e formação de biofilme	171	56	Nahar, et al (2021)



1068

1069

1070

1071

1072

Figura suplementar 1: Esquema utilizado para coleta de amostras de diferentes superfícies utilizadas no processamento de alimentos após o processo de higienização pré-operacioanal em abatedouro de aves, abatedouro de suínos e laticínios para detecção de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp., contagem de microrganismos indicadores e identificação da ecologia microbiana.

1073 **Highlights**

1074

1075 - Houve falhas nos programas de limpeza e sanitização do abatedouro de suínos e
1076 laticínio.

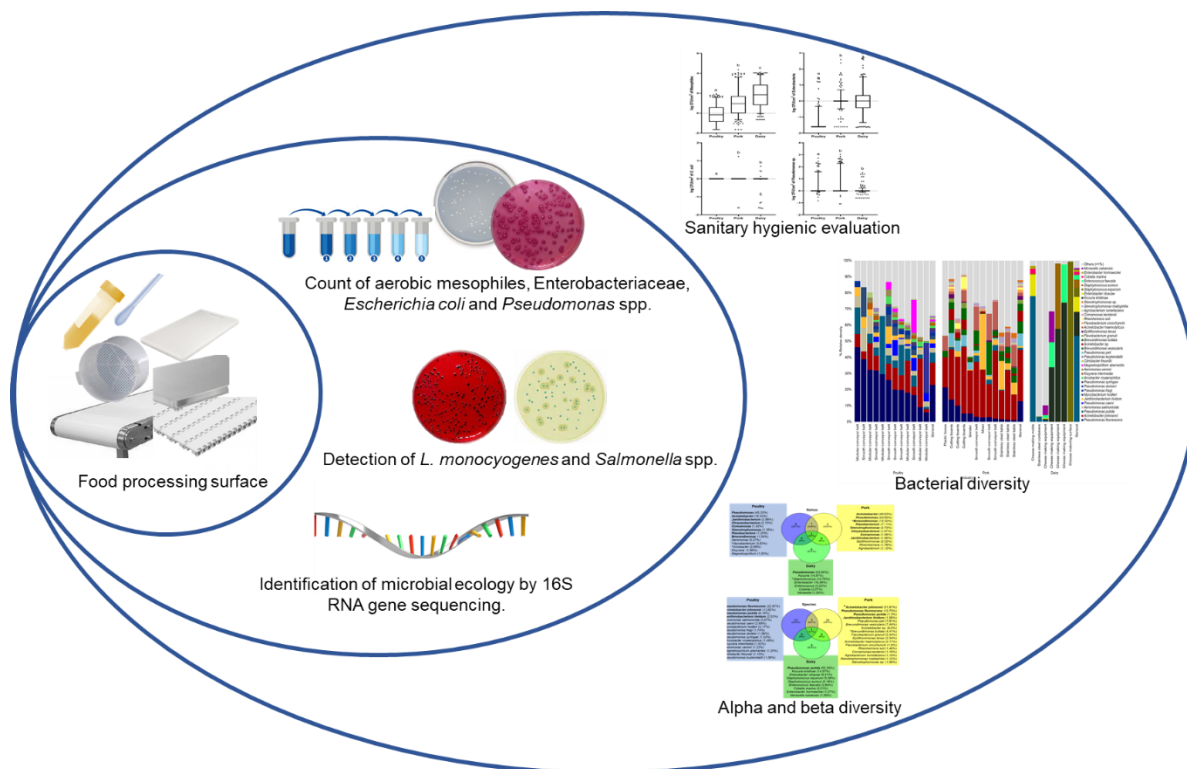
1077 - *L. monocytogenes* e *Salmonella* foram detectadas após a higienização pré-
1078 operacional

1079 - *Pseudomonas* foi um contaminante frequente em todas as indústrias.

1080 - A ecologia microbiana identificada foi diversa e abundante.

1081 **Resumo gráfico**

1082



1083

CAPÍTULO 3

Trabalho foi submetido para a revista *LWT – Food Science and Technology*.
INSS Online: 1096-1127.

Trabaho está formatado de acordo normas da revista
(<https://www.elsevier.com/journals/lwt/0023-6438/guide-for-authors>).

O processo de higienização pré-operacional interfere na ecologia microbiana e na presença de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em esteiras transportadoras de alimentos de um abatedouro frigorífico de aves no Brasil

Leonardo Ereno Tadielo^a, Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos^a, Fábio Sossai Possebon^a, Jhennifer Arruda Schmiedt^b, Paulo Henrique Silva Orisio^b, Lara Cristina Bastos Juliano^a, Camila Koutsodontis Cerqueira-Cézar^a, José Paes de Almeida Nogueira Pinto^a, Juliano Gonçalves Pereira^{a*}, Luciano dos Santos Bersot^{b*}

^a São Paulo State University (UNESP), Botucatu campus, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Distrito de Rubião Jr, SN, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^b Federal University of Paraná (UFPR), Palotina campus, Department of Veterinary Sciences, Rua Pioneiro, 2153, Jardim Dallas, 85950-000 Palotina, PR, Brazil.

*Corresponding authors

Luciano dos Santos Bersot: lucianobersot@ufpr.br

Juliano Gonçalves Pereira: juliano.pereira@unesp.br

19 **Resumo**

20 Este estudo teve como objetivo avaliar o processo de higienização pré-operacional de
21 um abatedouro de aves quanto à ecologia microbiana e presença de microrganismos
22 indicadores, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. Foram coletadas 320 amostras
23 de superfícies de esteiras transportadoras de cortes de cárneos de aves antes (n=160)
24 e após (n=160) o processo de limpeza e sanitização para contagem de aeróbios
25 mesófilos, Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* sp., detecção de *L. monocytogenes* e
26 *Salmonella* sp. e identificação da ecologia microbiana. O processo de higienização
27 reduziu as contagens de todos os microrganismos indicadores avaliados e eliminou
28 *Salmonella* sp. Apesar da redução significativa, *L. monocytogenes* permaneceu em
29 algumas esteiras. Microrganismos associados à obtenção de cortes de cárneos de
30 aves, incluindo *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Enterococcus* e *Pseudomonas*, foram
31 encontrados com maior abundância antes da higienização. Foi identificado uma
32 alteração na ecologia microbiana após a higienização, em que microrganismos com
33 maior adaptação e tolerância às condições industriais, como *Pseudomonas*,
34 *Acinetobacter* e *Aeromonas*, foram mais prevalentes. Nossos resultados revelaram
35 que os procedimentos de limpeza e sanitização foram eficazes na redução dos níveis
36 de microrganismos indicadores e *Salmonella* sp. O processo de higiene aplicado
37 também afetou a composição da ecologia microbiana existente, revelando
38 microrganismos capazes de formar biofilmes e tolerar os métodos de controle.

39

40 **Palavras-chave:** microbiota acompanhante, limpeza, superfícies de esteiras
41 transportadoras de alimentos, indústria de alimentos, ocorrência de patógenos.

1 Introdução

Durante o abate e processamento de cortes cárneos de aves, vários equipamentos e utensílios podem servir como fontes potenciais de microrganismos patogênicos e deteriorantes para alimentos (Samapundo et al., 2019; Viana et al., 2020; Agostinho Davanzo et al., 2021). A contaminação dessas superfícies pode estar associada à microbiota autóctone encontrada nas aves e ao processo tecnológico de obtenção de cortes de cárneos (Golden, Rothrock, & Mishra, 2021; Marmion, Ferone, Whyte, & Scannell, 2021). Para reduzir as chances de contaminação, as indústrias implementam procedimentos de limpeza e sanitização em suas instalações, que são realizados após os processos de produção, a fim de remover a matéria orgânica, reduzir a carga microbiana a níveis aceitáveis e eliminar microrganismos patogênicos (Møretrø & Langsrud, 2017).

No Brasil, a indústria de alimentos contam com a detecção de *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* e a contagem bacteriana total para avaliar a eficácia dos processos de higiene pré-operacional. Aeróbios mesófilos e enterobactérias são bons indicadores de qualidade desses processos de limpeza, pois são sensíveis aos métodos de controle empregados (EC, 2001; Saini et al., 2011); no entanto, alguns microrganismos, como *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. que habitam esses ambientes industriais podem ser tolerantes aos sanitizantes usados rotineiramente (Fagerlund, Møretrø, Heir, Briandet, & Langsrud, 2017; Carvalho et al., 2019; Voss-Rech et al., 2019; Cherifi, Arsenault, Quessy, & Fravalo, 2022).

Listeria monocytogenes e *Salmonella* sp. estão entre os principais microrganismos patogênicos veiculados por alimentos em todo o mundo (Brasil, 2020; CDC, 2022). Ambos podem se adaptar a condições estressantes por meio da formação de biofilme, sendo resistentes a antibióticos e sanitizantes, o que resulta em

isolados persistentes nesses ambientes (Magalhães et al., 2016; Lee, Hébraud, & Bernardi., 2017; Tamber, 2018; Carvalho et al. , 2019; Voss-Rech et al., 2019; Kipper et al., 2022).

A ecologia microbiana encontrada em superfícies industriais pode variar em número, composição e diversidade devido a mudanças de temperatura, tipo de alimento processado, presença de resíduos orgânicos e diferentes práticas de limpeza e sanitização aplicadas (De Filippis, Valentino, Alvarez-Ordóñez, Cotter , & Ercolini, 2021). Devido a esses aspectos, pode-se encontrar uma ecologia microbiana residente ou transitória nesses ambientes industriais. No entanto, a identificação em larga escala desses microrganismos por métodos microbiológicos convencionais não conseguem resultados significativos e robustos; assim, tecnologias baseadas no sequenciamento do gene 16S rRNA permitem uma melhor exploração das comunidades bacterianas encontradas nessas instalações (Doyle, O'Toole, & Cotter, 2017).

A caracterização da ecologia microbiana pelo sequenciamento do gene 16S rRNA em amostras de superfícies industriais coletadas antes e após os procedimentos de limpeza e sanitização pode facilitar a identificação das principais fontes de contaminação e, assim, avaliar a eficácia dos programas de controle nas indústrias (Gu et al., 2019; Maes et al., 2019; Caraballo Guzmán, González Hurtado, Cuesta-Astroz, & Torres. 2020). Além disso, permite determinar se a ecologia microbiana existente nessas instalações pode contribuir para a presença e sobrevivência de microrganismos patogênicos, especialmente por meio de biofilmes microbianos (Fagerlund et al., 2017; Rodríguez-López, Bernárdez, Rodríguez-Herrera, Comesaña , & Cabo, 2019; Haddad et al., 2017; al, 2021; Cherifi et al, 2022).

A caracterização ambiental de abatedouros frigoríficos de aves no Brasil tem

sido descrita pela contagem de microrganismos indicadores e detecção de patógenos em produtos, equipamentos e utensílios (Soares et al., 2014; Rodrigues et al., 2018; Soares et al., 2018; Viana et al., 2018; ., 2020; Carvalho et al., 2020; Agostinho Davanzo et al., 2021). No entanto, dados sobre a caracterização da ecologia microbiana em esteiras transportadoras de alimentos e avaliações de sua influência no processo de limpeza ainda são escassos. Portanto, novos estudos podem melhorar nosso conhecimento sobre a diversidade microbiana e a dinâmica populacional nessas instalações e melhorar as estratégias para garantir a qualidade dos alimentos.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do processo de limpeza pré-operacional utilizado em um abatedouro frigorífico de aves sobre a ecologia microbiana e a existência dos microrganismos indicadores, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em esteiras transportadoras de alimentos.

2 Material e métodos

2.1 Características do abatedouro frigorífico e amostragem

O estudo foi realizado na sala de corte de um abatedouro frigorífico de aves do Sul do Brasil, no período de setembro a novembro de 2020. Este abatedouro foi selecionado por possuir certificação sanitária oficial do Serviço de Inspeção Federal (SIF) e abate em torno de 500.000 aves por dia. A temperatura média da sala de corte foi ajustada para $10 \pm 1^\circ\text{C}$ durante todo o estudo. O processo de limpeza realizado nos equipamentos e utensílios durante o período de coleta das amostras compreendeu o processo de limpeza por meio de lavagem inicial, detergente alcalino espumante e enxágue final, seguido de sanitização com ácido peracético 0,5% por 10 min.

Quatro coletas de amostras foram realizadas em intervalos de 15 dias. Foram coletadas amostras das superfícies das esteiras transportadoras de cortes de carnes

antes (n=160) e após (n=160) o processo de limpeza pré-operacional, totalizando 320 amostras. Nas salas de corte foram selecionadas esteiras transportadoras de polipropileno do tipo modular (n=173; 54,06%) e do tipo lisa (n=147; 45,94%), que transportam cortes de carnes como coxas, sobrecoxas e sobrecoxas, peitos e asas.

As amostras foram coletadas aleatoriamente em 14 áreas de 100 cm² (moldes de 10 × 10 cm) da mesma superfície, perfazendo uma área total de 1.400 cm². Cada amostra foi dividida em quatro subamostras, das quais três subamostras (400 cm²) foram submetidas para contagem de microrganismos indicadores e *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., enquanto uma subamostra (200 cm²) foi submetida a identificação da ecologia microbiana (seções 2.2 , 2.3, 2.4, 2.5) (Figura complementar 1). Amostras de cada área foram coletadas por meio de swabs estéreis hidratados com solução salina 0,85% suplementada com peptona 0,1% e *Lethen Broth* (Merck, Darmstadt, Alemanha) para amostras coletadas antes e após o processo de higiene pré-operacional, respectivamente (Figura complementar 1).

2.2 Contagem de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* spp.

As amostras (quatro swabs = 400 cm², figura suplementar 1) foram submetidos a contagem de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* spp.. Para a contagem de aeróbios mesófilos foi adotada a metodologia ISO 4833-1 (ISO, 2013), na qual 1 mL de *Lethen Broth* (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi inoculado em placas contendo *Plate Count Agar* (PCA, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e incubados a 30±1°C por 72±3 h. A contagem para Enterobacteriaceae seguiu a metodologia ISO 21528-2 (ISO, 2004), na qual 1 mL da solução foi inoculado em placas de *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBGA, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) com posterior sobreposição, e incubados a 36±1°C por 24± 2 h. A contagem de

Pseudomonas spp. seguiu a ISO 13720 (ISO, 2010) com modificações, 0,1 mL de solução foi inoculado na superfície de placas de *Cetrimide Selective Agar* (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e incubado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2 h; as colônias características foram então submetidas ao teste da oxidase para confirmação dos isolados (Oxidase positiva). Todos os resultados são expressos em log UFC/cm².

2.3 Detecção de *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes foi isolada de acordo ISO 11.290-1 (ISO, 2017), com modificações. As amostras (quatro swabs = 400 cm²) foram hidratadas com 90 mL de *Listeria Enrichment Broth* (LEB, Difco™) e incubadas a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Em seguida, 0,1 mL foi transferido para *Fraser Broth* (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e incubado a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. Os tubos que apresentaram hidrólise de esculina (escurecimento do caldo) foram inoculados em placas contendo *Chromocult Listeria Seletivo Agar* (ALOA agar, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e *Oxford Listeria Agar* (OXA, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e incubados a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48h. Colônias características foram selecionadas, purificadas em *Tryptic Soy Agar* suplementado com 0,6% *Yeast Extract* (TSA-YE, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e submetidas à confirmação e identificação bioquímica (análise para produção de catalase; β -hemólise; motilidade; fermentação de dextrose, xilose, ramnose e manitol). Os isolados confirmados como *L. monocytogenes* em testes bioquímicos foram então submetidos ao protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação e sorotificação molecular segundo Doumith, Buchrieser, Glaser, Jacquet, & Martin (2004). Os resultados foram expressos em presença ou ausência de *L. monocytogenes* em 400 cm².

2.4 Detecção de *Salmonella* spp.

Salmonella spp. foi isolado de acordo ISO 6579 (ISO, 2017). As amostras (quatro swabs = 400 cm², figura suplementar 1) foram hidratadas com 90 mL de Buffered Peptone Water (APT, Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubadas a 37±1°C durante 18±2 h. Após a incubação, 1 mL foi transferido para *Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth* (MKTTn, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e 0,1 mL para *Rappaport-Vassiliadis Soya Broth* (RVS, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), e incubados por 24 ±3 h a 37±1°C e 41,5±1°C, respectivamente. Posteriormente, uma alíquota foi inoculada em *Xilose Lisina Deoxicolato Agar* (XLD, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e *Bismuth Sulphite Agar* (BS, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), incubados a 37±1°C por 24± 3h. Amostras com colônias características foram submetidas as análises bioquímicas (lisina, produção de H₂S, fermentação de açúcares, teste de citrato, ureia, vermelho de metila, Voges-Proskauer, produção de indol e motilidade) e confirmadas por PCR por meio do gene *invA* (Swamy, Barnhart, Lee, & Dreesen, 1996). Os resultados foram expressos em presença ou ausência de *Salmonella* spp. em área de 400 cm².

2.5 Identificação da ecologia microbiana por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA

O sequenciamento do gene 16S rRNA foi utilizado para avaliar a ecologia microbiana antes e após o processo de limpeza pré-operacional, assumindo um critério de avaliação de 12,5% das amostras coletadas (n=40, composto por 20 amostras de cada cenário). As amostras (dois swabs = 200 cm², figura suplementar 1) foram enviadas para *Neopropecta Microbiome Technologies*, SA Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, para extração de DNA, sequenciamento e análise

192 bioinformática.

193 As amostras foram centrifugadas a 14.000 × g a 4 °C por 10 min. O DNA foi
194 extraído usando *beads* magnéticas e identificado por sequenciamento de alto
195 desempenho das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado
196 com equipamento MiSeq (Illumina Inc., EUA) e kit V2 com 300 ciclos, single-end e
197 sem normalização de biblioteca. As bibliotecas foram preparadas pela amplificação
198 dos primers para a região V3-V4 do gene 16S rRNA: 341F
199 (CCTACGGGGRSGCAGCAG; Wang et al., 2009) e 806R
200 (GGACTACHVGGGTWTCTAAT; Caporaso et al., 2012).

201 As sequências foram analisadas por meio do *pipeline Sentinel*, os arquivos
202 *fastq* foram avaliados quanto à qualidade *Phred* (QP) usando o programa *FastQC*
203 *v.0.11.8* (Andrews, 2010). A seguir, os arquivos *fastq* foram submetidos à triagem de
204 *primers* e sequências com baixa qualidade (*Phred* < 20). O *software* utilizado para tal
205 finalidade foi construído em *Python v.3.6*, sendo este inspirado nas funcionalidades
206 do projeto *BioPython* (Cock et al. 2009). As identificações taxonômicas foram
207 realizadas com *blastn v.2.6.0+* (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990), usando
208 como referência um banco de dados próprio ou público. Quanto a definição de uma
209 espécie, dentre os 20 *hits* retornados para cada *cluster*, uma instrução em *Python*
210 avaliava se um dos três quesitos seriam atendidos pelos *hits*: 1) maior *bit-score*, 2)
211 menor *e-value*, e 3) taxonomias com maior representação. Os *hits* que atenderam um
212 dos itens anteriores, foram escolhidos como espécie representante

213

214 2.6 Análises estatísticas

215 Os resultados obtidos para aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae e
216 *Pseudomonas* spp. foram expressos como log UFC/cm² e submetidos ao teste de

UNIVARIATE (SAS Institute, Cary, NC, US) para avaliar os dados paramétricos. Posteriormente, foram calculados a média e o desvio padrão para cada grupo de microrganismos de acordo com o processo de higienização (antes e após) e tipo de superfície (esterilas modulares ou lisas). O teste *t-Student* (SAS Institute, Cary, NC, US) foi realizado para avaliar a eficácia da higienização nas amostras coletadas antes e após a higienização para cada microrganismo e tipo de esteira utilizada, $P < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. Os resultados para detecção de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. foram expressos em frequência e submetidos ao teste do *Chi-Square* (SAS Institute, Cary, NC, EUA) para verificar qualquer associação entre a existência de cada patógeno de acordo com o processo de higienização e o tipo de superfície, com significância de $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com auxílio do *Statistical Analysis Software* - SAS Institute (Cary, NC, US).

Os resultados do sequenciamento foram expressos em *reads* para cada amostra e posteriormente compilados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), calculando a distribuição relativa (DR) para filo, ordem, classe, família, gênero e espécie de acordo com a fase do processo de higienização (antes e após). A métrica de diversidade alfa foi avaliada usando o índice de *Shannon's diversity index*, *Observed OTUs* e *Evenness*. A métrica de diversidade beta foi avaliada usando os testes de *Bray-Curtis distance* e *Jaccard distance*, com seus resultados expressos graficamente por meio da análise das coordenadas principais (PCoA). Para avaliar se havia diferenças na abundância de gêneros e espécies de microrganismos de acordo com o processo de higienização, foi realizada a análise ANCOM. Todas as análises foram realizadas usando o QIIME 2 2017.4 (Bolyen et al. 2019).

3 Resultados

3.1 Efeito do processo de higienização na presença de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. e contagens de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* spp.

A figura 1 mostra a ocorrência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., juntamente com a contagem de microrganismos indicadores nas esteiras transportadoras de cortes cárneos de aves antes e após o processo de higienização. Apesar de uma redução significativa ($P<0,001$), *L. monocytogenes* ($n=3$; 1,9%) persistiu em algumas esteiras de polipropileno do tipo lisa ($n=2$; 1,3%) e tipo modular ($n=1$; 0,6%). *Salmonella* spp. foi isolado de 16,25% ($n=26$) das amostras antes do processo de higienização, mas não foi detectada após a higienização ($P<0,001$). Não foi observada correlação entre o tipo de superfície (lisa ou modular) e a presença de *L. monocytogenes* ou *Salmonella* spp. ($P>0,05$) (Figura 1).

Com relação aos microrganismos indicadores, observou-se diminuição em todos os grupos avaliados após os processos de higienização, tanto na contaminação geral das superfícies quanto no tipo de esteira ($P<0,05$) (Figura 1). Esteiras de polipropileno do tipo modular tiveram maior contaminação microbiana do que as de polipropileno do tipo lisa antes da higienização ($P<0,05$); entretanto, essa divergência não foi observada após a higienização ($P>0,05$), indicando que o processo de higienização empregado não depende do tipo de superfície analisada (Figura 1).

3.2 Descrição da ecologia microbiana em esteiras transportadoras de alimentos antes e após do processo de higienização

A ecologia microbiana do estudo foi caracterizada por 21 amostras, das quais, oito foram coletadas antes do processo de higienização e 13 após a higienização (as

demais amostras foram retiradas do estudo por não possuírem DNA suficiente para sequenciamento ou não terem passado pelos critérios de qualidade durante a análise bioinformática (≤ 50 por amostra)). Assim, foram identificadas 30.591 sequências do gene 16S rRNA, das quais 1.917 (média=240, mínimo=51 e máximo=1043) e 28.674 (média=2206, mínimo=55 e máximo=11949) caracterizaram a ecologia microbiana antes e após o processo de higienização, respectivamente.

Os principais filos identificados nas amostras coletadas antes do processo de higienização foram Proteobacteria (48,7%) e Firmicutes (45,5%); seguida pelas classes Bacilos (44,5%) e Gamaproteobacterias (41,0%); ordens Bacillales (33,4%), Pseudomonadales (30,6%) e Lactobacillales (10,4%); e famílias Paenibacillaceae (22,5%), Pseudomonadaceae (19,6%), Bacillaceae (10,4%) e Moraxellaceae (10,4%) (Figura 2). Nas amostras coletadas após o processo de higienização, predominaram o filo Proteobacteria (89,0%) e a classe Gammaproteobacteria (76,0%); Pseudomonadales (62,3%), Enterobacteriales (6,4%) e Aeromonadales (5,3%) estavam entre as principais ordens encontradas; Pseudomonadaceae (45,3%), Moraxellaceae (17,0%) e Enterobacteriaceae (6,3%) foram as principais famílias (Figura 2).

As amostras obtidas antes do processo de higienização apresentavam uma ecologia microbiana associada ao processo de produção de alimentos. Foram identificados 47 gêneros, entretanto, 16 gêneros estiveram entre os mais prevalentes ($DR > 1\%$), incluindo *Aneurinibacillus* (29,3%), *Anoxybacillus* (12,1%), *Enterococcus* (12,0%) e *Pseudomonas* (11,8%). No mesmo grupo foram identificadas 96 espécies, das quais 20 tiveram maior abundância ($DR > 1\%$), *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (19,8%), *Pseudomonas fluorescens* (8,9%), *Enterococcus cecorum* (8,0%) e *Anoxybacillus flavithermus* (7,7 %) foram as mais prevalentes (Figuras 3 e 4).

A ecologia microbiana das superfícies diferiu após o processo de higienização, provavelmente devido ao aumento da DR de alguns gêneros e espécies mais adaptados às condições industriais. Foram identificados 134 gêneros bacterianos, no entanto, apenas 14 agruparam o maior número de sequências (DR>1%), incluindo *Pseudomonas* (46,9%), *Acinetobacter* (17,1%), *Aeromonas* (5,5%) e *Arcobacter* (3,1%). Das 309 espécies identificadas, apenas 16 apresentaram DR>1%, incluindo *Pseudomonas fluorescens* (23,1%), *Acinetobacter johnsonii* (14,0%), *Pseudomonas putida* (6,2%), *Aeromonas salmonicida* (3,1%) e *Pseudomonas caeni* (2,9%). (Figuras 3 e 4). As sequências de 16S rRNA para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. não foram identificados na ecologia microbiana das amostras avaliadas.

3.3 Diversidades alfa e beta da ecologia microbiana com base no processo de higienização

Quando submetidas às análises de diversidade alfa, que identificam a composição dos microrganismos pelo seu grau de riqueza e igualdade na comunidade, as amostras não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em *Shannon's diversity index* ($P=0.0821$), *Observed OTUs* ($P=0.0809$) e *Evenness* ($P=0.8848$). No entanto, quando submetido a análises de diversidade beta, que compara a composição da ecologia microbiana em grupos de amostras distintas, uma diferença significativa foi notada para os testes de *Bray–Curtis distance* ($P=0.001$) e *Jaccard distance* ($P=0.001$), ilustrado graficamente pela métrica de dissimilaridade com PCoA nas figuras 5A e 5B. O PCoA revelou dois grupos (Figura 5A e 5B), compostos por amostras coletadas antes e após o processo de higienização, indicando que o número de microrganismos e suas abundâncias relativas em cada grupo diferiram de acordo com o processo de higienização.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas na abundância de gêneros e espécies pelo teste de ANCOM, a distribuição de gêneros e espécies bacterianas existentes (OTUs com DR>1%, com o número de *reads* convertido em log10) foi comparado avaliando a presença desses microorganismos nas amostras coletadas antes e após o processo de higienização. Três grupos distintos de microorganismos foram identificados em cada momento (Figura 6). O primeiro grupo foi constituído por microorganismos relacionados ao processo industrial de manipulação de cortes cárneos de aves (somente antes da higienização), o segundo grupo foi revelado durante a higienização das instalações industriais (somente após a higienização) e o terceiro grupo foi composto por microorganismos identificados em ambos os momentos, possivelmente tolerantes aos procedimentos de higiene (Figura 6A e 6B). O último grupo merece atenção, pois contém os gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Aeromonas* (Figura 6A), e as espécies *P. fluorescens*, *A. johnsonii*, *P. putida*, *Aeromonas salmonicida* e *P. caeni* (Figura 6B).

4 Discussão

Atualmente, não há parâmetros oficiais para contagem de microorganismos indicadores em equipamentos e utensílios utilizados para as indústrias no Brasil. Estudos anteriores realizados em abatedouros de aves demonstraram que contagens > 10 UFC/cm² para aeróbios mesófilos e 1 UFC/cm² para Enterobacteriaceae indicavam falhas nos procedimentos de higiene (Soares et al., 2018; Julião et al., 2018; Rodrigues et al., 2018). Com base nesses parâmetros, o processo de limpeza utilizado no presente estudo atendeu aos critérios estipulados (Figura 1).

A ausência de *Salmonella* spp. em esteiras transportadoras de cortes cárneos de aves após o processo de higienização em nosso estudo (Figura 1) diferem dos

identificados por Viana et al. (2020) e Agostinho Davanzo et al. (2021). Nossos resultados refletem boa eficiência dos programas de limpeza e sanitização na indústria avaliada, visto que a mesma possuía a implementação de programas de autocontrole que estipulava parâmetros internos de qualidade higienicossanitária das instalações para atender habilitações legais de exportação, bem como, participava dos programas governamentais para a redução de *Salmonella* sp. regulamentados para a Instrução Normativa nº 20 (Brasil, 2016), a qual visa monitorar a contaminação por *Salmonella* sp. desde a aquisição da matéria-prima até os produtos finais. *Salmonella* spp. pode estar presente na microbiota das aves e facilmente se espalhar por meio de contaminação cruzada entre produtos e equipamentos nas instalações industriais (Menanteau et al., 2018; Kipper et al., 2022). Diante disso, nossos resultados reforçam a necessidade de constante avaliação e validação de métodos de controle industrial para redução da contaminação de *Salmonella* spp. em esteiras transportadoras de alimentos.

A presença de *L. monocytogenes* após a higienização foi baixa (Figura 1), corroborando com outros estudos realizados em abatedouros de aves no Brasil (Schafer et al., 2017; Viana et al., 2020; Agostinho Davanzo et al., 2021). Esses estudos revelaram que *L. monocytogenes* é altamente adaptada a locais de produção e manipulação de alimentos, como esteiras transportadoras, utensílios, tábuas de corte e ralos. A presença de *L. monocytogenes* pode ser decorrente de contaminação cruzada entre os produtos e as superfícies (Oliveira et al., 2018). Além disso, este patógeno possui mecanismos genotípicos e fenotípicos que facilitam sua persistência em diversas superfícies de processamento de alimentos associados à sua capacidade de formar biofilmes e tolerar a ação de sanitizantes (Lee et al., 2017; Carvalho et al., 2019; Agostinho Davanzo et al., 2021). Nosso estudo corrobora com esses estudos,

pois foi possível a identificação de *L. monocytogenes* contaminando o mesmo local de coleta antes e após o processo de limpeza em dias diferentes de coleta, o que pode sugerir persistência do microrganismo.

Muitas vezes, as equipes de autocontrole das indústrias desconhecem o *status* da frequência desse microrganismo em suas instalações, visto que a legislação brasileira estabelece apenas critérios de avaliação para produtos prontos para o consumo (Brasil, 2009) ou realizam a pesquisa em pontos específicos da indústria com número reduzido de amostras, não retratando a eficácia do processo de higienização como um todo. O controle de *L. monocytogenes* nas indústrias é desafiador; no entanto, a utilização de equipamentos com projeto sanitário adequado e a verificação das não conformidades e sua manutenção, aliada a medidas eficazes de limpeza e sanitização, podem contribuir para baixos índices de contaminação das instalações.

A ecologia microbiana das amostras coletadas antes do processo de higienização revelou microrganismos adaptados à microbiota das aves e que podem promover a contaminação de superfícies industriais por meio do contato com pele, ossos e cortes cárneos. Aproximadamente 53,4% das DR em nível de gênero pertenciam a *Aneurinibacillus* (29,3%), *Anoxybacillus* (12,1%) e *Enterococcus* (12%) (Figura 3 e 4), esses microrganismos são frequentemente relacionados à produção avícola (Rothrock et al. 2016 , Boovaragamoorthy et al., 2019; Zhang et al., 2020; Souillard et al., 2022).

A contaminação pelo gênero *Aneurinibacillus* e espécie *A. aneurinilyticus* não foi relatada em superfícies industriais; portanto, acreditamos que possa ser um microrganismo do ambiente de criação de frangos de corte, devido seu isolamento prévio em cama de frango (Boovaragamoorthy et al., 2019). *Anoxybacillus* já foi

relacionado à microbiota intestinal de frangos de corte (Kunert-Filho et al., 2022) e foi considerado o um gênero dominante entre as fases de pré e pós-resfriamento de carcaças (Rothrock et al., 2016; Zhang et al., 2020). *Enterococcus* foi encontrado na microbiota intestinal de aves e *E. cecorum* é relacionado a doenças locomotoras nas aves como artrite, osteomielite e miosite, promovendo a contaminação das superfícies pelo contato com pele e músculos (Souillard et al., 2022). No entanto, esses três microrganismos são sensíveis aos sanitizantes utilizados pelas indústrias de alimentos (Palanisamy, Seale, Turner, & Hemar, 2019; Sahulka et al., 2021), o que corrobora com nossos resultados, pois todos foram identificados apenas antes do processo de higienização (Figura 6).

Nosso estudo revelou que 64% da ecologia microbiana encontrada nas superfícies das esteiras transportadoras de cortes cárneos de aves após a higienização foi composta por *Pseudomonas* (46,9%) e *Acinetobacter* (17,1%) (Figuras 3 e 4). Resultados semelhantes foram relatados por Fagerland et al. (2017), em que ambos os microrganismos foram os gêneros mais abundantes nas esteiras transportadoras após a limpeza e sanitização em duas indústrias de processamento de produtos cárneos prontos para consumo, e também foram os mais prevalentes em biofilmes multiespécies *in vitro*. Ambos os gêneros mostraram-se resistentes a procedimentos de limpeza dentro de indústrias de produtos cárneos processados (mortadela e presunto) (Caraballo Guzmán et al. 2020) e em salas de processamento de carne suína (Hascoët, Ripolles-Avila, Guerrero-Navarro, & Rodríguez-Jerez, 2019; Cabo-Diaz et al., 2021).

Pseudomonas é um microrganismo frequentemente isolado em água, ambientes industriais e produtos cárneos (Fagerland et al., 2017; Maes et al., 2019). Em instalações industriais, *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. fragi* são as espécies mais

abundantes devido a capacidade de formar biofilmes e tolerar a sanitizantes (Fagerland et al. 2017; Castro, da Silva Fernandes, Kabuki, & Kuaye, 2021; Haddad et al., 2021). Os resultados do presente estudo corroboram com esses cenários, pois entre as 10 espécies com maior DR após procedimentos de higiene, *P. fluorescens* (23,1%), *P. putida* (6,2%), *P. caeni* (2,9%), *P. fragi* (1,8%) e *P. stutzeri* (1,6%) estão presentes. Outro fato importante é que *Pseudomonas* aumentou sua abundância entre os processos, com o DR médio aumentando de 11,8% para 46,9% após a higienização. Isso pode estar relacionado a redução de alguns gêneros sensíveis à higienização e à tolerância de *Pseudomonas* a resistir as etapas de limpeza e sanitização (Figura 6). A avaliação da contagem total das superfícies mostrou diferença estatisticamente significativa de acordo com o processo de higienização utilizado ($P>0,05$). No entanto, essa diferença não foi observada para as esteiras de polipropileno do tipo lisa (Figura 1), o que pode explicar esse resultado. Por ser um microrganismo adaptado ao ambiente industrial e que pode influenciar diretamente na sobrevivência de microrganismos patogênicos (Pang & Yuk et al., 2019; Pang, Chen, & Yuk 2020; Haddad et al., 2021), nossos resultados sugerem que em indústrias onde os programas de autocontrole estejam em bons níveis, deve haver a inclusão das contagens em placas para *Pseudomonas* sp. ou análise do sequenciamento do gene 16S rRNA em amostras de superfícies de equipamentos e utensílios após os procedimentos de higienização, com a finalidade de reduzir ainda mais os riscos de contaminação.

Tanto *Acinetobacter* quanto *A. johnsonii* merecem destaque em nosso estudo, pois suas DR aumentaram aproximadamente 10% após a higienização, tornando-se o segundo gênero e espécie mais identificados após a higienização (Figura 3, 4 e 6). *Acinetobacter johnsonii* possui boa adaptabilidade ambiental, pois possui fatores de

virulência, capacidade de formar biofilmes e resistência a antibióticos e sanitizantes (Castillo-Ramírez, Mateo-Estrada, Gonzalez-Rocha, & Opazo-Capurro 2020; Jia, Liu, Feng , & Wang, 2022), podendo estar relacionado com a deterioração de produtos cárneos (Wang & Xie et al., 2020). *Aeromonas* (5,5%) e as espécies *A. salmonocida* (3,1%) e *A. veronii* (1,2%) foram identificadas nas superfícies após a higienização com altas DR (Figura 3, 4 e 6). Esse fato pode ser explicado pela presença na microbiota das aves (Mourad, Ellakany, Awad, Khalil, & Gouda, 2022) sendo capazes de colonizar os locais de manipulação dos cortes cárneos (Sheir, Ibrahim, Hassan, & Shawky, 2020).

A alfa diversidade indicou que a ecologia microbiana descrita em cada momento obtiveram o mesmo grau de riqueza e abundância. Apesar disso, a beta diversidade explicada por meio dos testes de *Bray-Curtis distance*, *Jaccard distance* e PCoA (Figura 6A e 6B), mostrou que a ecologia microbiana das superfícies apresentou diferença de acordo a composição das espécies identificadas, essa diferença é proporcionada tanto em relação ao número de microrganismos como sua densidade absoluta e relativa. Isso fica melhor ilustrado na figura 7, onde mostra-se os gêneros e espécies (OTUs com DR>1%) identificados durante cada momento de avaliação, ocasionando a divisão dos microrganismos em três grupos distintos. Os gêneros de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Aeromonas* (Figura 7A) e as espécies de *P. fluorescens*, *A. johnsonii*, *P. putida*, *A. salmonocida* e *P. caeni*, as quais foram os grupos de microrganismos que habitaram ambos os processos merecem destaque, pois são microrganismos relacionados a uma possível formação de biofilmes e tolerância as etapas de limpeza e sanitização empregadas pela indústria avaliada.

5 Conclusão

Observamos redução significativa dos microrganismos indicadores e eliminação de *Salmonella* spp. após a higienização. No entanto, *L. monocytogenes* permaneceu em alguns locais mesmo após a higienização. Da mesma forma, alguns microrganismos como *P. fluorescens*, *A. johnsonii*, *P. putida* e *A. salmonicida* permaneceram nas superfícies analisadas e podem ser tolerantes ao processo de higienização e capazes de formar biofilmes. Portanto, a caracterização da ecologia microbiana em instalações de processamento de cortes cárneos de aves evidenciada em nosso estudo pode ajudar futuras estratégias de higienização e desenvolver métodos de controle preventivo para melhorar a segurança alimentar durante o processamento industrial.

Declaração de contribuição de autoria CRediT

Leonardo Ereno Tadielo: Conceituação, Investigação, Metodologia, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos: Metodologia, Investigação, Redação – revisão e edição. Fábio Sossai Possebon: Metodologia, Investigação, Redação – revisão e edição. Jhennifer Arruda Schmiedt: Metodologia, Redação – revisão e edição. Paulo Henrique Silva Orisio: Metodologia, Redação – revisão e edição. Lara Cristina Bastos Juliano: Metodologia, Redação – resenha e edição. Camila Koutsodontis Cerqueira-Cézar: Metodologia, Redação – resenha e edição. José Paes de Almeida Nogueira Pinto: Conceituação, Investigação, Metodologia, Supervisão, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. Juliano Gonçalves Pereira: Conceituação, Investigação, Metodologia, Supervisão, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. Luciano dos Santos Bersot: Conceituação, Investigação, Metodologia, Supervisão,

492 Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição.

493

494 **Declaração de conflito de interesse**

495 Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

496

497 **Agradecimentos**

498 A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil
 499 (bolsa de doutorado para Leonardo Ereno Tadielo) por meio do Processo FAPESP nº
 500 2020/01529-9, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
 501 (CAPES, Brasília, DF, Brasil). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
 502 Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brasil), Projeto CAPES-PRINT AUXPE
 503 88881.310254/2018-01,

504

505 **Referências**

- 506 Agostinho Davanzo, E. F., Dos Santos, R. L., Castro, V. H. D. L., Palma, J. M., Pribul, B. R., Dallago,
 507 B. S. L., Fuga, B., Medeiros, M., Almeida, S. S. T., Costa, H. M. B., Rodrigues, D. P., Lincopan,
 508 N., Perecmanis, S., & Santana, A. P. (2021). Molecular characterization of *Salmonella* spp. and
 509 *Listeria monocytogenes* strains from biofilms in cattle and poultry slaughterhouses located in the
 510 federal District and State of Goiás, Brazil. *PLoS One*, 16(11), e0259687.
 511 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259687>
 512 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local-alignment search
 513 tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
 514 [2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
 515 Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Acesso em:
 516 <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>.
 517 Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H.,
 518 Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn,
 519 C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., Da Silva,
 520 R., Diener, C., Dorrestein, P. C., Douglas, G. M., Durall, D. M., Duvallet, C., Edwardson, C., Ernst,
 521 M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J. M., Gibbons, S. M., Gibson, D. L., Gonzalez, A., Gorlick,
 522 K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G. A., Janssen, S.,
 523 Jarmusch, A. K., Jiang, L., Kaehler, B. D., Kang, K. B., Keefe, C. R., Keim, P., Kelley, S., T.,
 524 Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M. G. I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.,
 525 Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B. D., McDonald, D., McIver, L. J.,
 526 Melnik, A. V., Metcalf, J. L., Morgan, S. C., Morton, J. T., Naimey, A. T., Navas-Molina, J. A.,
 527 Nothias, L. F., Orchanian, S. B., Pearson, T., Peoples, S. L., Petras, D., Preuss, M. L., Priesse,
 528 E., Rasmussen, L. B., Rivers, A., Robeson, M. S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer,
 529 A., Sinha, R., Song, S. J., Spear, J. R., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Torres, P. J., Trinh,

- P., Tripathi, A., Turnbaugh, P. J., Ul-Hasan, S., Hooft, J. J. J. V., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., Hippel, M. V., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K. C., Williamson, C. H. D., Willis, A. D., Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Boovaragamoorthy, G. M., Anbazhagan, M., Piruthiviraj, P., Pugazhendhi, A., Kumar, S. S., Al-Dhabi, N. A., Ghilan, A. M., Arasu, M. V., & Kaliannan, T. (2019). Clinically important microbial diversity and its antibiotic resistance pattern towards various drugs. *Journal of Infection and Public Health*, 12(6), 783-788. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.08.008>
- Brasil, 2009. Instrução Normativa nº 9, de 8 de abril de 2009. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA.
- Brasil. 2016. Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA.
- Brasil, 2020. Ministério da Saúde, Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-diarreicaaguda>>. Acesso em: 15 de novembro de 2022.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J., A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6(8), 1621-1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Caraballo Guzmán, A., González Hurtado, M. I., Cuesta-Astro, Y., & Torres, G. (2020). Metagenomic characterization of bacterial biofilm in four food processing plants in Colombia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(3), 1259-1267. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00260-x>
- Carvalho, F. T., Vieira, B. S., Vallim, D. C., Carvalho, L. A., Carvalho, R. C., Pereira, R. C., & Figueiredo, E. E. (2019). Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. *LWT-Food Science and Technology*, 109, 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.099>
- Castillo-Ramírez, S., Mateo-Estrada, V., Gonzalez-Rocha, G., & Opazo-Capurro, A. (2020). Phylogeographical analyses and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter johnsonii* highlight its clinical relevance. *MSphere*, 5(4), e00581-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00581-20>
- Castro, M. S. R., da Silva Fernandes, M., Kabuki, D. Y., & Kuaye, A. Y. (2021). Modelling *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on stainless steel surfaces and controlling through sanitisers. *International Dairy Journal*, 114, 104945. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104945>
- CDC, 2022. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Outbreak Tracking and Reporting (FOOD Tool). Disponível em: <<https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>>. Acesso em: 15 de novembro de 2022.
- Cherifi, T., Arsenault, J., Quessy, S., & Fravallo, P. (2022). Co-Occurrence of *L. monocytogenes* with Other Bacterial Genera and Bacterial Diversity on Cleaned Conveyor Surfaces in a Swine Slaughterhouse. *Microorganisms*, 10(3), 613. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030613>
- Cobo-Díaz, J. F., Alvarez-Molina, A., Alexa, E. A., Walsh, C. J., Mencía-Ares, O., Puente-Gómez, P., Prieto, B., Crispie, F., Ruiz, L., González-Raurich, M., López, M., Prieto, M., Cotter, P., & Alvarez-Ordóñez, A. (2021). Microbial colonization and resistome dynamics in food processing environments of a newly opened pork cutting industry during 1.5 years of activity. *Microbiome*, 9(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01131-9>
- Cock, P. J., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., & De Hoon, M. J. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422-1423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>
- De Filippis, F., Valentino, V., Alvarez-Ordóñez, A., Cotter, P. D., & Ercolini, D. (2021). Environmental microbiome mapping as a strategy to improve quality and safety in the food industry. *Current Opinion in Food Science*, 38, 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.11.012>
- Doyle, C. J., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2017). Metagenome-based surveillance and diagnostic approaches to studying the microbial ecology of food production and processing environments. *Environmental Microbiology*, 19(11), 4382-4391. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13859>
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major

- Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819-3822. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>
- European Commission. 2001. Commission Decision 2001/471/EC of 8 June 2001 laying down rules for the regular checks in the general hygiene carried out by the operators in establishments according to Directive 64/433/EEC on health conditions for the production and marketing of fresh meat and Directive 71/118/ECC on health problems affecting the production and placing on the market of fresh poultry meat. Off. J. Eur. Communities L 165:48–53.
- Fagerlund, A., Møretrø, T., Heir, E., Briandet, R., & Langsrud, S. (2017). Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17), e01046-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01046-17>
- Golden, C. E., Rothrock Jr, M. J., & Mishra, A. (2021). Mapping foodborne pathogen contamination throughout the conventional and alternative poultry supply chains. *Poultry Science*, 100(7), 101157. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101157>
- Gu, G., Ottesen, A., Bolten, S., Wang, L., Luo, Y., Rideout, S., Lyu, S., & Nou, X. (2019). Impact of routine sanitation on the microbiomes in a fresh produce processing facility. *International Journal of Food Microbiology*, 294, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.002>
- Haddad, S., Elliot, M., Savard, T., Deschênes, L., Smith, T., & Ells, T. (2021). 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*, 123, 107720. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107720>
- Hascoët, A. S., Ripolles-Avila, C., Guerrero-Navarro, A. E., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Microbial ecology evaluation of an iberian pig processing plant through implementing SCH sensors and the influence of the resident microbiota on *Listeria monocytogenes*. *Applied Sciences*, 9(21), 4611. <https://doi.org/10.3390/app9214611>
- ISO. 1998. ISO 15214. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 °C. Geneva: ISO
- ISO. 2004. ISO 21528-2. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count technique. Geneva: ISO
- ISO. 2010. ISO 13720. Meat and meat products — Enumeration of presumptive *Pseudomonas* spp. Geneva: ISO
- ISO. 2013. ISO 4833-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. Geneva: ISO
- ISO. 2017. ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Geneva: ISO.
- ISO. 2017. ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.: Detection method. Geneva: ISO.
- Jia, J., Liu, M., Feng, L., & Wang, Z. (2022). Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation of *Acinetobacter johnsonii*. *Gene*, 808, 145985. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145985>
- Julião, T. A., Cortezi, A. M., Rossi, G. A. M., D'Abreu, L. F., Balieiro, J. C. D. C., & Vidal, A. M. C. (2018). Influence of the cleaning system of conveyor belts on microbiological quality of poultry meat. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70, 1325-1332. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9674>
- Kipper, D., Mascitti, A. K., De Carli, S., Carneiro, A. M., Streck, A. F., Fonseca, A. S. K., Ikuta, N., & Lunge, V. R. (2022). Emergence, Dissemination and Antimicrobial Resistance of the Main Poultry-Associated *Salmonella* Serovars in Brazil. *Veterinary Sciences*, 9(8), 405. <https://doi.org/10.3390/vet9080405>
- Kunert-Filho, H. C., Furian, T. Q., Sesterhenn, R., Chitolina, G. Z., Willsmann, D. E., Borges, K. A., Salle, C. T. P., Moraes, H. A. S., & do Nascimento, V. P. (2022). Bacterial community identification in poultry carcasses using high-throughput next generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 364, 109533. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109533>
- Lee, B. H., Hébraud, M., & Bernardi, T. (2017). Increased adhesion of *Listeria monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02221>
- Maes, S., Heyndrickx, M., Vackier, T., Steenackers, H., Verplaetse, A., & Reu, K. D. (2019). Identification and spoilage potential of the remaining dominant microbiota on food contact surfaces after cleaning and disinfection in different food industries. *Journal of Food Protection*, 82(2), 262-275. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-226>

- Magalhães, R., Ferreira, V., Brandão, T. R., Palencia, R. C., Almeida, G., & Teixeira, P. (2016). Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: A focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. *Food Microbiology*, 57, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.005>
- Marmion, M., Ferone, M. T., Whyte, P., & Scannell, A. G. M. (2021). The changing microbiome of poultry meat, from farm to fridge. *Food Microbiology*, 99, 103823. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103823>
- Menanteau, P., Kempf, F., Trotereau, J., Virlogeux-Payant, I., Gitton, E., Dalifard, J., Gabriel, I., Rychlik, I., & Velge, P. (2018). Role of systemic infection, cross contaminations and super-shedders in *Salmonella* carrier state in chicken. *Environmental Microbiology*, 20(9), 3246-3260. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14294>
- Mourad, D. M., Ellakany, H. F., Awad, A. M., Khalil, R. H., & Gouda, A. S. A. (2022). Prevalence and Pathogenicity of *Aeromonas* Species in Poultry. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences*, 5(1): 1100. ISSN: 2640-1223
- Mørretrø, T., & Langsrud, S. (2017). Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1022-1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
- Oliveira, T. S., Varjao, L. M., da Silva, L. N. N., Pereira, R. D. C. L., Hofer, E., Vallim, D. C., & de Castro Almeida, R. C. (2018). *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. *Food Control*, 88, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.015>
- Palanisamy, N., Seale, B., Turner, A., & Hemar, Y. (2019). Low frequency ultrasound inactivation of thermophilic bacilli (*Geobacillus* spp. and *Anoxybacillus flavithermus*) in the presence of sodium hydroxide and hydrogen peroxide. *Ultrasonics Sonochemistry*, 51, 325-331. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.09.025>
- Pang, X., & Yuk, H. G. (2019). Effects of the colonization sequence of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on survival of biofilm cells under food-related stresses and transfer to salmon. *Food Microbiology*, 82, 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.002>
- Pang, X., Chen, L., & Yuk, H. G. (2020). Stress response and survival of *Salmonella* Enteritidis in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens* following repeated exposure to quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 325, 108643. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108643>
- Rodrigues, L. B., Santos, L. R. D., Rizzo, N. N., Ferreira, D., Oliveira, A. P. D., Levandowski, R., Webber, B., & Nascimento, V. P. D. (2018). ATP-bioluminescence and conventional microbiology for hygiene evaluation of cutting room surfaces in poultry slaughterhouse. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46 (2018). <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81882>
- Rodríguez-López, P., Bernárdez, M., Rodríguez-Herrera, J. J., Comesaña, Á. S., & Cabo, M. L. (2019). Identification and metagenetic characterisation of *Listeria monocytogenes* harbouring communities present in food-related industrial environments. *Food Control*, 95, 6-17. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.023>
- Rothrock Jr, M. J., Locatelli, A., Glenn, T. C., Thomas, J. C., Caudill, A. C., Kiepper, B. H., & Hiett, K. L. (2016). Assessing the microbiomes of scalding and chiller tank waters throughout a typical commercial poultry processing day. *Poultry Science*, 95(10), 2372-2382. <https://doi.org/10.3382/ps/pew234>
- Sahulka, S. Q., Bhattarai, B., Bhattacharjee, A. S., Tanner, W., Mahar, R. B., & Goel, R. (2021). Differences in chlorine and peracetic acid disinfection kinetics of *Enterococcus faecalis* and *Escherichia fergusonii* and their susceptible strains based on gene expressions and genomics. *Water Research*, 203, 117480. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117480>
- Saini, P. K., Marks, H. M., Dreyfuss, M. S., Evans, P., Cook Jr, L. V., & Dessai, U. (2011). Indicator organisms in meat and poultry slaughter operations: their potential use in process control and the role of emerging technologies. *Journal of Food Protection*, 74(8), 1387-1394. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-433>
- Samapundo, S., de Baenst, I., Aerts, M., Cnockaert, M., Devlieghere, F., & Van Damme, P. (2019). Tracking the sources of psychrotrophic bacteria contaminating chicken cuts during processing. *Food Microbiology*, 81, 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.003>
- Schafer, D. F., Steffens, J., Barbosa, J., Zeni, J., Paroul, N., Valduga, E., Junges, A., Backes, G. T., & Cansian, R. L. (2017). Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 393-398. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.024>
- Sheir, S. H., Ibrahim, H., Hassan, M. A., & Shawky, N. A. (2020). Prevalence of *Aeromonas* spp and

- their virulence factors isolated from frozen chicken meat products. *Benha Veterinary Medical Journal*, 39(1), 47-51. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2020.37742.1237>
- Soares, V. M., Pereira, J. G., Zanette, C. M., Nero, L. A., Pinto, J. P. D. A. N., Barcellos, V. C., & Bersot, L. S. (2014). Cleaning conveyor belts in the chicken-cutting area of a poultry processing plant with 45 °C water. *Journal of Food Protection*, 77(3), 496-498. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-340>
- Soares, V. M., Viana, C., Pereira, J. G., Destro, M. T., Nero, L. A., dos Santos Bersot, L., & Pinto, J. P. D. A. N. (2018). Absence of a continuous water spray system does not influence the microbiological contamination of the conveyor belts in chicken slaughterhouses. *LWT-Food Science and Technology*, 97, 414-418. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.035>
- Souillard, R., Laurentie, J., Kempf, I., Le Caër, V., Le Bouquin, S., Serron, P., & Allain, V. (2022). Increasing incidence of *Enterococcus* associated diseases in poultry in France over the past 15 years. *Veterinary Microbiology*, 269, 109426. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109426>
- Swamy, S. C., Barnhart, H. M., Lee, M. D., & Dreesen, D. W. (1996). Virulence determinants *invA* and *spvC* in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3768-3771. <https://doi.org/10.1128/aem.62.10.3768-3771.1996>
- Tamber, S. (2018). Population-wide survey of *Salmonella enterica* response to high-pressure processing reveals a diversity of responses and tolerance mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(2), e01673-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01673-17>
- Voss-Rech, D., Kramer, B., Silva, V. S., Rebelatto, R., Abreu, P. G., Coldebella, A., & Vaz, C. S. L. (2019). Longitudinal study reveals persistent environmental *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. *Veterinary Microbiology*, 233, 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.004>
- Viana, C., Soares, V. M., Pereira, J. G., Tadielo, L. E., Nero, L. A., Pinto, J. P. D. A. N., & dos Santos Bersot, L. (2020). Effect of a water spray system on the presence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* on conveyor belts in chicken slaughterhouses. *LWT-Food Science and Technology*, 122, 109017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109017>
- Wang, Y., & Qian, P. Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PloS One*, 4(10), e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
- Wang, X. Y., & Xie, J. (2020). Growth kinetics and spoilage potential of co-culturing *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas fluorescens* from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during refrigerated storage. *Current Microbiology*, 77(8), 1637-1646. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01978-5>
- Zhang, X., Peng, Z., Li, P., Mao, Y., Shen, R., Tao, R., Diao, X., Liu, L., Zhao, Y., & Luo, X. (2020). Complex internal microstructure of feather follicles on chicken skin promotes the bacterial cross-contamination of carcasses during the slaughtering process. *Frontiers in Microbiology*, 11, 571913. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.571913>

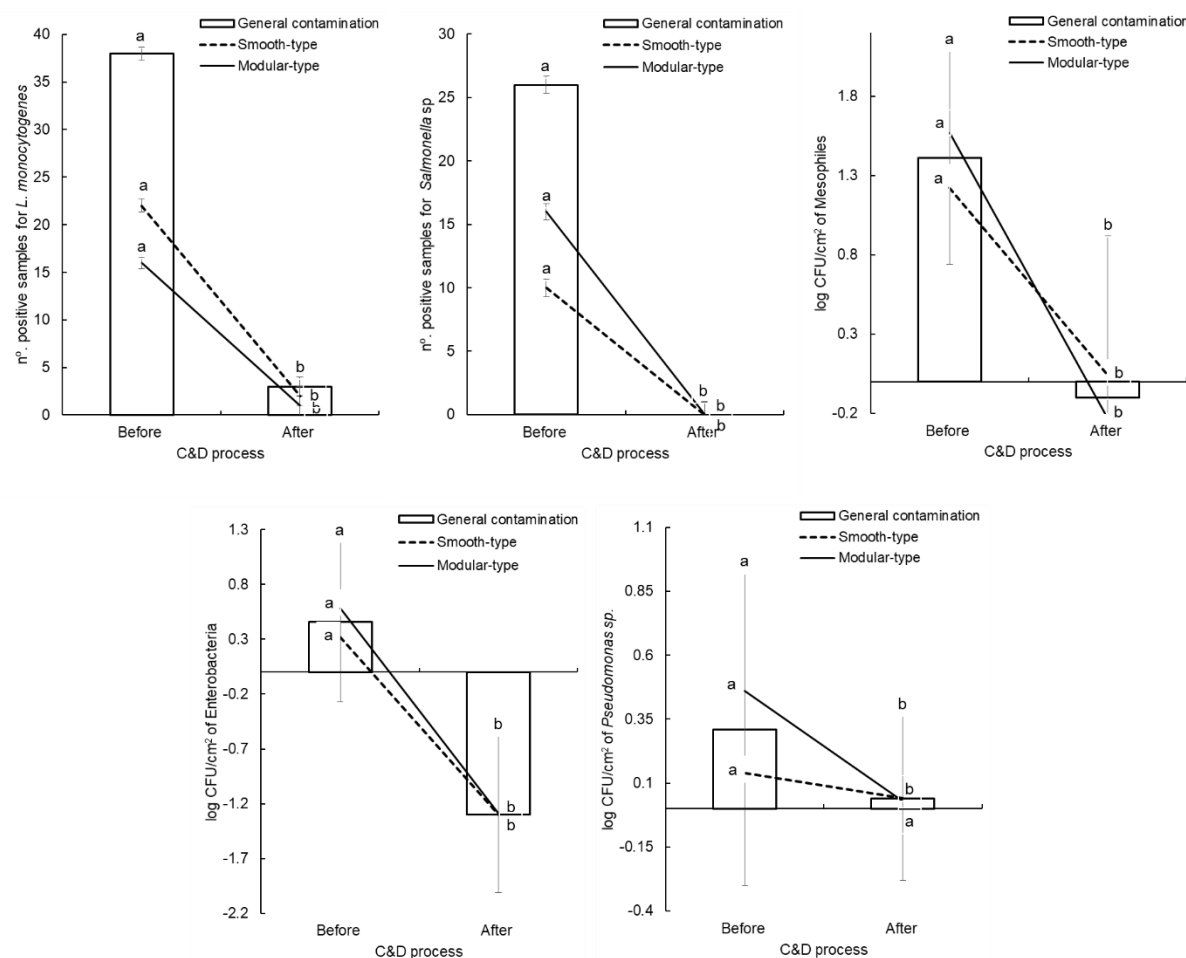


Figure 1: Comparison of overall contamination and type of surface for detection of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in 400 cm² and count for mesophilic aerobes, enterobacteria, and *Pseudomonas* spp. (log CFU cm²) before and after the pre-operational cleaning process. Distinct lowercase letters demonstrate statistical difference between phases ("Before" and "After" cleaning process) for the same group of samples ("General contamination" or "Smooth-type" or "Modular-type").

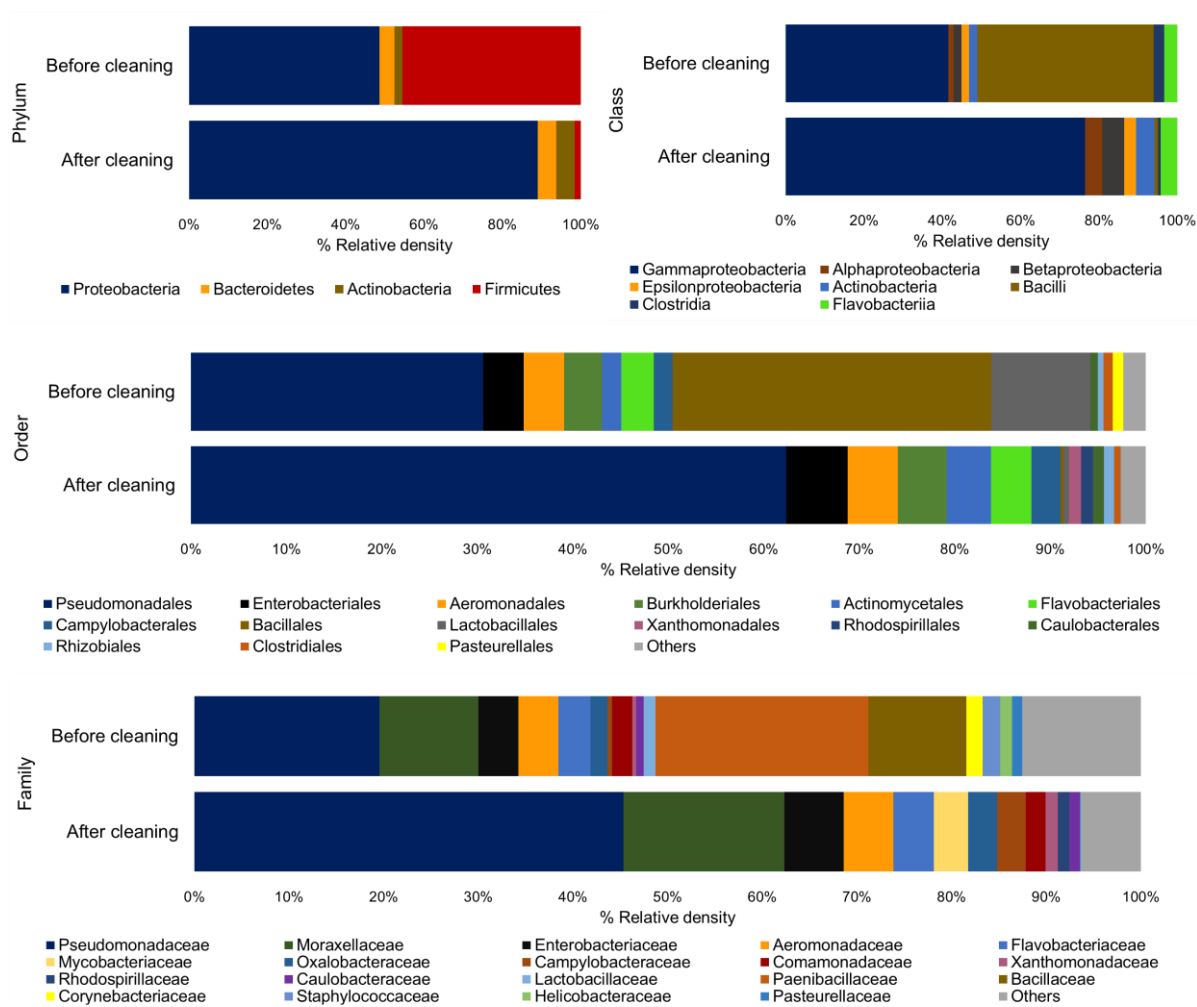


Figure 2: Bacterial phyla, classes, orders, and families identified before and after the pre-operational cleaning process. Only RD > 1% in at least one of the samples was included, the remaining taxa were identified as "Others." (For interpretation of color-coded references in this figure, the reader is referred to the online version of this article).

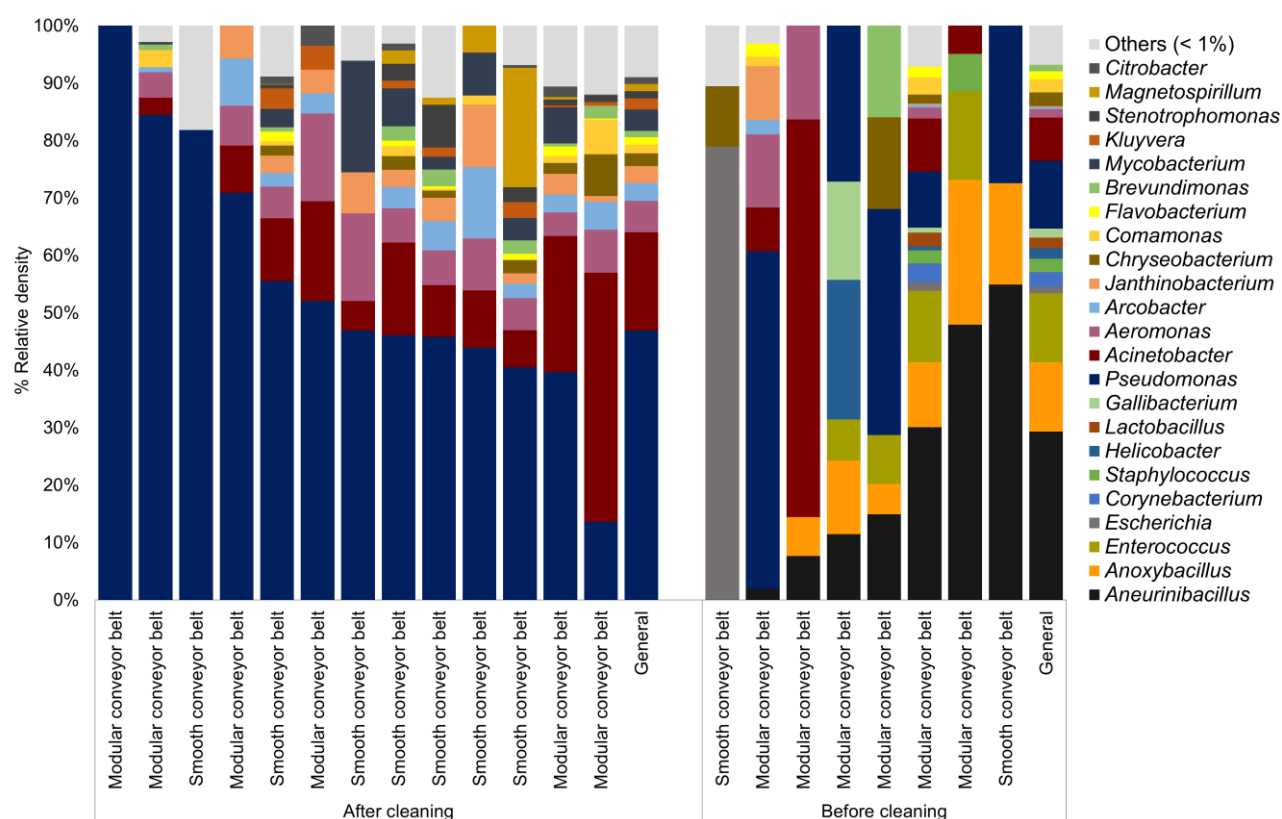


Figure 3: Bacterial genera identified before and after the pre-operational cleaning process. Only RD > 1% in at least one of the samples were included, the remaining genera were identified as “Others.” (For interpretation of color-coded references in this figure, the reader is referred to the online version of this article).

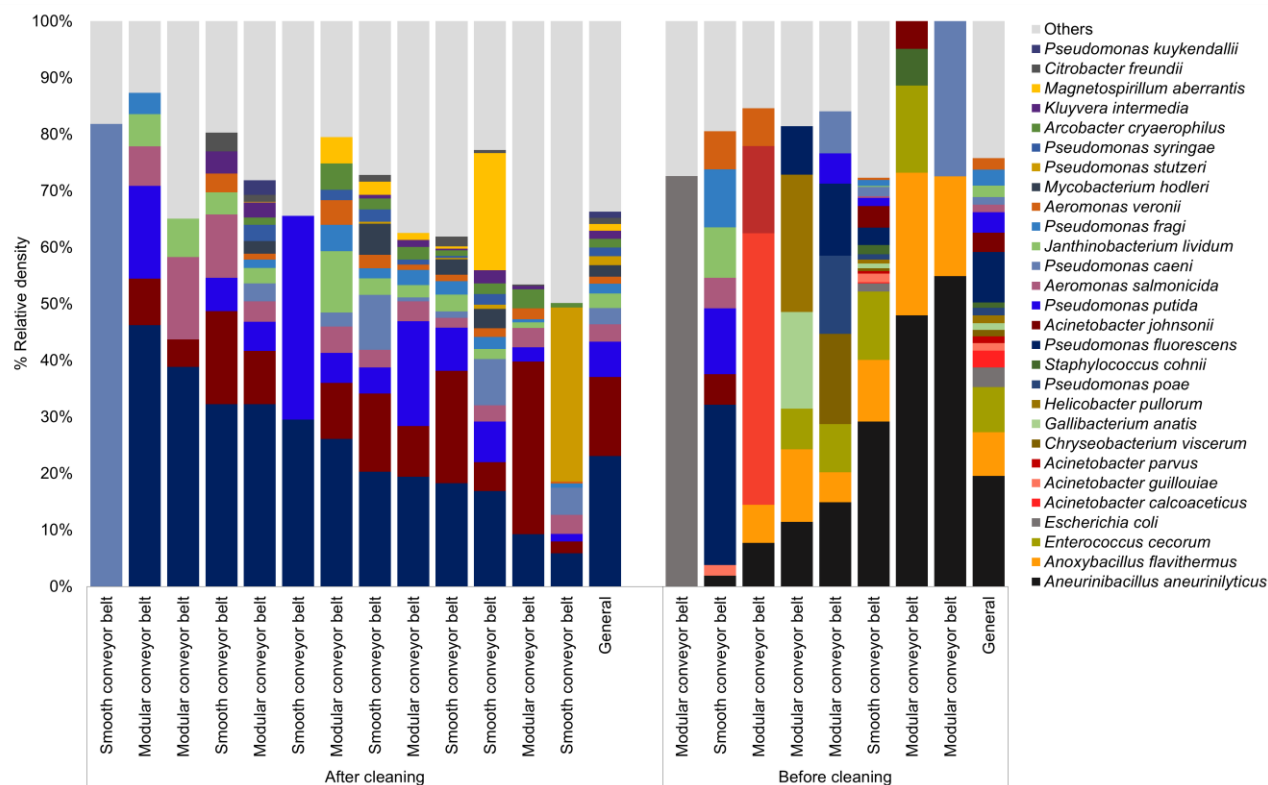


Figure 4: Bacterial species identified before and after the pre-operational cleaning process. Only DR > 1% in at least one of the samples were included, the remaining species were identified as “Others.” (For interpretation of color-coded references in this figure, the reader is referred to the online version of this article).

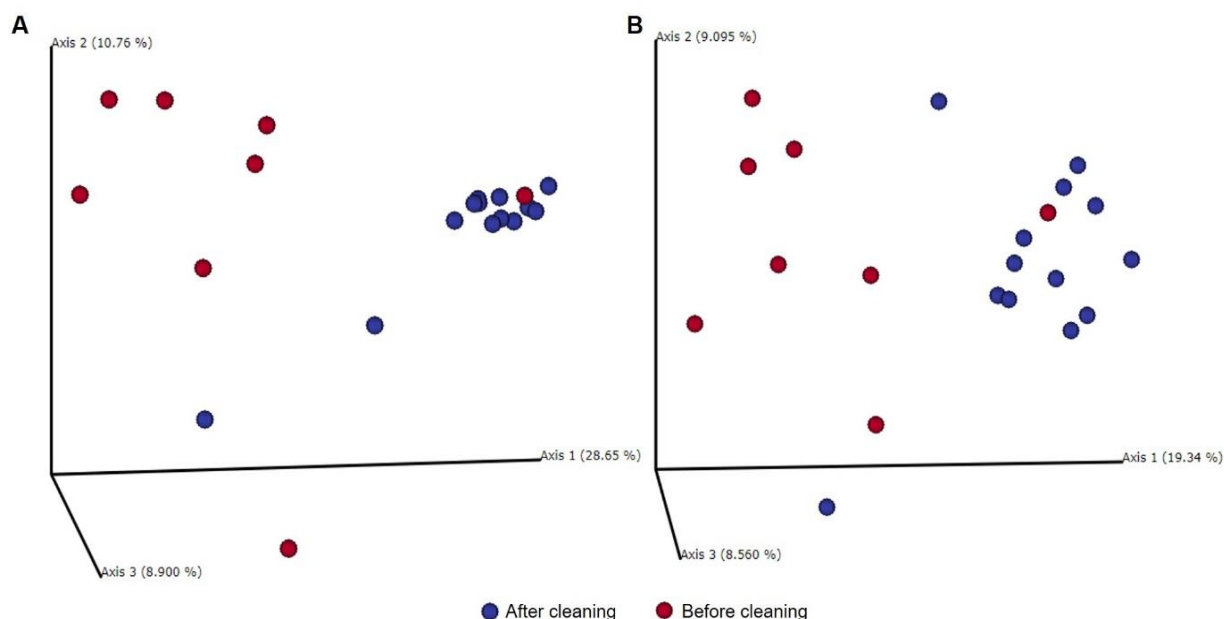


Figure 5: Principal coordinate analysis (PCoA) of bacterial communities on food conveyor belts based on the dissimilarity metric of the (A) Bray–Curtis and (B) Jaccard distance tests. (For interpretation of color-coded references in this figure, the reader is referred to the online version of this article).

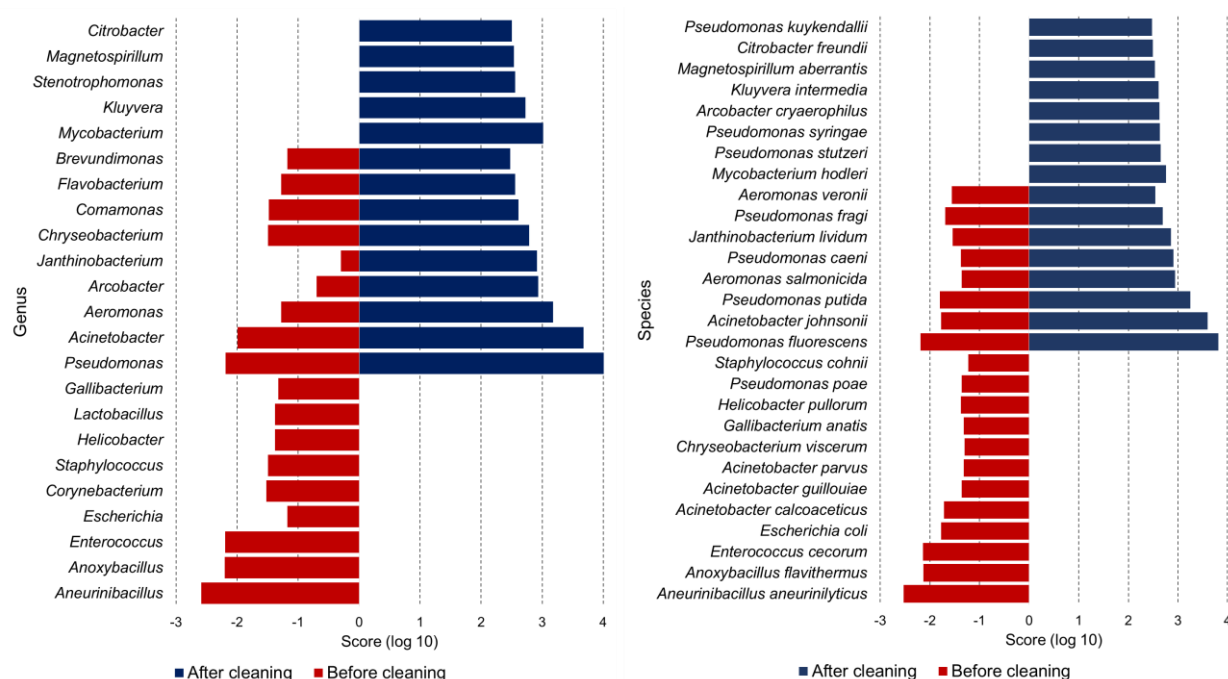
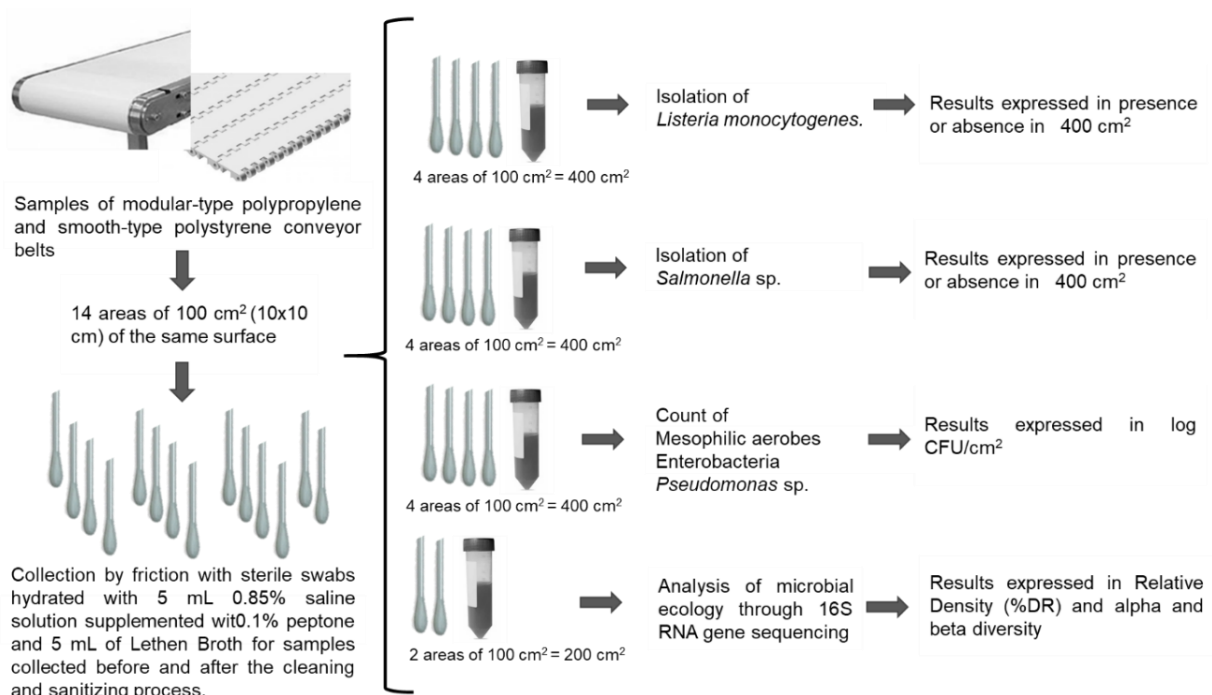


Figure 6: Distribution of bacterial genera and species described by percentage of OTUs with DR >1% (number of reads converted into log₁₀) before and after the pre-operational hygiene process in a poultry slaughterhouse (For interpretation of color-coded references in this figure, the reader is referred to the online version of this article).



787

788

789

Supplementary figure 1: Layout for sample collection from food conveyor belts for *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. isolation, indicator microorganism count, and microbial ecology characterization.

790 **Highlights**

- 791 - A contagem de microorganismos indicadores foi reduzida após o processo de
792 higienização.
- 793 - O processo de higienização foi capaz de eliminar *Salmonella* spp. das superfícies
- 794 - *Listeria monocytogenes* permaneceu em algumas superfícies após o processo de
795 higienização.
- 796 - *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus* e *Enterococcus* foram predominantes antes da
797 higienização.
- 798 - *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Aeromonas* foram predominantes após a
799 higienização.

CAPÍTULO 4

Trabalho será submetido para a revista *Food Microbiology*.

INSS Online: 1095-9998.

Trabaho está formatado de acordo normas da revista
(<https://www.elsevier.com/journals/food-microbiology/0740-0020/guide-for-authors>).

Efeitos inibitórios do Thymol, Carvacrol, Ácido Lático e Acético e nanopartículas de Prata e Óxido de Zinco na formação de biofilmes multiespécies de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante

Leonardo Ereno Tadielo^{a*}, Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos^a, Fábio Sossai Possebon^a, Evelyn Cristine da Silva^a, Patricia Regina Lopes Melo^a, Lara Bastos Juliano^a, João Pessoa Araujo Junior^a, Luciano dos Santos Bersot^b, Juliano Gonçalves Pereira^{a*}, José Paes de Almeida Nogueira Pinto^a

^a São Paulo State University (UNESP), Botucatu campus, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Distrito de Rubião Jr, SN, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^b Federal University of Paraná (UFPR), Palotina campus, Department of Veterinary Sciences, Rua Pioneiro, 2153, Jardim Dallas, 85950-000 Palotina, PR, Brazil.

*Corresponding authors

Leonardo Ereno Tadielo: leonardo.tadielo@unesp.br

José Paes de Almeida Nogueira Pinto: jose.paes@unesp.br

18 **Resumo**

19 Este estudo avaliou a dinâmica de formação de biofilmes em culturas puras e
20 multiespécies de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota
21 acompanhante em superfície de polipropileno; e a ação de Thymol e Carvacrol
22 (THY+CAR), nanopartículas de Prata e Óxido de Zinco (AgNPs+ZnONPs) e Ácido
23 Lático e Acético (AL+AA) na inibição da formação dos biofilmes multiespécies, por
24 meio da contagem das células viáveis, ecologia microbiana e arquitetura. A dinâmica
25 de formação de biofilmes puros e multiespécies apresentaram diferenças pontuais de
26 acordo aos tempos de avaliação, no entanto, todos os biofilmes demonstraram
27 contagens semelhantes após 216 h, indicando efeito sinérgico do consórcio
28 bacteriano em estabelecer biofilmes multiespécies. THY+CAR foram os compostos
29 que apresentaram maior inibição dos biofilmes multiespécies (redução de 99,77 a
30 99,9998%), seguido por AL+AA (39,34 a 99,993%) e AgNPs+ZnONPs (57,08 a
31 97,01%). Esses compostos também inibiram o desenvolvimento de *L. monocytogenes*
32 (83,89% a 99,9995%) e *Salmonella* spp. (91,36% a 99,9998%) nos biofilmes
33 multiespécies. A ecologia microbiana indicou que a família Yersiniaceae foi comum a
34 todas as condições de crescimento, Moraxellaceae foi mais abundante nos biofilmes
35 multiespécies sem tratamento e Pseudomonadaceae em THY+CAR,
36 AgNPs+ZnONPs e AL+AA. Em MEV, THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA afetaram
37 o desenvolvimento do biofilmes, reduzindo o número de células bacterianas e EPS
38 sob as superfícies. Nossos resultados sugerem que esses compostos podem ser
39 usados como coadjuvante do processo de higienização das indústrias de alimentos.

40

41 **Palavras-chave:** antibiofilme, ecologia microbiana, métodos de controle, superfície de
42 contato com alimentos.

43 1 Introdução

44 O processo de formação do biofilme depende da interação entre as células
45 microbianas, superfície de fixação e condições ambientais, formando aglomerados de
46 microrganismos envoltos por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) (Costerton et al.
47 1999, Garrett et al., 2008; Flemming et al., 2023). Essas estruturas conferem proteção,
48 adaptabilidade e tolerância dos microrganismos envolvidos nesta matriz aos métodos
49 de controle, tornando-se fontes de contaminação entre ambientes e produtos
50 (Flemming et al., 2023; Mazaheri et al., 2023). Portanto, são considerados constantes
51 ameaças para os programas de limpeza e sanitização das indústrias de alimentos.

52 As indústrias de alimentos possuem uma variedade de microrganismos
53 residentes em suas instalações, que são capazes de aderir a diferentes superfícies e
54 desenvolver biofilmes (Gu et al., 2019; Maes et al., 2019; De Filippis et al., 2021).
55 Espécies das famílias Pseudomonadaceae, Moraxellaceae e Enterobacteriaceae são
56 frequentemente associados a contaminação dos ambientes industriais e podem
57 promover abrigo para microrganismos patogênicos quando presentes nesses locais,
58 ao exemplo de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp (Hascoët et al., 2019;
59 Fagerlund et al. 2021; Cobo-Díaz et al., 2021; Cherifi et al., 2022). Em avaliações *in*
60 *vitro*, com culturas duplas, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* promoveram proteção em
61 suas estruturas para *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*,
62 aumentando a tolerância aos sanitizantes (Ripolles-Avila et al., 2022; Wilson et al.,
63 2022; Yang et al., 2023; Lim et al., 2023). Contudo, poucos trabalhos descrevem a
64 interação de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em desenvolver biofilmes
65 multiespécies com outros microrganismos sobreviventes aos processos de limpeza de
66 sanitização encontrados em superfícies de equipamentos e utensílios de indústrias de
67 alimentos, visando entender os mecanismos ecológicos de sobrevivência desses

68 microrganismos (Langsrud et al., 2015; Yang et al., 2023).

69 A estrutura física e organizacional dos biofilmes proporciona tolerância dos
70 microrganismos aos métodos de controle rotineiramente utilizados (Lee et al., 2017;
71 Flemming et al., 2023). Sendo assim, há constantes estudos com a finalidade de
72 elaborar e avaliar métodos alternativos para prevenir ou eliminar os biofilmes
73 bacterianos. Nanopartículas de Prata (AgNPs) e Óxido de Zinco (ZnONPs), princípios
74 de óleos essenciais, como Thymol (THY) e Carvacrol (CAR) e ácidos orgânicos, como
75 o ácido láctico (AL) e acético (AA) são bons inibidores da formação de biofilmes, devido
76 suas atividades antimicrobianas. Em células planctônicas, esses compostos atuam
77 alterando a permeabilidade celular, aumento do estresse oxidativo, alterações no
78 material genético e morte celular (Kumar et al. 2017; Zeng et al., 2018; Coban, 2020;
79 Wijesundara et al., 2021). Suas atividades antibiofilmes foram comprovadas em
80 cultivos mono e dupla espécies de *Pseudomonas* sp., *L. monocytogenes*, *Salmonella*
81 sp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli* apresentando resultados satisfatórios (Amrutha et
82 al., 2017; Guo et al., 2019; Ashrafudoulla et al., 2021; Kaur et al., 2021; Lange et al.
83 2021; Walczak et al., 2021). Entretanto, todos esses trabalhos concluem que são
84 necessárias mais avaliações para mensurar sua eficácia em biofilmes mais
85 complexos, como os multiespécies.

86 Este estudo teve como objetivo avaliar a dinâmica de formação de biofilmes de
87 culturas puras e multiespécies de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota
88 acompanhante em superfície de polipropileno e avaliar a ação de THY+CAR,
89 AgNPs+ZnONPs e AL+AA na inibição da formação dos biofilmes multiespécies, por
90 meio da contagem das células viáveis, ecologia microbiana e arquitetura.

91

92

93 2 Material e métodos

94 2.1 Isolados utilizados

95 Foram selecionados para o estudo isolados de *L. monocytogenes*, *Salmonella*
 96 spp. e microbiota acompanhante (Tabela 1). Todos esses microrganismos foram
 97 isolados de superfícies de equipamentos e utensílios após o processo de higienização
 98 pré-operacional de indústrias de processamento de cortes cárneos de aves, suínos e
 99 laticínio (Tadielo et al., 2023 – Trabalho a ser publicado). A capacidade de adesão e
 100 a presença de genes relacionados a formação de biofilme foi determinada em estudos
 101 prévios (Tadielo et al., 2023 – Trabalho a ser publicado). Os isolados permaneceram
 102 armazenados de forma congelada a -18 °C em *Tryptic Soy Broth* suplementado com
 103 0,6% de *Yeast Extract* (TSB- YE, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), contendo 20%
 104 (v/v) de glicerol até o momento dos ensaios.

105 Tabela 1: Isolados de *L. monocytogenes* (LM), *Salmonella* spp. (SAL) e microbiota acompanhante (MA)
 106 utilizados para avaliar a dinâmica de formação de biofilmes puros e multiespécies em superfície de
 107 polipropileno a 10 °C.

Grupos	Isolados	Família	Origem	Adesão	Genes de biofilme
LM	<i>L. monocytogenes</i> 1/2 ^a	Listeriaceae	Aves - Esteira de polipropileno tipo lisa	fraca	<i>prfA</i> , <i>flaA</i> , <i>agrA</i> <i>agrB</i> , <i>agrC</i> , <i>agrD</i> , <i>luxS</i>
	<i>L. monocytogenes</i> 1/2 ^a	Listeriaceae	Suínos - Superfície de corte	fraca	
	<i>L. monocytogenes</i> 1/2 ^a	Listeriaceae	Laticínio - Tanque para fabricação de queijo	fraca	
	<i>L. monocytogenes</i> 1/2 ^b	Listeriaceae	Suínos - Esteira de polipropileno tipo modular	fraca	
	<i>L. monocytogenes</i> 4b	Listeriaceae	Suínos - Misturador de carne	fraca	
SAL	<i>Salmonella</i> . Muenchen	Enterobacteriaceae	Laticínio - Superfície para maturação de queijos	fraca	<i>adrA</i> , <i>agfA</i> , <i>agfD</i> , <i>csgD</i> , <i>csgB</i> , <i>luxS</i> ,
	<i>Salmonella</i> spp.	Enterobacteriaceae	Laticínio - Equipamento para fabricação de queijo	fraca	
MA	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	Laticínio - Tanque para fabricação de queijo	fraca	<i>wcaA</i> , <i>wza</i> , <i>luxS</i>
	<i>Pantoea dispersa</i>	Enterobacteriaceae	Laticínio - Tanque para fabricação de queijo	fraca	-
	<i>Citrobacter freundii</i>	Enterobacteriaceae	Laticínio - Tanque para fabricação de queijo	fraca	-
	<i>Serratia fonticola</i>	Yersiniaceae	Aves - Esteira de polipropileno tipo lisa	fraca	-
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Enterobacteriaceae	Aves - Esteira de polipropileno tipo lisa	fraca	-
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Enterobacteriaceae	Laticínio - Superfície para maturação de queijos	fraca	-
	<i>Hafnia alvei</i>	Enterobacteriaceae	Aves - Esteira de polipropileno tipo modular	fraca	-
	<i>Serratia proteamaculans</i>	Yersiniaceae	Suínos - Esteira de polipropileno tipo modular	fraca	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	Laticínio - Tanque para fabricação de queijo	fraca	<i>lhrL</i> , <i>lasL</i> , <i>algD</i> , <i>wssH</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pseudomonadaceae	Aves - Esteira de polipropileno tipo modular	fraca	<i>adnA</i>
	<i>Pseudomonas koreensis</i>	Pseudomonadaceae	Aves - Esteira de polipropileno tipo modular	fraca	-
	<i>Pseudomonas composti</i>	Pseudomonadaceae	Aves - Esteira de polipropileno tipo lisa	fraca	-
	<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadaceae	Laticínio - Equipamento para fabricação de queijo	fraca	-
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Pseudomonadaceae	Laticínio - Formas de queijo	fraca	-
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Pseudomonadaceae	Suínos - Superfície de corte	fraca	-
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Moraxellaceae	Suínos - Superfície de corte	moderada	-

2.2 Dinâmica de formação de biofilmes puros e multiespécies de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante em cupons de polipropileno

Os isolados de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante (Tabela 1) foram avaliados para a dinâmica de formação de biofilmes puros e multiespécies em cupons de polipropileno por até 360 h a 10 °C. Sendo adotadas as seguintes condições de crescimento:

- (1) biofilmes puros de *L. monocytogenes*,
- (2) biofilmes puros de *Salmonella* spp.,
- (3) biofilmes puros compostos pela microbiota acompanhante e
- (4) biofilme multiespécies, composto por partes iguais de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante.

Previamente aos ensaios de adesão bacteriana os cupons (1 cm x 1 cm x 0,1 cm) de polipropileno foram lavados com álcool 70% p/p (70 °INPM), enxaguados três vezes em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Os isolados (Tabela 1) foram semeados individualmente em tubos com 5 mL em *Tryptic Soy Broth* suplementado com 0,6% de *Yeast Extract* e 1% de *Beef Extract* (TSB-YE-BE, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), incubados a 36±1 °C por 24 h. A partir do cultivo, 120 mL de TSB-YE-BE foram ajustados a 10⁵ UFC/mL das culturas para o estudo dos biofilmes puros. Para os biofilmes multiespécies, 40 mL de TSB-YE-BE foram ajustados para *L. monocytogenes*, 40 mL para *Salmonella* spp. e 40 mL para microbiota acompanhante, com seus conteúdos misturados compondo um volume final de 120 mL. Antes da incubação uma alíquota de 1 mL dos caldos ajustados de cada frasco foram utilizadas para a confirmação do inóculo inicial. Como controle negativo, um frasco com 120 mL de TSB-YE-BE sem inoculação foi incubado nas mesmas condições para avaliar a esterilidade do processo.

Os frascos foram incubados por até 360 h a 10 ± 1 °C sob agitação orbital a 100 rpm. As avaliações do crescimento séssil foram realizadas em 3, 24, 48, 72, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 e 360 h de incubação. A cada 48 h de incubação foram realizadas trocas do caldo para manter os níveis de nutrientes. Em cada tempo de avaliação foram retirados três cupons para a contagem dos microrganismos aderidos a superfície. Para realizar a remoção das células sésseis dos cupons, seguiu-se metodologia descrita por Reis-Teixeira et al. (2019) com modificações, os cupons foram lavados com 10 mL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), imersos em 1,0 mL de solução PBS suplementada com 1% de Polissorbato 80 e as células sésseis extraídas por meio de banho sonificador (40 KHz por 1,5 min, duas vezes) e vórtex (1,5 min, duas vezes). Para realizar a quantificação, foram realizadas diluições seriadas apropriadas e retiradas alíquotas de 10 µl para quantificação das células sésseis pela técnica de plaqueamento em gota (Herigstad et al., 2001). As alíquotas foram inoculadas em superfície de *Tryptic Soy Agar* suplementado com 0,6% de *Yeast Extract* (TSA-YE, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) para contagem da população total dos biofilmes, *Oxford Listeria Agar* (OXA, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) para *L. monocytogenes* e *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* (XLD, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) para *Salmonella* sp., as placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 24-48 h. O estudo foi realizado em três repetições para cada condição e os resultados expressos em log UFC/cm². Para avaliar se houve diferença nas médias das contagens entre os tratamentos foi realizado o teste ANOVA seguido do teste Tukey ($P < 0,05$) com auxílio do programa estatístico *Statistical Analysis Software* - SAS Institute (Cary, NC, US).

2.3 Obtenção e preparo das soluções de THY, CAR, AgNPs, ZnONPs, AL e AA

O THY e CAR e as AgNPs e ZnONPs foram adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA e o AL e AA foram adquiridos da Êxodo® Científica. As concentrações de trabalho foram preparadas previamente a cada repetição do estudo, mantidas a temperatura ambiente e livre de luz. Para evitar mudanças na concentração dos componentes foram utilizados os mesmos lotes durante todo o trabalho experimental. As soluções de THY e CAR foram individualmente solubilizadas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As soluções de AgNPs e ZnONPs foram preparadas individualmente em 3 mL de água destilada estéril e submetidas a sonificação por 2 e 40 min, respectivamente, antes da utilização. As soluções de AL e AA foram preparadas individualmente em 1 mL de água destilada estéril antes do uso.

2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) para *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota microbiana sob condição crescimento pura e multiespécies

A MIC foi determinada através do método de micro diluição em caldo baseado na *Clinical and Laboratory Standards Instituto* (CLSI, 2020) com modificações. Os isolados de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota microbiana em condições de crescimento pura e multiespécie foram ajustados na escala 0,5 de McFarland. Em placas de 96 poços, foram adicionados 100 µL de *Mueller-Hinton Broth* (MH, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) em todos os poços da placa. A seguir, 200 µL das concentrações de THY, CAR, THY+CAR; AgNPs, ZnONPs, AgNPs+ZnONPs; AL, AA e AL+AA foram inoculados separadamente na primeira linha de poços e realizadas diluições seriadas (1:2) para obter as seguintes concentrações:

183 - THY: 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,015 e 0,008 mg/mL.

184 - CAR: 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,015 e 0,008 mg/mL.

185 - THY+CAR: 2+2; 1+1; 0,5+0,5; 0,25+0,25; 0,125+0,125; 0,062+0,062;

186 0,031+0,031; 0,015+0,015 e 0,008+0,008 mg/mL.

187 - AgNPs: 16, 8; 4; 2; 1; 0,5, 0,25; 0,12; 0,06 e 0,03 mg/mL.

188 - ZnONPs: 40, 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,6; 0,3; 0,15 e 0,07 mg/mL.

189 - AgNPs+ZnONPs: 6+40, 8+20; 4+10; 2+5; 1+2,5; 0,5+1,25; 0,25+1,25;

190 0,12+0,6; 0,06+0,3; 0,03+0,07 mg/mL.

191 AL: 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 mg/mL.

192 AA: 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 mg/mL.

193 AL+AA: 16+16; 8+8; 4+4; 2+2; 1+1; 0,5+0,5; 0,25+0,25; 0,12+0,12; 0,06+0,06;

194 0,03+0,03 mg/mL.

195 Para complementar a diluição seriada, foi adicionado 80 µL de MH e 20 µL de

196 inóculo, obtendo uma concentração final de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL. As placas foram

197 incubadas a 36 ± 1 °C por 24 h sob agitação orbital de 120 rpm. A leitura da MIC foi

198 realizada de forma macroscópica avaliando a presença ou ausência do crescimento

199 bacteriano nos poços. A MIC foi considerada como a menor concentração do

200 interferente capaz de inibir o crescimento bacteriano visível (atividade bacteriostática).

201 Para a MBC, nos poços onde não ocorreram crescimento bacteriano visível, semeou-

202 se 1 µL, com auxílio do *Pin Replicator*, para placas de petri contendo *Mueller-Hinton*

203 *Agar* (MH, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) para avaliar o crescimento microbiano

204 total, *Oxford Listeria Agar* (OXA, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) para *L.*

205 *monocytogenes* e *Xilose Lisina Desoxicolato Agar* (XLD, Oxoid Ltd., Basingstoke,

206 Inglaterra) para *Salmonella* spp. tanto nas condições de crescimento pura ou

207 multiespécie, as placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 24-48 h. A MBC foi

considerada a menor concentração do interferente que resultou em inibição do crescimento bacteriano (atividade bactericida). O estudo foi realizado em duas repetições.

2.5 Avaliação da inibição da formação de biofilmes multiespécies sob ação de THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA

Os biofilmes multiespécies formados *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante (Tabela 1) foram submetidos a avaliação da inibição da sua formação perante ação de THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA em superfície de polipropileno por até 312 h a 10 °C. A partir do cultivo, 120 mL do caldo TSB-YE-BE foi ajustado a 10⁵ UFC/mL de forma individual para *L. monocytogenes* (40 mL), *Salmonella* spp. (40 mL) e microbiota acompanhante (40 mL). As concentrações de uso do THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA foram determinadas perante o MIC das condições de crescimento multiespécies (Tabela 2). Nestas condições foram preparados quatro frascos contendo a solução bacteriana, sendo:

- um frasco utilizado como controle positivo (Control)
- um frasco com adição de THY (1 mg/mL) + CAR (1 mg/mL)
- um frasco com adição de AgNPs (4 mg/mL) + ZnONPs (10 mg/mL)
- um frasco com adição de AL (0,12 mg/mL) + AA (0,12 mg/mL).

Como controle negativo, um frasco com 120 mL de TSB-YE-BE sem inoculação foi incubado nas mesmas condições para avaliar a esterilidade do processo.

As avaliações do crescimento séssil foram realizadas em 3, 24, 120, 216 e 312 h de incubação. Nos tempos de 24, 120 e 216 h foram realizadas trocas do caldo e interferentes com a finalidade de manter os nutrientes da solução e a concentração dos compostos estudados. Em cada tempo de avaliação foram retirados três cupons

para a contagem dos microrganismos aderidos a superfície. O processo de lavagem, remoção, contagem das células sésseis e expressão dos resultados foram realizados como descritos no item 2.2. O estudo foi realizado em três repetições para cada condição. Para avaliar se houve diferença nas médias das contagens entre os tratamentos foi realizado o teste ANOVA seguido do teste Tukey ($P < 0,05$) com auxílio do programa estatístico *Statistical Analysis Software - SAS Institute* (Cary, NC, US). Também, foi avaliado o percentual de redução logarítmica dos biofilmes com os interferentes em relação ao controle por meio da fórmula:

$$\% \text{ Erradicação do biofilme} = \frac{(\log_{10} \text{ UFC/cm}^2 \text{ (Controle)} - \log_{10} \text{ UFC/cm}^2 \text{ (Biofilme com interferente))}}{\log_{10} \text{ UFC/cm}^2 \text{ (Biofilme controle)}} \times 100$$

2.6 Avaliação da distribuição dos microrganismos nos biofilmes multiespécies com ação de THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA

Durante os mesmos momentos de avaliação dos biofilmes multiespécies descritos no item 2.5 foi avaliada a frequência relativa (FR) dos microrganismos por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram avaliadas amostras em triplicata em cada condição de crescimento (Control; THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA) nos diferentes tempos de formação (3, 24, 120, 216 e 312 h), totalizando 60 amostras. Após realização do protocolo de remoção das células sésseis descritos no item 2.2, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O DNA foi extraído por meio de *beads* magnéticas seguindo metodologia proposta por Possebon et al. (2022). A identificação foi realizada utilizando o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina Inc., USA), utilizando o kit V2 de 500 ciclos. O preparo

das bibliotecas foi realizado com a amplificação dos primers para região V3-V4 do gene 16S rRNA (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'; 5'-TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'; segundo Klindworth et al., 2013) conforme instruções fornecidas pelo protocolo de 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation proposto pela Illumina (Illumina Inc., USA).

As sequências foram analisadas com o programa QIIME2 (Bolyen et al., 2019). O software DEBLUR (Amir et al., 2017) foi utilizado para filtrar *reads* de baixas qualidades e classificar as leituras em *features* (OTUs). O MAFFT (Rozewicki, et al., 2019) foi utilizado para produzir um alinhamento e análise filogenética entre as *features*. As métricas de diversidade alfa e beta foram obtidas por diferentes métodos e inferências estatísticas foram realizadas de acordo com a opção *core metrics phylogenetic*, com análise de rarefação de alpha diversidade. O banco de dados SILVA (Quast et al., 2013) foi utilizado para classificação taxonômica das *features*. A análise de ANCOM (Mandal et al., 2015) foi utilizada para demonstrar diferenças estatísticas entre os táxons nos diferentes grupos.

274

2.7 Avaliação da arquitetura dos biofilmes por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Durante os mesmos momentos de formação dos biofilmes multiespécies descritos no item 2.5 realizou-se a avaliação da arquitetura dos biofilmes por meio da MEV. As imagens foram geradas sobre cupons de polipropileno (0,5 x 0,5 x 0,1 cm) com a presença dos biofilmes de acordo aos diferentes condições de crescimento:

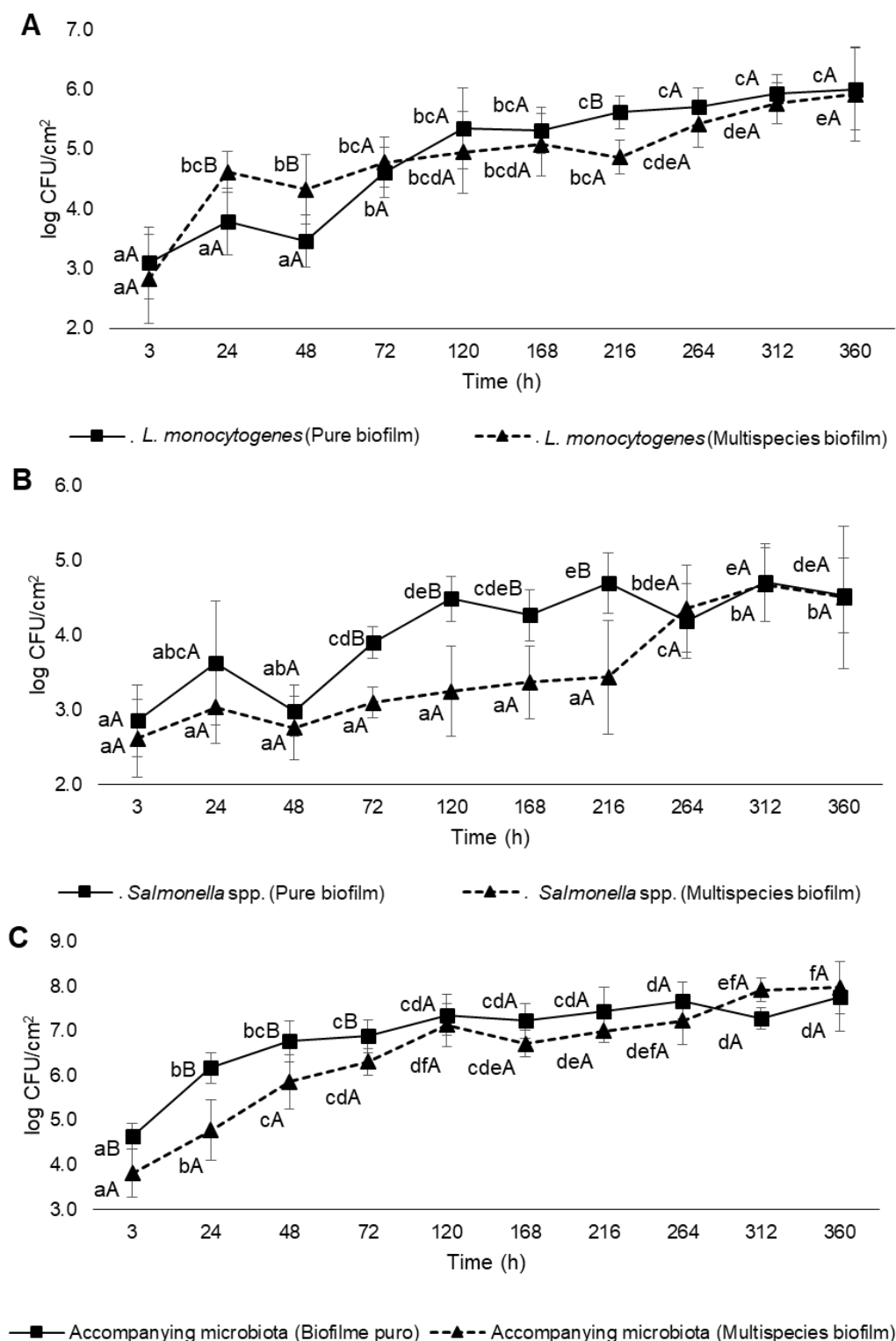
281 Control; THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA; e tempos de formação: 3, 24, 120,
282 216 e 312 h. Os biofilmes foram fixados com solução fixadora de Karnovsky
283 (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% e tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,2;
284 Karnovsky (1965)), seguida de desidratação seriada em álcool (10, 30, 50, 70, 80, 90
285 e 100%) por 20 minutos cada e visualizadas em Microscópio Eletrônico Quanta 200 -
286 FEI Company do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de
287 Botucatu, UNESP campus Botucatu.

288

289 **3 Resultados e discussões**

290 3.1 Dinâmica de formação de biofilmes puros e multiespécies de *L. monocytogenes*,
291 *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante

292 Na figura 1, observamos a dinâmica de formação de biofilmes de *L.*
293 *monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante em condições de
294 crescimento pura e multiespécies, em todas as condições os microrganismos
295 conseguiram aderir, formar e manter células viáveis em biofilmes por até 360 h a 10
296 °C. Avaliando as contagens de *L. monocytogenes* na condição pura podemos
297 observar variações entre 3,10 a 6,01 log UFC/cm², com contagens mais elevadas
298 entre 120-360 h (Figura 1A). Para *L. monocytogenes* em condição multiespécies,
299 observamos três grupos de crescimento de acordo ao tempo, o primeiro composto por
300 24-48 h, o segundo por 72-216 h e o terceiro por 264-360 h, este último tendo as
301 maiores contagens (Figura 1A). A condição multiespécies favoreceu a formação de
302 biofilme de *L. monocytogenes* em 24 h e 48 h, contudo, essa diferença não foi
303 observada para os demais tempos de incubação (Figura 1A).



304

305 Figura 1: Médias e desvio padrão (log UFC/cm²) da dinâmica da formação de biofilmes puros e
 306 multiespécies em diferentes tempos de contato para *L. monocytogenes* (A), *Salmonella* spp. (B) e
 307 microbiota acompanhante (C) em superfície de polipropileno a 10 °C. Letras minúscula diferentes na
 308 mesma linha indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$) fixado a condição de crescimento
 309 do microrganismo (Puro ou multiespécie). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam
 310 diferença estatística significativa ($P < 0,05$) fixado o tempo de contato para o mesmo microrganismo.

No biofilme puro de *Salmonella* spp. observamos dois grupos principais de acordo ao desenvolvimento e ao tempo de formação do biofilme, explicado por 3-48 h; 72 h--360 h (Figura 1B). Comportamento parecido foi observado para *Salmonella* spp. na condição multiespécies, não apresentando diferenças estatísticas entre os tempos de 3-216 h e 312-360 h (Figura 1B). A condição de crescimento multiespécies afetou o crescimento de *Salmonella* spp. nos tempos de 72-216 h (Figura 1B), porém essa diferença não foi observada após 264 h.

Para a microbiota acompanhante a condição de crescimento pura apresentou pouca variação, obtendo contagens equivalentes a partir de 48 h de formação (Figura 1C). Na condição multiespécies, foram observados três grupos explicados por 24 h; 48-216 h e 312-360 h (Figura 1C). A condição de crescimento multiespécies apresentou maior interferência nas contagens bacterianas comparado com a pura apenas entre 3-72 h (Figura 1C).

O consórcio bacteriano de biofilmes mistos já foi relatado em outros estudos e todos indicam que a condição de crescimento dupla ou multiespécies sofre variação de acordo a disponibilidade de superfícies para adesão e manutenção dos biofilmes, espécies de microrganismos envolvidas, competição bacteriana, nutrientes e tempos de formação (Grandi et al., 2018; Visvalingam et al., 2019; Iñiguez-Moreno et al., 2019; Tadielo et al., 2022; dos Santos et al., 2023). Em nosso estudo, apesar da condição de crescimento multiespécies promover diferenças pontuais nas contagens das populações estudadas em alguns tempos de formação, todos os biofilmes apresentaram contagens semelhantes em avaliações mais tardias (acima de 216 h) quando comparados com a condição pura, indicando a adaptação dos microrganismos envolvidos no consórcio bacteriano em promover a manutenção e consolidação dos biofilmes independentemente da condição de crescimento.

3.2 Determinação da MIC e MBC

Foram observadas ações distintas dos compostos de acordo ao uso e condição de crescimento dos microrganismos estudados (Tabela 2 e 3). A microbiota acompanhante e a condição multiespécies apresentaram as maiores MIC e MBC em relação a *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. para THY, CAR e THY+CAR. Por meio da MBC individual para cada microrganismo avaliado na condição multiespécies (Tabela 3), podemos afirmar que a MIC sofreu interferência da microbiota acompanhante, visto que as concentrações inibitórias para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. foram iguais para ambas as condições de crescimento. A associação dos compostos reduziu pela metade a concentração de uso, evidenciando ação sinérgica dos princípios ativos sobre as células dos microrganismos (Tabela 2 e 3).

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (MIC) de THY, CAR, AgNPs, ZnONPs, AL e AA em células de *L. monocytogenes* (LM), *Salmonella* spp. (SAL) e microbiota acompanhante (MA) em condição pura e multiespécies para os compostos individuais e em associação.

Tratamentos	Condição pura			Condição multiespécies
	LM	SAL	MA	
THY (mg/mL)	0,25	0,25	2	2
CAR (mg/mL)	0,5	0,5	2	2
THY+CAR (mg/mL)	0,125	0,125	1	1
AgNPs (mg/mL)	16	8	16	16
ZnONPs (mg/mL)	20	10	40	40
AgNPs+ZnONPs (mg/mL)	4 + 10	2 + 5	4 + 10	4 + 10
AL (%)	0,25	0,25	0,25	0,25
AA (%)	0,12	0,12	0,12	0,12
Al+AA (%)	0,06	0,06	0,12	0,12

As AgNPs e ZnONPs apresentaram MIC semelhantes para *L. monocytogenes*, microbiota acompanhante e condição multiespécies (Tabela 2 e 3). A ação conjunta desses compostos proporcionaram maior ação sobre os microrganismos quando comparado com a aplicação individual, devido a redução da concentração necessária para inibição bacteriana em todas as situações estudadas (Tabela 2 e 3). Para o AL e

AA, a aplicação individual não apresentou diferença de MIC e MBC para a condição de crescimento e os microrganismos estudados (Tabela 2). Contudo, a associação dos compostos proporcionou redução das concentrações de uso, especialmente para a MIC de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. Avaliando a população multiespécie, a microbiota acompanhante apresentou maior tolerância aos compostos quando comparado a *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração bactericida mínima (MBC) de THY, CAR, AgNPs, ZnONPs, AL e AA em células de *L. monocytogenes* (LM), *Salmonella* spp. (SAL) e microbiota acompanhante (MA) em condição pura e multiespécies para os compostos individuais e em associação.

Tratamentos	Condição pura			Condição multiespécies		
	LM	SAL	MA	LM	SAL	MA
THY (mg/mL)	0,5	0,5	2	0,5	0,5	2
CAR (mg/mL)	1	0,5	2	1	0,5	2
THY+CAR (mg/mL)	0,25	0,25	1	0,25	0,125	1
AgNPs (mg/mL)	16	16	16	16	16	16
ZnONPs (mg/mL)	40	20	40	40	10	40
AgNPs+ZnONPs (mg/mL)	8 + 20	4 + 10	8 + 10	8 + 20	4 + 10	8 + 20
AL (%)	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5
AA (%)	0,25	0,5	0,5	0,06	0,06	0,5
Al+AA (%)	0,12	0,12	0,25	0,12	0,12	0,25

3.3 Avaliação do THY+CAR, AgNPs+ZnONPs e AL+AA sobre a inibição da formação, ecologia microbiana e arquitetura dos biofilmes multiespécies

Os biofilmes multiespécies compostos por *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante apresentam capacidade de aderir e formar biofilme em superfície de polipropileno por até 312 h a 10 °C, com intervalos de contagem entre 4,88 e 7,69 log UFC/cm², apresentando em 312 h as maiores contagens (Figura 2A). A população de *L. monocytogenes* variou entre 3,40 a 5,24 log UFC/cm², sem diferença estatística entre os tempos de 120 h, 216 h e 312 h (Figura 2B). As contagens de *Salmonella* spp. variaram entre 3,23 a 4,55 log UFC/cm², com

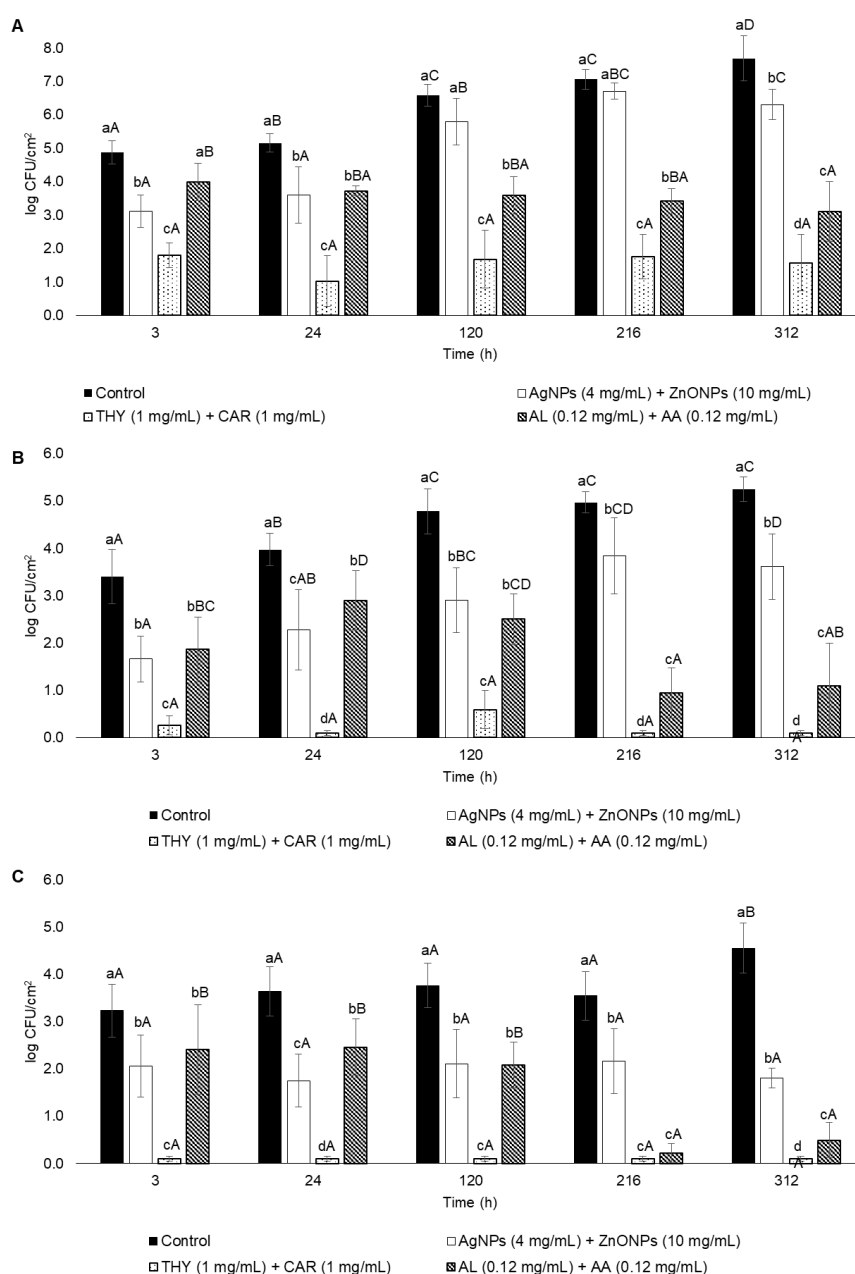
377 contagens mais elevadas em 312 h (Figura 2C).

378 Nos biofilmes multiespécies com interferência de THY+CAR, AgNPs+ZnONPs
379 e AL+AA foi observado ação distinta dos compostos de acordo aos diferentes tempos
380 de avaliação (Figura 2). De maneira geral, todos os compostos foram capazes de
381 reduzir as contagens totais dos biofilmes multiespécies quando comparados ao
382 controle, tendo melhor ação para THY+CAR (redução de 99,77 a 99,9998%), seguido
383 por AL+AA (redução de 39,34 a 99,993%) e AgNPs+ZnONPs (redução de 57,08 a
384 97,01%) (Figura 2A). De acordo ao tempo de formação, THY+CAR apresentou melhor
385 inibição da formação dos biofilmes independente dos tempos de avaliação, seguido
386 por AL+AA nos tempos de 24 h, 120 h, 216 h e 312 h (Figura 2A); ambos promoveram
387 reduções nas contagens dos biofilmes entre 1,5 a 5,5 ciclos logaritmos em relação ao
388 controle. Os compostos de AgNPs+ZnONPs apresentaram os melhores resultados
389 nos tempos de 3 h e 24 h, contudo reduzindo apenas 1 ciclo logaritmo (Figura 2A).

390 Todos os compostos reduziram a presença de *L. monocytogenes* nos biofilmes
391 multiespécies (Figura 2B). As contagens de *L. monocytogenes* nos biofilmes formados
392 com THY+CAR se mantiveram em baixos níveis em todos os tempos de avaliação,
393 promovendo reduções entre 99,956% a 99,9995%. A presença de AL+AA reduziu em
394 torno de 87,98% a 99,98% a presença de *L. monocytogenes* nos biofilmes
395 multiespécies nos diferentes tempos de formação, contudo, sua melhor ação foi
396 observada em 216 h e 312 h. As AgNPs+ZnONPs proporcionaram reduções entre
397 83,89% a 98,81%, com melhor ação em 3 h, 24 h e 120 h.

398 As contagens de *Salmonella* spp. no consórcio bacteriano de biofilmes
399 multiespécies foram afetadas em maior escala por THY+CAR em todos os tempos de
400 avaliação, ocasionando reduções entre 99,96% a 99,9998% (Figura 2C). A presença
401 de AL+AA reduziu as contagens de *Salmonella* spp. em todos os tempos de avaliação,

contudo, houve melhor ação em 216 h e 312 h, promovendo reduções de 99,9582% e 99,9938%, respectivamente (Figura 2C). As AgNPs+ZnONPs demonstraram ação equivalente independentemente dos tempos, com reduções variando entre 91,36% a 99,89% (Figura 2C).



406

Figura 2: Médias e desvio padrão (log UFC/cm²) da formação de biofilmes multiespécies em diferentes tempos de formação para população total (A), *L. monocytogenes* (B) e *Salmonella* spp. (C) com a interferência de THY+CAR e AL+AA, AgNPs+ZnONPs em superfície de polipropileno a 10 °C. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$) quando fixado o mesmo tempo de formação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$) quando fixado o mesmo tratamento.

A ecologia microbiana foi diferente entre os biofilmes multiespécies avaliados (Figura 3). A FR dos microrganismos avaliada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA em nosso estudo foi agrupada até o nível família. A família Yersiniaceae, compreendida em nosso estudo pelas espécies de *Serratia fonticola* e *Serratia proteamaculans*, foi presente em todos os tratamentos, com FR variando entre 13,9%-98,8% para os biofilmes controles, 1,9%-99,4% em AgNPs+ZnONPs, 4,5%-88,6% em THY+CAR e 3,6%-75,6% em AL+AA; em relação ao tempo de formação, suas maiores FR foram observadas em 120 h, 216 h e 312 h, independentemente dos tratamentos. Streptococcaceae foi presente independentemente dos tempos de avaliação nos biofilmes com AL+AA (11,6%-51,8%) e THY+CAR (19,3%-58,2%), contudo, em AgNPs+ZnONPs (34,1%-57,1%) e controle (5,3%-56,4%) obteve maior distribuição apenas em 3 h e 24 h.

Enterobacteriaceae, esteve presente nos biofilmes controles (0,8%-45,1%) e AL+AA (1,8%-35,2%), principalmente nas primeiras horas de formação (3 h e 24 h). Em nosso estudo essa família foi composta por isolados de *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pantoea dispersa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter hormaechei* e *Enterobacter cloacae*, portanto, por todos esses microrganismos se tratarem da mesma família não conseguimos realizar a distinção da FR de *Salmonella* spp. dos demais microrganismos. A família Moraxellaceae, representada em nosso estudo por *Acinetobacter johnsonii*, apresentou alta FR nos biofilmes controles (1,1%-42,3%) em 24 h, 120 h e 216 h, sendo considerada pela análise de ANCOM a mais abundante para esta condição de crescimento. A família Pseudomonadaceae apresentou maior FR nos biofilmes formados com AgNPs+ZnONPs (7,6%-16,5%), THY+CAR (2,3%-16,3%) e AL+AA (0,8%-16,3%), especialmente nos tempos de 3 h, 24 h e 120 h, sendo a família mais abundante para esses biofilmes pela análise de ANCOM. Desse modo,

destacamos a importância dos isolados de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. koreensis*, *P. composti*, *P. putida*, *P. mendocina*, *P. syringae* estudados em tolerar a ação desses compostos. Listeriaceae, compreendida em nosso estudo por isolados de *L. monocytogenes*, foi frequente nos biofilmes formados com AL+AA (0,7%-5,8%), AgNPs+ZnONPs (0,4%-3,4%) e THY+CAR (0,4%-3,1%) obtendo baixas FR independentemente do tempo de avaliação.

Ao avaliarmos a diversidade alfa nos diferentes biofilmes estudados, observamos diferença significativa dos biofilmes controles em relação a THY+CAR ($p=0,001$) e AL+AA ($p=0,003$) apenas para o teste de *Observed OTUs*. Essa análise leva em consideração a riqueza e a uniformidade dos microrganismos dentro da mesma amostra biológica, sendo a riqueza avaliada pelo número de espécies diferentes presentes em determinada comunidade e a uniformidade mensurada pelo tamanho da população dessas espécies (Kim et al., 2017; Daly et al., 2018), portanto, esses fatores foram distintos nesses tratamentos. Os biofilmes com THY+CAR e AL+AA apresentaram maior riqueza quando comparados aos controles, pois apresentaram maior número de famílias distintas, ao contrário do que foi observado nos biofilmes controles, que demonstraram maior uniformidade, pois foram observados altas FR em um pequeno grupo de famílias (Figura 3).

A diversidade beta possui a finalidade de avaliar a mudança da diversidade entre comunidades distintas, realizando a comparação de grupos de amostras diferentes com base nas abundâncias ou ocorrências das espécies (Iknayan et al., 2014). Em nosso estudo, avaliamos a métrica de *Unweighted Unifrac distance* que leva em consideração a distribuição da abundância dos microrganismos observados em cada condição de crescimento e a *Weighted Unifrac distance* que considera a presença ou ausência desses microrganismos. Ambas as análises indicaram que as populações

dos biofilmes controles diferiram estatisticamente das populações observados nos biofilmes com a presença de AgNPs+ZnONPs ($p=0,023$ e $p=0,033$), THY+CAR ($p=0,001$ e $p=0,001$) e AL+AA ($p=0,001$ e $p=0,001$), promovendo o agrupamento de suas amostras em posições distintas quando representados pela PCoA de acordo ao tratamento (Figura 4A e 4C) ou tempo de formação (Figura 4B e 4D). Também houve diferença entre a distribuição da abundância dos microrganismos quando realizamos a comparação entre os compostos estudados. As populações dos biofilmes com AgNPs+ZnONPs diferiram das encontradas em THY+CAR ($p=0,009$) e AL+AA ($p=0,034$) para o teste *Unweighted Unifrac distance* (Figura 4C e 4D). Porém, não foi demonstrada diferença da diversidade beta das populações descritas em THY+CAR e AL+AA ($p=0,141$ e $p=0,403$) realizando o agrupamento de suas amostras pela PCoA em um único grupo (Figura 4A-4D), com isso podemos indicar a ação similar desses dois compostos na redução dos biofilmes multiespécies.

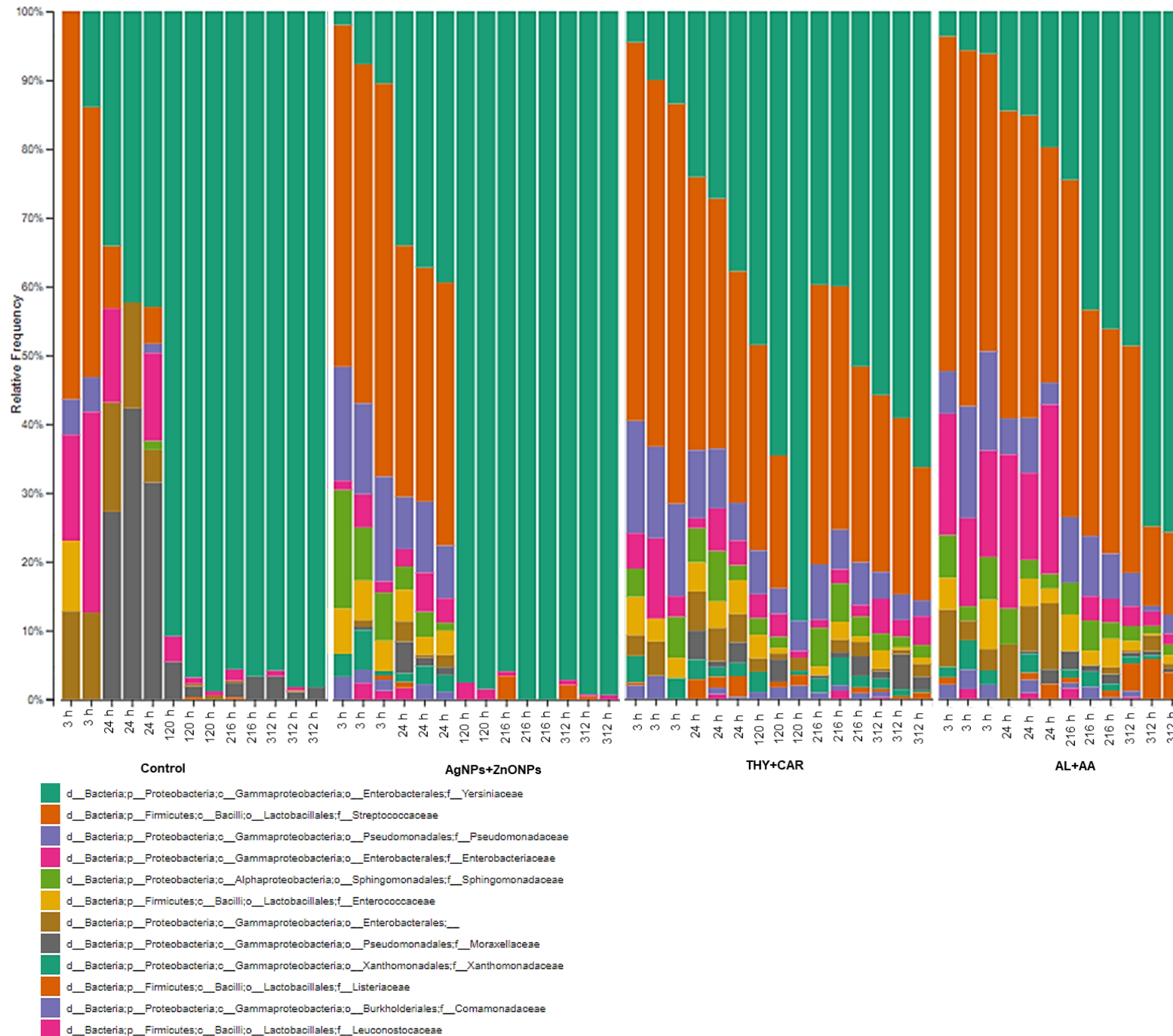


Figura 3: Frequência relativa (FR) de microrganismos em biofilmes multiespécies formados sobre superfície de polipropileno a 10 °C e com a presença de AgNPs+ZnONPs THY+CAR e AL+AA em diferentes tempos de formação (3, 24, 120, 216 e 312 h).

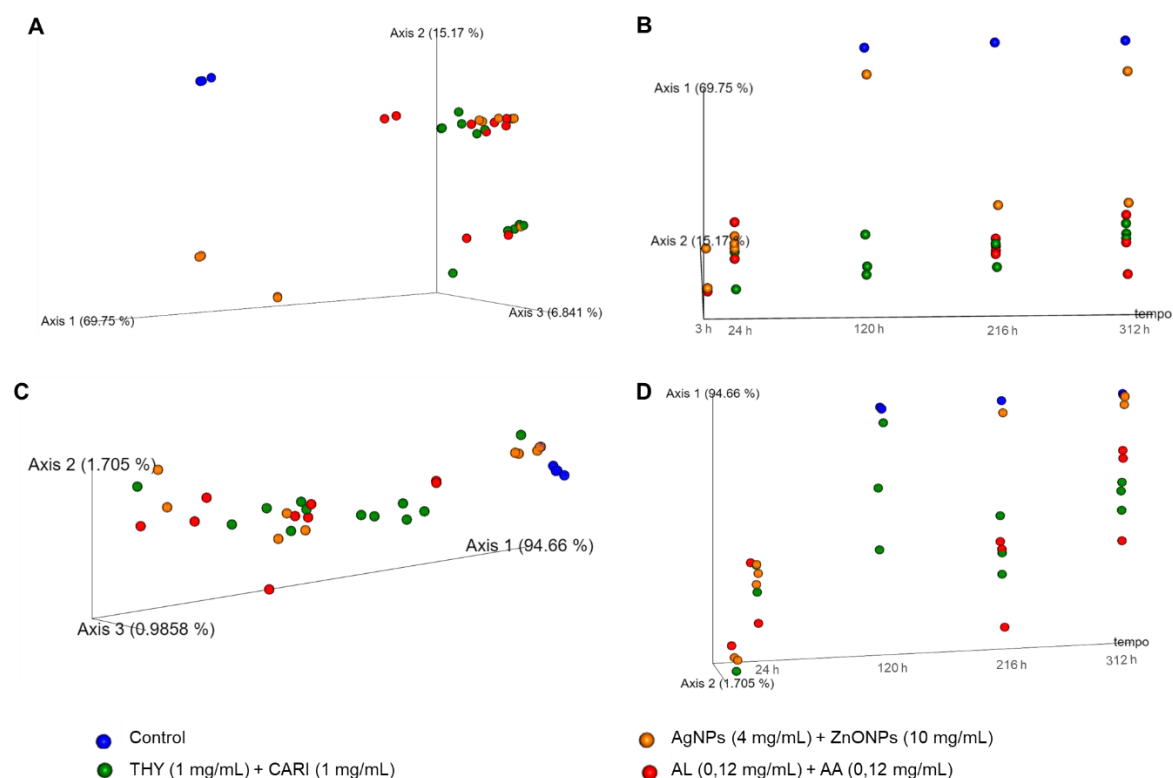


Figura 4: Análise das coordenadas principais (PCoA) baseado na métrica de *Unweighted Unifrac distance* (A e B) e *Weighted Unifrac distance* (C e D) em biofilmes multiespécies formados sobre superfície de polipropileno a 10 °C (azul) e com a presença de AgNPs+ZnONPs (amarelo), THY+CAR (verde) e AL+AA (vermelho).

Em MEV foi possível observar o consórcio bacteriano formando os biofilmes multiespécies (Figura 5). As figuras 6A-6E retratam os biofilmes controles, foi observado a presença de células e aglomerados bacterianos promovendo a adesão inicial em 3 h e 24 h (Figura 5A e 5B), após 120 h houve maior número de células bacterianas recobrindo as superfícies avaliadas, indicando a consolidação dos biofilmes microbianos (Figura 5C, 5D e 5E). A partir de 24 h, houve deposição de EPS sobre as superfícies de polipropileno e especialmente após 120 h de formação observou-se a presença de EPS recobrindo e englobando células bacterianas, possivelmente indícios da maturação do biofilme (Figura 5B, 5C, 5D e 5E).

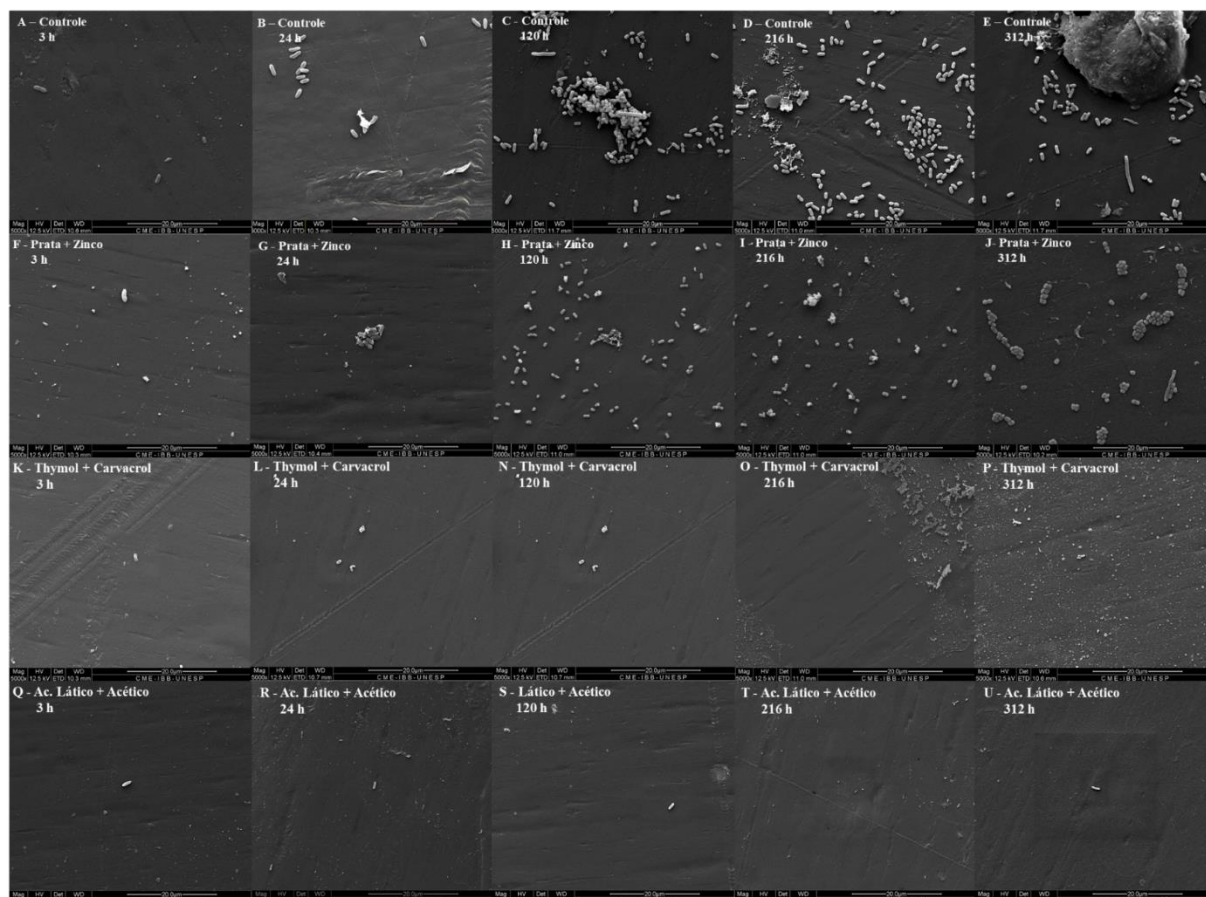


Figura 5: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em diferentes tempos de contato de biofilmes multiespécies formados sobre superfície de polipropileno a 10 °C (A-E) e com a presença de AgNPs+ZnONPs (F-J), THY+CAR (K-P) e AL+AA (Q-U).

Os biofilmes formados com a presença de AgNPs+ZnONPs visualizados em MEV apresentaram menor número de células bacterianas e EPS em relação ao controle (Figura 5F-5J). Após 120 h, foi verificado o agrupamento de células bacterianas em forma de filamentos sobre as superfícies avaliadas (Figura 5H, 5I e 5J). Também foi possível observar aglomerados de nanopartículas sobre as superfícies de polipropileno, esse fato pode promover melhor contato das nanopartículas sobre a superfície das células bacterianas (Figura 6). Nos biofilmes formados com THY+CAR (Figura 5K-5P) e AL+AA (Figura 5Q-5U) foi observado baixo número de células bacterianas e ausência de matriz de EPS sobre as superfícies de polipropileno, independentemente do tempo de avaliação. Nessas condições de

crescimento também foi identificado alterações na morfologia das células bacterianas em alguns tempos de avaliação, provavelmente relacionada a ação dos compostos de THY+CAR (24 h e 312 h) e AL+AA (120 h e 216 h) sobre a membrana celular dos microrganismos (Figura 7). Após 216 h, houve deposição de material residual sobre a superfícies de polipropileno nos tratamentos com THY+CAR, impossibilitando o crescimento dos microrganismos (Figura 5O e 5P).

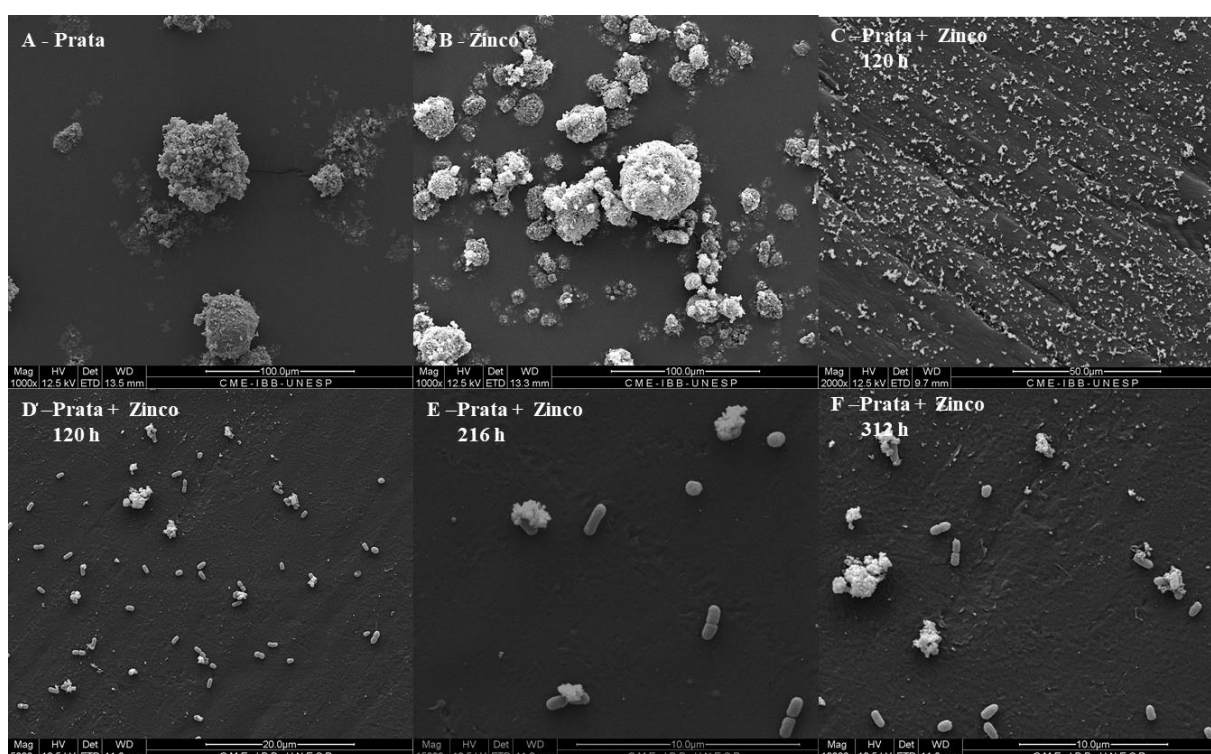


Figura 6: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de AgNPs (A) e ZnONPs (B) e de biofilmes multiespécies formados sobre superfície de polipropileno a 10 °C com a presença de AgNPs+ZnONPs (C, D e F).

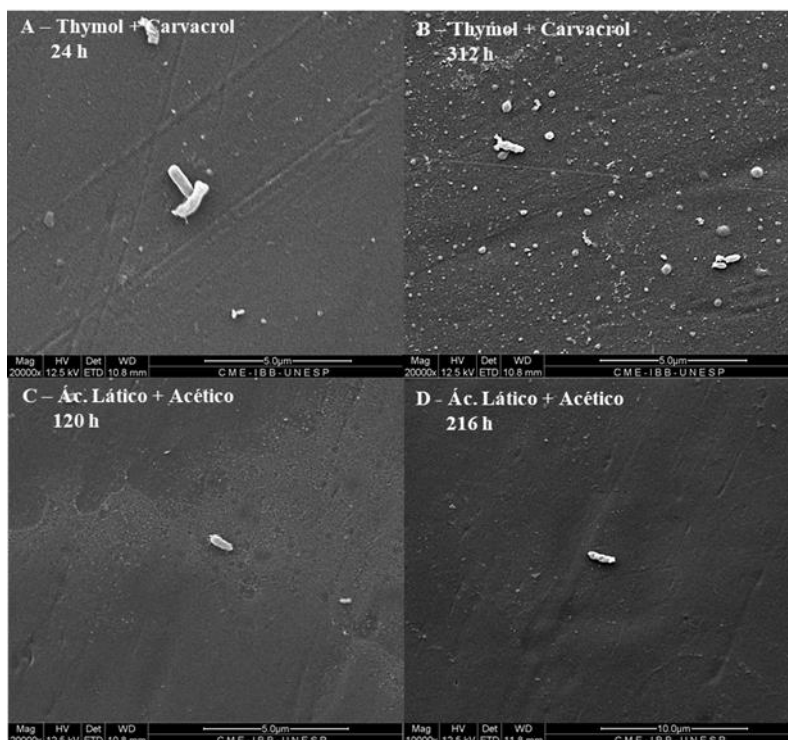


Figura 7: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes multiespécies formados sobre superfície de polipropileno a 10 °C com a presença de THY+CAR (A e B) e AL+AA (C e D).

Nossos resultados sugerem efetiva ação dos compostos de THY+CAR, AL+AA e AgNPs+ZnONPs na inibição ou redução da formação dos biofilmes multiespécies compostos por *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante. Os compostos de THY e CAR possuem atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e leveduras, bem como, exibem efeito antibiofilme para diferentes patógenos de origem alimentar (Miladi et al., 2017; Souza et al., 2022). Esses compostos exercem atividade antimicrobiana pois causam danos na integridade da membrana celular, por meio de sua natureza hidrofóbica interagem com a bicamada lipídica da membrana citoplasmática bacteriana, desestabilizando sua estrutura, fluidez e permeabilidade, provocando o extravasamento do conteúdo citoplasmático (Wijesundara et al., 2021). Ashrafudoulla et al. (2021) identificaram redução de 5,04 e 3,81 log UFC nas contagens em biofilmes de *Pseudomonas* sp. e *L. monocytogenes*, respectivamente, após a utilização de CAR em concentrações semelhantes as utilizadas em nosso

estudo, as avaliações de MEV mostraram perdas nas conexões entre as células, redução na densidade e estrutura dos biofilmes e alteração na morfologia celular. Walczak et al. (2021), descreveram que houve inibição da formação de biofilmes de *P. aeruginosa* e *S. aureus* após 10 dias de contato com THY e CAR em superfícies de cloreto de polivinila, polipropileno, polietileno e aço inoxidável, as avaliações de viabilidade celular mostraram baixo número de células viáveis após três dias de formação e grande quantidade de material extracelular, bem como, presença residual dos compostos sobre as superfícies, fato este impossibilitando o crescimento de novos grupos de células bacterianas. Esses achados corroboram com nossos resultados, visto que as contagens totais dos biofilmes se mantiveram em baixos níveis em todos os tempos avaliados (Figura 2) e em avaliações de MEV foi possível identificar alterações na morfologia das células bacterianas (Figura 7) e efeito residual dos compostos sobre as superfícies após 216 h (Figura 5), estes compostos também afetaram a FR dos microrganismos e diversidade alfa e beta dos biofilmes estudados (Figura 3 e 4).

Os ácidos orgânicos atuam promovendo alterações químicas externas e mudanças no pH que alteram a membrana celular e sua permeabilidade, causando a liberação de metabólitos internos e morte celular (Coban, 2020). Além disso, provocam alterações na síntese de proteínas, fosfolípidos e DNA das células bacterianas. Em biofilmes mistos o uso desses compostos afetaram a comunicação celular, inibindo a expressão da molécula autoindutora-2 (AI-2), dificultando a capacidade de detecção de *quorum sensing* de bactérias patogênicas (Almasoud et al., 2016). Os AL e AA provocaram efeitos inibitórios na motilidade e formação do biofilme, redução da produção de EPS e desregulação dos mecanismos de *quorum sensing* de *Salmonella* spp. e *E. coli* (Amrutha et al., 2017). O uso do AL+AA nos

556 biofilmes multiespécies em nosso estudo demonstrou redução de 39,34% a 99,993%
557 da população total e redução da população de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp,
558 principalmente nos tempos de 216 h e 312 h de avaliação (Figura 2). Esses resultados
559 evidenciam que o uso prolongado e consecutivo de AL+AA nos biofilmes
560 multiespécies podem apresentar melhores resultados, visto que a ação desses
561 compostos foi mais efetiva após 216 h de formação, possivelmente devido aos efeitos
562 nos mecanismos de desregulação da comunicação celular.

563 Apesar de uma ação reduzida as AgNPs e ZnONPs também apresentam
564 atividade antibiofilme em nosso estudo. O mecanismo de ação das AgNPs ocorre
565 devido ao acúmulo dos compostos na superfície da parede bacteriana, promovendo
566 a penetração na célula e alterando a permeabilidade celular (Zeng et al., 2018). As
567 ZnONP também atuam pelo contato com a superfície celular dos microrganismos,
568 desencadeando o aumento do estresse oxidativo, fator este que promove danos as
569 membranas celulares, DNA e mitocôndrias, acarretando em morte celular (Kumar et
570 al. 2017). Lange et al. (2021), apresentaram reduções significativas no uso de AgNPs
571 em biofilmes formados por *Salmonella* spp., *E. coli*, *Enterobacter cloacae* e *S. aureus*
572 em concentrações de uso semelhantes ao nosso estudo. Fontecha-Umaña et al.
573 (2020) avaliaram a ação de AgNPs e ZnONPs em superfície de poliéster e seus
574 resultados mostraram que os compostos reduziram a adesão bacteriana e formação
575 de biofilme de *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, foi evidenciado aumento na
576 eficácia quando utilizados em associação devido a ação sinérgica. A ação das
577 nanopartículas sofre influência da concentração de uso e tempo de contato, Guo et
578 al. (2019) e Kaur et al. (2021) demonstraram que AgNPs e ZnONPs possuíam
579 atividade antibiofilme contra *E. coli* e *P. aeruginosa* em superfícies de vidro, plástico
580 e alumínio. Em nosso estudo, podemos observar maior redução da formação dos

biofilmes multiespécies quando submetidos a ação sinérgica de AgNPs+ZnONPs principalmente nas etapas iniciais de formação do biofilme (3 h e 24 h). Apesar de realizarmos a troca dos caldos e interferentes a cada 72 h, com a finalidade de manter os nutrientes e as concentrações adequadas dos compostos, acreditamos que em biofilmes robustos (acima de 120 h) os compostos apresentaram redução da sua ação devido ao aumento da biomassa do biofilme ou pelo efeito de proteção da camada superior dos biofilmes para beneficiar as camadas inferiores diminuindo o contato dos interferentes com a superfícies bacterianas, resultados semelhantes foram encontrados por Thuptimdang et al. (2015) e Barker et al. (2018), assim o estágio de maturação dos biofilmes deve ser considerado para o uso das AgNPs+ZnONPs.

5 Conclusões

Nossos resultados demonstraram que a condição de crescimento multiespécies não afetou as populações individuais dos microrganismos estudados, ocorrendo efeito sinérgico desses microrganismos em manter biofilmes multiespécies por longos tempos de formação. Os compostos de THY+CAR, AL+AA e AgNPs+ZnONPs proporcionam redução das contagens totais, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. dos biofilmes multiespécies e alteram a FR, a diversidade alfa e beta e a arquitetura desses biofilmes, sugerindo que esses compostos podem ser usados como coadjuvante do processo de higienização das indústrias de alimentos. No entanto, faz-se necessário a realização de estudos complementares para avaliar a melhor forma de aplicação desses compostos nesses ambientes industriais.

Declaração de contribuição de autoria CRediT

Leonardo Ereno Tadielo: Conceituação, Investigação, Metodologia, Redação –

rascunho original, Redação – revisão e edição. Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos: Metodologia, Investigação, Redação – revisão e edição. Fábio Sossai Possebon: Metodologia, Investigação, Redação – revisão e edição. Evelyn Cristine da Silva: Metodologia, Investigação, Redação – revisão e edição. Patricia Regina Lopes Melo: Metodologia, Investigação, Redação – revisão e edição. Lara Cristina Bastos Juliano: Metodologia, Redação – revisão e edição. João Pessoa Araujo Junior: Metodologia, Redação – revisão e edição. Luciano dos Santos Bersot: Conceituação, Investigação, Metodologia, Supervisão, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. Juliano Gonçalves Pereira: Conceituação, Investigação, Metodologia, Supervisão, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. José Paes de Almeida Nogueira Pinto: Conceituação, Investigação, Metodologia, Supervisão, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil (bolsa de doutorado para Leonardo Ereno Tadielo) por meio do Processo FAPESP nº 2020/01529-9, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brasil). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brasil), Projeto CAPES-PRINT AUXPE 88881.310254/2018-01,

630 **Referências**

- 631 Almasoud, A., Hettiarachchy, N., Rayaprolu, S., Babu, D., Kwon, Y. M., & Mauromoustakos, A. (2016).
 632 Inhibitory effects of lactic and malic organic acids on autoinducer type 2 (AI-2) quorum sensing of
 633 *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium. *LWT*, 66, 560-564.
 634 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.013>
- 635 Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Zech Xu, Z., & Knight, R.
 636 (2017). Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *MSystems*, 2(2),
 637 e00191-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00191-16>
- 638 Amrutha, B., Sundar, K., & Shetty, P. H. (2017). Effect of organic acids on biofilm formation and quorum
 639 signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microbial Pathogenesis*, 111, 156-162.
 640 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.042>
- 641 Ashrafudoulla, M., Mizan, M. F. R., Park, S. H., & Ha, S. D. (2021). Antibiofilm activity of carvacrol
 642 against *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on MBEC™ biofilm device
 643 and polypropylene surface. *LWT*, 147, 111575. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111575>
- 644 Barker, L. K., Giska, J. R., Radniecki, T. S., & Semprini, L. (2018). Effects of short-and long-term
 645 exposure of silver nanoparticles and silver ions to *Nitrosomonas europaea* biofilms and planktonic
 646 cells. *Chemosphere*, 206, 606-614. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.017>
- 647 Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H.,
 648 Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn,
 649 C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., Da Silva,
 650 R., Diener, C., Dorrestein, P. C., Douglas, G. M., Durall, D. M., Duvallet, C., Edwardson, C., Ernst,
 651 M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J. M., Gibbons, S. M., Gibson, D. L., Gonzalez, A., Gorlick,
 652 K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S. Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G. A., Janssen, S.,
 653 Jarmusch, A. K., Jiang, L., Kaehler, B. D., Kang, K. B., Keefe, C. R., Keim, P., Kelley, S., T.,
 654 Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M. G. I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.,
 655 Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B. D., McDonald, D., McIver, L. J.,
 656 Melnik, A. V., Metcalf, J. L., Morgan, S. C., Morton, J. T., Naimey, A. T., Navas-Molina, J. A.,
 657 Nothias, L. F., Orchanian, S. B., Pearson, T., Peoples, S. L., Petras, D., Preuss, M. L., Priesse,
 658 E., Rasmussen, L. B., Rivers, A., Robeson, M. S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer,
 659 A., Sinha, R., Song, S. J., Spear, J. R., Swofford, A. D., Thompson, L. R., Torres, P. J., Trinh,
 660 P., Tripathi, A., Turnbaugh, P. J., Ul-Hasan, S., Hooft, J. J. J. V., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y.,
 661 Vogtmann, E., Hoppel, M. V., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K. C.,
 662 Williamson, C. H. D., Willis, A. D., Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., &
 663 Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data
 664 science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- 665
- 666 Cherifi, T., Arsenault, J., Quessy, S., & Fravalo, P. (2022). Co-Occurrence of *L. monocytogenes* with
 667 Other Bacterial Genera and Bacterial Diversity on Cleaned Conveyor Surfaces in a Swine
 668 Slaughterhouse. *Microorganisms*, 10(3), 613. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030613>
- 669 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods For 1821 Dilution Antimicrobial
 670 Susceptibility Tests For Bacteria That Grow Aerobically; 1822 Approved Standard-Sixth Edition.
 671 CLSI document M07-A6. NCCLS document M7-A6 1823 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940
 672 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, 1824 Pennsylvania 19087-1898 USA, 2020.
- 673 Coban, H. B. (2020). Organic acids as antimicrobial food agents: Applications and microbial productions.
 674 *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(4), 569-591. 569-591
 675 <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>
- 676 Cobo-Díaz, J. F., Alvarez-Molina, A., Alexa, E. A., Walsh, C. J., Mencía-Ares, O., Puente-Gómez, P.,
 677 Prieto, B., Crispie, F., Ruiz, L., González-Raurich, M., López, M., Prieto, M., Cotter, P., & Alvarez-
 678 Ordóñez, A. (2021). Microbial colonization and resistome dynamics in food processing
 679 environments of a newly opened pork cutting industry during 1.5 years of activity. *Microbiome*,
 680 9(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01131-9>
- 681 Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(3-4),
 682 217-239. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(99)00018-7)
- 683 Daly, A. J., Baetens, J. M., & De Baets, B. (2018). Ecological diversity: measuring the unmeasurable.
 684 *Mathematics*, 6(7), 119. <https://doi.org/10.3390/math6070119>
- 685 De Filippis, F., Valentino, V., Alvarez-Ordóñez, A., Cotter, P. D., & Ercolini, D. (2021). Environmental
 686 microbiome mapping as a strategy to improve quality and safety in the food industry. *Current*

- Opinion in Food Science, 38, 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.11.012>
- Grandi, A. Z., Pinto, U. M., & Destro, M. T. (2018). Dual-species biofilm of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* on stainless steel surface. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 34, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2445-4>
- dos Santos, E. A. R., Tadielo, L. E., Schmiedt, J. A., Orisio, P. H. S., Brugeff, E. D. C. L., Possebom, F. S., & dos Santos Bersot, L. (2023). Inhibitory effects of piperine and black pepper essential oil on multispecies biofilm formation by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Pseudomonas aeruginosa*. LWT, 114851. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114851>
- Fagerlund, A., Møretrø, T., Heir, E., Briandet, R., & Langsrud, S. (2017). Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. Applied and Environmental Microbiology, 83(17), e01046-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01046-17.24>
- Flemming, H. C., van Hullebusch, E. D., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., Stoodley, P., & Wuerzt, S. (2023). The biofilm matrix: Multitasking in a shared space. Nature Reviews Microbiology, 21(2), 70-86. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00791-0>
- Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A. G., Ripolles-Avila, C., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2020). Antimicrobial activity and prevention of bacterial biofilm formation of silver and zinc oxide nanoparticle-containing polyester surfaces at various concentrations for use. Foods, 9(4), 442. <https://doi.org/10.3390/foods9040442>
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science, 18(9), 1049-1056. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>
- Gu, G., Ottesen, A., Bolten, S., Wang, L., Luo, Y., Rideout, S., Lyu, S., & Nou, X. (2019). Impact of routine sanitation on the microbiomes in a fresh produce processing facility. International Journal of Food Microbiology, 294, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.002>
- Guo, J., Qin, S., Wei, Y., Liu, S., Peng, H., Li, Q., & Lv, M. (2019). Silver nanoparticles exert concentration-dependent influences on biofilm development and architecture. Cell Proliferation, 52(4), e12616. <https://doi.org/10.1111/cpr.12616>
- Haddad, S., Elliot, M., Savard, T., Deschênes, L., Smith, T., & Ells, T. (2021). 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, 123, 107720. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107720>
- Hascoët, A. S., Ripolles-Avila, C., Guerrero-Navarro, A. E., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Microbial ecology evaluation of an iberian pig processing plant through implementing SCH sensors and the influence of the resident microbiota on *Listeria monocytogenes*. Applied Sciences, 9(21), 4611. <https://doi.org/10.3390/app9214611>
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. Journal of Microbiological Methods, 44(2), 121-129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)
- Iknayan, K. J., Tingley, M. W., Furnas, B. J., & Beissinger, S. R. (2014). Detecting diversity: emerging methods to estimate species diversity. Trends in Ecology & Evolution, 29(2), 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.10.012>
- Iñiguez-Moreno, M., Gutiérrez-Lomeli, M., Guerrero-Medina, P. J., & Avila-Novoa, M. G. (2018). 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, 49, 310-319. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.002>
- Kadam, S. R., den Besten, H. M., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. International Journal of Food Microbiology, 165(3), 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>
- KARUNOVSKY, M. J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology, v. 27, p. 137A.
- Kaur, T., Putatunda, C., Vyas, A., & Kumar, G. (2021). Zinc oxide nanoparticles inhibit bacterial biofilm formation via altering cell membrane permeability. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 51(4), 309-319. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1815057>
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(12), 2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013).

- Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1-e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kumar, R., Umar, A., Kumar, G., & Nalwa, H. S. (2017). Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceramics International*, 43(5), 3940-3961. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.12.062>
- Lange, A., Grzenia, A., Wierzbicki, M., Strojny-Cieslak, B., Kalińska, A., Gołębiewski, M., & Jaworski, S. (2021). Silver and copper nanoparticles inhibit biofilm formation by mastitis pathogens. *Animals*, 11(7), 1884. <https://doi.org/10.3390/ani11071884>
- Langsrud, S., Moen, B., Møretrø, T., Løype, M., & Heir, E. (2016). Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *Journal of Applied Microbiology*, 120(2), 366-378. <https://doi.org/10.1111/jam.13013>
- Lim, E. S., Nam, S. J., Koo, O. K., & Kim, J. S. (2023). Protective role of *Acinetobacter* and *Bacillus* for *Escherichia coli* O157: H7 in biofilms against sodium hypochlorite and extracellular matrix-degrading enzymes. *Food Microbiology*, 109, 104125. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104125>
- Maes, S., Heyndrickx, M., Vackier, T., Steenackers, H., Verplaetse, A., & Reu, K. D. (2019). Identification and spoilage potential of the remaining dominant microbiota on food contact surfaces after cleaning and disinfection in different food industries. *Journal of Food Protection*, 82(2), 262-275. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-226>
- Mandal, S., Van Treuren, W., White, R. A., Eggesbø, M., Knight, R., & Peddada, S. D. (2015). Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial ecology in health and disease*, 26(1), 27663.
- Mandal, S., Van Treuren, W., White, R. A., Eggesbø, M., Knight, R., & Peddada, S. D. (2015). Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26(1), 27663. <http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v26.27663>
- Mazaheri, T., Ripolles-Avila, C., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2023). Cross-contamination of mature *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel surfaces to chicken broth before and after the application of chlorinated alkaline and enzymatic detergents. *Food Microbiology*, 112, 104236. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104236>
- Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A., Bakhrouf, A., Chaabouni, Y., & Chaieb, K. (2017). Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 112, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.057>
- Possebon, F. S., Ullmann, L. S., Malossi, C. D., Miodutzki, G. T., da Silva, E. C., Machado, E. F., ... & Araujo Jr, J. P. (2022). A fast and cheap in-house magnetic bead RNA extraction method for COVID-19 diagnosis. *Journal of Virological Methods*, 300, 114414. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114414>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Reis-Teixeira, F. B., Sousa, I. P., Alves, V. F., Furtado, N. A. J. C., & De Martinis, E. C. P. (2019). Evaluation of lemongrass and ginger essential oils to inhibit *Listeria monocytogenes* in biofilms. *Journal of Food Safety*, 39(4), e12627. <https://doi.org/10.1111/jfs.12627>
- Ripolles-Avila, C., Guitan-Santamaria, M., Pizarro-Giménez, K., Mazaheri, T., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2022). Dual-species biofilms formation between dominant microbiota isolated from a meat processing industry with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*: Unraveling their ecological interactions. *Food Microbiology*, 105, 104026. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104026>
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Hernando, A., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2021). Biovolume and spatial distribution of foodborne Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria in mono-and dual-species biofilms. *Food Microbiology*, 94, 103616. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103616>
- Rozewicki, J., Li, S., Amada, K. M., Standley, D. M., & Katoh, K. (2019). MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W5-W10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz342>
- Souza, V. V. M. A., Almeida, J. M., Barbosa, L. N., & Silva, N. C. C. (2022). Citral, carvacrol, eugenol and thymol: Antimicrobial activity and its application in food. *Journal of Essential Oil Research*, 34(3), 181-194. <https://doi.org/10.1080/10412905.2022.2032422>
- Tadielo, L. E., Bellé, T. H., dos Santos, E. A. R., Schmiedt, J. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Nero, L. A., &

- dos Santos Bersot, L. (2022). Pure and mixed biofilms formation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on polypropylene surfaces. LWT, 162, 113469. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113469>
- Thuptimdang, P., Limpiyakorn, T., McEvoy, J., Prüß, B. M., & Khan, E. (2015). Effect of silver nanoparticles on *Pseudomonas putida* biofilms at different stages of maturity. Journal of Hazardous Materials, 290, 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.073>
- Visvalingam, J., Wang, H., Ells, T. C., & Yang, X. (2019). Facultative anaerobes shape multispecies biofilms composed of meat processing surface bacteria and *Escherichia coli* O157: H7 or *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Applied and Environmental Microbiology, 85(17), e01123-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01123-19>
- Walczak, M., Michalska-Sionkowska, M., Olkiewicz, D., Tarnawska, P., & Warzyńska, O. (2021). Potential of carvacrol and thymol in reducing biofilm formation on technical surfaces. Molecules, 26(9), 2723. <https://doi.org/10.3390/molecules26092723>
- Wijesundara, N. M., Lee, S. F., Cheng, Z., Davidson, R., & Rupasinghe, H. V. (2021). Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. Scientific Reports, 11(1), 1487. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79713-0>
- Wilson, A., Fegan, N., & Turner, M. S. (2022). Co-culture with *Acinetobacter johnsonii* enhances benzalkonium chloride resistance in *Salmonella enterica* via triggering lipid A modifications. International Journal of Food Microbiology, 381, 109905. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109905>
- Yang, X., Wang, H., Hrycauk, S., Holman, D. B., & Ells, T. C. (2023). Microbial dynamics in mixed-culture biofilms of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157: H7 and bacteria surviving sanitation of conveyor belts of meat processing plants. Microorganisms, 11(2), 421. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020421>
- Zarei, M., Rahimi, S., Fazlara, A., & Anvari, S. E. (2023). High biofilm-forming *Pseudomonas* strains isolated from poultry slaughterhouse surfaces: Their importance in the persistence of *Salmonella enteritidis* in slaughterhouses. International Journal of Food Microbiology, 390, 110126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110126>
- Zheng, K., Setyawati, M. I., Leong, D. T., & Xie, J. (2018). Antimicrobial silver nanomaterials. Coordination Chemistry Reviews, 357, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.019>

CAPÍTULO 5

1 DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo foi pioneiro no Brasil em caracterizar a ecologia microbiana de superfícies de equipamentos e utensílios de diferentes indústrias de alimentos. A distribuição dos microrganismos encontrados nesses locais foi variável de acordo ao tipo de matéria-prima processada em cada indústria, com destaque para os gêneros de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Kocuria*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Aeromonas* e *Brevundimonas*. Esses microrganismos também foram encontrados em outros trabalhos desenvolvidos em indústrias de alimentos em países da União Europeia, Canadá e China (FAGERLUND et al., 2017; HASCOËT et al., 2019; MAES et al., 2019; WAGNER et al., 2020; COBO-DÍAZ et al., 2021; CHERIFI et al., 2022). Por compor a microbiota residente dessas instalações são gêneros de microrganismos que podem influenciar diretamente na eficácia dos programas de limpeza e sanitização, desse modo, devem ser contemplados nas avaliações microbiológicas de rotina dos programas de autocontrole das indústrias de alimentos. Contudo, a identificação desses microrganismos por técnicas convencionais é onerosa, assim o uso de técnicas de sequenciamento do gene 16S rRNA, por fornecer dados mais robustos, podem ser utilizadas para mensurar a diversidade microbiana, fornecendo dados de acordo ao local de avaliação/análise, tipo de superfície ou alimento e etapa do processo de higienização. Vale ressaltar que mais trabalhos devem ser desenvolvidos em cooperação entre as indústrias de alimentos e os centros de pesquisa do Brasil, com a finalidade de reduzir os custos das análises e difundir o conhecimento sobre as análises de bioinformática entre as pessoas, aumentando a disponibilidade de estudos para estabelecer comparações entre os tipos de indústrias e alimentos.

Neste estudo, destacamos a capacidade dos isolados de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em desenvolver biofilmes multiespécies com a microbiota acompanhante oriundas das superfícies de equipamentos e utensílios após o processo de higienização pré-operacional. Os biofilmes multiespécies foram capazes de manter células viáveis por 360 h a 10 °C, apresentando estrutura de EPS densa e robusta. Também evidenciamos a eficácia dos compostos de Thymol e Carvacrol (THY+CAR), Ácido Lático e Acético (AL+AA) e nanopartículas de Prata e Óxido de Zinco (AgNPs+ZnONPs) em reduzir a formação de biofilmes multiespécies, afetando sua densidade populacional, distribuição da ecologia microbiana e arquitetura dos

biofilmes. Esses compostos tinham apresentado efeitos antibiofilmes em culturas mono ou dupla espécies (AMRUTHA et al., 2017; GUO et al., 2019; ASHRAFUDOULLA et al., 2021; KAUR et al., 2021; LANGE et al. 2021; WALCZAK et al., 2021), mas até o presente momento sua avaliação não tinha sido avaliada em biofilmes multiespécies. Desse modo, destacamos a importância do estudo em descrever a ação desses compostos em biofilmes que retraram melhor os cenários encontrados nas indústrias de alimentos. No entanto, reforçamos que mais pesquisas devem ser realizadas para avaliar a melhor forma de aplicação desses compostos nos ambientes industriais.

2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nossos resultados mostram que a contaminação microbiana foi variável de acordo ao tipo de indústria, possivelmente por variações nos programas de limpeza e sanitização. A ocorrência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* nas instalações foram baixas, contudo estavam presentes em locais importantes para o processamento de alimentos e apresentavam genes de virulência e formação de biofilme. A ecologia microbiana das indústrias foi diversa e abundante, revelando microrganismos importantes para a produção de alimentos, em relação a ocorrência dos microrganismos cada indústria apresentou grupos bacterianos distintos, fato que pode ser exemplificado pelo tipo de alimento manipulado em cada instalação. *Pseudomonas* foram microrganismos que habitam todos as indústrias avaliadas, demonstrando a adaptabilidade desses microrganismos para a produção de alimentos. Assim, nossos resultados evidenciam a necessidade constante de avaliação das superfícies visando a segurança dos alimentos, além disso, fornecem dados importantes que podem ser utilizados para avaliar os programas de higienização empregados em diferentes indústrias.

Quando os isolados de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microbiota acompanhante foram submetidos a formação de biofilmes puros e multiespécies, os resultados mostraram que a condição de crescimento multiespécies não afetou as populações individuais dos microrganismos, ocorrendo efeito sinérgico dos microrganismos em manter biofilmes multiespécies por longos tempos de formação. Também avaliamos métodos de prevenção/controlé alternativos em biofilmes

multiespécies, o uso consorciado dos compostos de Thymol e Carvacrol (THY+CAR), Ácido Lático e Acético (AL+AA) e nanopartículas de Prata e Óxido de Zinco (AgNPs+ZnONPs) proporcionam reduções significativas nas contagens totais, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. dos biofilmes avaliados, bem como, alteram a distribuição relativa, a diversidade alfa e beta e a arquitetura desses biofilmes, sugerindo que esses compostos podem ser usados como coadjuvante do processo de higienização das indústrias de alimentos.

3 REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO DAVANZO, E. F.; DOS SANTOS, R. L.; CASTRO, V. H. D. L.; PALMA, J. M.; TRIBUL, B. R.; DALLAGO, B. S. L.; SANTANA, A. P. Molecular characterization of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* strains from biofilms in cattle and poultry slaughterhouses located in the federal District and State of Goiás, Brazil. *Plos One*, v. 16, n. 11, 2021.
- AGÜERIA, D. A.; LIBONATTI, C.; CIVIT, D. Cleaning and disinfection programmes in food establishments: a literature review on verification procedures. *J. Appl. Microbiol.*, v. 131, n. 1, p. 23-35, 2021.
- AGUILAR-VÁZQUEZ, J. C.; GODÍNEZ-OVIEDO, A.; LUCERO-MEJÍA, J. E.; D'SOUZA, D. H.; PALACIOS-MARMOLEJO, A.; HERNÁNDEZ-ITURRIAGA, M. Microbiological Profile, Prevalence, and Characterization of *Salmonella* enterica in Peanuts, Pecans, Raisins, Sun-Dried Tomatoes, and Chocolate Sprinkles Sold in Bulk in Markets in Queretaro, Mexico. *J. Food Prot.*, v. 85, n. 9, p. 1265-1272, 2022.
- AMRUTHA, B., SUNDAR, K., & SHETTY, P. H. Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microbial Pathogenesis*, v. 111, n. 156-162, 2017.
- ARYAL, M.; MURIANA, P. M. Efficacy of commercial sanitizers used in food processing facilities for inactivation of *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157: H7, and *Salmonella* biofilms. *Foods*, v. 8, n. 12, p. 639-646, 2019.
- ASHRAFUDOUILLA, M., MIZAN, M. F. R., PARK, S. H., & HA, S. D. Antibiofilm activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on MBEC™ biofilm device and polypropylene surface. *LWT*, v. 147, n. 111575, 2021.
- BAYLIS, C.; UYTENDAELE, M.; JOOSTEN, H.; DAVIES, A. The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. *ILSI Europe Report Series*, p. 1-488, 2011.
- BERG, G.; RYBAKOVA, D.; FISCHER, D.; CERNAVA, T.; VERGÈS, M. C. C.; CHARLES, T.; SCHLOTTER, M. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, v. 8, n. 1, p. 1-22, 2020.

- 104 BOTTA, C.; FERROCINO, I.; PESSIONE, A.; COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.
 105 Spatiotemporal distribution of the environmental microbiota in food processing plants
 106 as impacted by cleaning and sanitizing procedures: the case of slaughterhouses and
 107 gaseous ozone. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 86, n. 23, 2020.
- 108 BRASIL. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Secretaria de Defesa
 109 Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal,
 110 Coordenação Geral de Programas Especiais. Anuário dos Programas de Controle de
 111 Alimentos de Origem Animal do DIPOA, Brasília, DF, v. 6.
- 112 BRASIL. *Ministério da Saúde, Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão*
 113 *Hídrica e Alimentar*. Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil
 114 - Informe 2022.
- 115 BRIDIER, A.; LE GRANDIS, P.; MOREAU, M. H.; PRÉNON, C.; LE ROUX, A.;
 116 FEURER, C.; SOUMET, C. Impact of cleaning and disinfection procedures on
 117 microbial ecology and *Salmonella* antimicrobial resistance in a pig slaughterhouse. *Sci.*
 118 *Rep.*, v. 9. n. 1, p. 1-13, 2019.
- 119 BUCHANAN, R. L.; GORRIS, L. G.; HAYMAN, M. M.; JACKSON, T. C.; WHITING, R.
 120 C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-
 121 response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, v. 75, p. 1-13, 2017.
- 122 BUCUR, F. I.; GRIGORE-GURGU, L.; CRAUWELS, P.; RIEDEL, C. U.; NICOLAU, A.
 123 I. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and
 124 food processing environments. *Front. Microbiol.*, v. 9, n. 2700, 2018.
- 125 CALERO, G. C.; GÓMEZ, N. C.; LERMA, L. L.; BENOMAR, N.; KNAPP, C. W.;
 126 ABRIOUEL, H. In silico mapping of microbial communities and stress responses in a
 127 porcine slaughterhouse and pork products through its production chain, and the
 128 efficacy of HLE disinfectant. *Int. Food Res. J.*, v. 136, n. 109486, 2020.
- 129 CAMPOS, G. Z.; LACORTE, G. A.; JURKIEWICZ, C.; HOFFMANN, C.; LANDGRAF,
 130 M.; DE MELO FRANCO, B. D. G.; PINTO, U. M. Microbiological characteristics of
 131 canastra cheese during manufacturing and ripening. *Food Control*, v. 121, n. 107598,
 132 2021.
- 133 CARABALLO GUZMÁN, A.; GONZÁLEZ HURTADO, M. I.; CUESTA-ASTROZ, Y.;
 134 TORRES, G. Metagenomic characterization of bacterial biofilm in four food processing
 135 plants in Colombia. *Braz. J. Microbiol.*, v. 51, n. 3, p. 1259-1267, 2020.
- 136 CARVALHO, F. T.; VIEIRA, B. S.; VALLIM, D. C.; CARVALHO, L. A.; CARVALHO, R.
 137 C.; PEREIRA, R. C.; FIGUEIREDO, E. E. Genetic similarity, antibiotic resistance and
 138 disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and
 139 chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. *LWT*, v. 109, p. 77-82,
 140 2019.
- 141 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022. Foodborne Outbreak
 142 Tracking and Reporting (FOOD Tool). <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>. (Acesso
 143 em 06/01/2023).
- 144 CHAN, Y. C.; HU, Y.; CHATURONGAKUL, S.; FILES, K. D.; BOWEN, B. M.; BOOR,

- 145 K. J.; WIEDMANN, M. Contributions of two-component regulatory systems, alternative
146 σ factors, and negative regulators to *Listeria monocytogenes* cold adaptation and cold
147 growth. *J. Food Prot.*, v. 71, n. 2, p. 420-425. 2008.
- 148 CHEN, M.; CHENG, J.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; ZENG, H.; XUE, L.; WU, Q. Isolation,
149 potential virulence, and population diversity of *Listeria monocytogenes* from meat and
150 meat products in China. *Front. Microbiol.*, v. 10, n. 946, 2019.
- 151 CHERIFI, T.; ARSENAULT, J.; QUESSY, S.; FRAVALO, P. Co-Occurrence of *L.*
152 *monocytogenes* with Other Bacterial Genera and Bacterial Diversity on Cleaned
153 Conveyor Surfaces in a Swine Slaughterhouse. *Microorganisms*, v. 10, n. 3, 2022.
- 154 CHURCHILL, K. J.; SARGEANT, J. M.; FARBER, J. M.; O'CONNOR, A. M. Prevalence
155 of *Listeria monocytogenes* in select ready-to-eat foods—deli meat, soft cheese, and
156 packaged salad: a systematic review and meta-analysis. *J. Food Prot.*, v. 82, n. 2, p.
157 344-357, 2019.
- 158 CLAEISSON, M. J.; WANG, Q.; O'SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; COLE, J. R.;
159 ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. W. Comparison of two next-generation sequencing
160 technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem
161 variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.*, v. 38, n. 22, 2010.
- 162 CLETO, S.; MATOS, S.; KLUSKENS, L.; VIEIRA, M. J. Characterization of
163 contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS One*, v. 7, n. 6, 2012.
- 164 COBO-DÍAZ, J. F.; ALVAREZ-MOLINA, A.; ALEXA, E. A.; WALSH, C. J.; MENCÍA-
165 ARES, O.; PUENTE-GÓMEZ, P.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. Microbial colonization and
166 resistome dynamics in food processing environments of a newly opened pork cutting
167 industry during 1.5 years of activity. *Microbiome*, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2021.
- 168 COBURN, B.; GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. *Salmonella*, the host and disease: a brief
169 review. *Immunology and Cell Biology*, v. 85, n. 2, p. 112-118, 2007.
- 170 COCOLIN, L.; ALESSANDRIA, V.; DOLCI, P.; GORRA, R.; RANTSIOU, K. Culture
171 independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food
172 fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 167, n.1, p. 29-43, 2013.
- 173 CORADINI, M. G. L.; MAIA, D. S. V.; IGLESIAS, M. A.; HAUBERT, L.; LOPES, G. V.;
174 DA SILVA, D. A. L.; DA SILVA, W. P. Occurrence and characterization of *Listeria*
175 *monocytogenes* from beef jerky processing line. *JFST*, v. 56, n. 1, p. 436-442, 2019.
- 176 COSTERTON, J.W. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial*
177 *Agents*, v. 11, p. 217–221, 1999.
- 178 CUNHA-NETO, A.; CARVALHO, L. A.; CARVALHO, R. C. T.; DOS PRAZERES
179 RODRIGUES, D.; MANO, S. B.; DE SOUZA FIGUEIREDO, E. E.; CONTE-JUNIOR,
180 C. A. *Salmonella* isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state
181 of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization
182 by repetitive sequence-based PCR system. *Poult. Sci.*, v. 97, n. 4, p.1373-1381, 2018.
- 183 DALY, A. J.; BAETENS, J. M.; DE BAETS, B. Ecological diversity: measuring the
184 unmeasurable. *Mathematics*, v. 6, n. 7, p. 119-127, 2018.

- 185 DE FILIPPIS, F.; PARENTE, E.; ERCOLINI, D. Recent past, present, and future of the
186 food microbiome. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, v. 9, p. 589-608, 2018.
- 187 DE QUADROS, C. L.; MANTO, L.; MISTURA, E.; WEBBER, B.; RITTERBUSCH, G.
188 A.; BORGES, K. A.; DOS SANTOS, L. R. Antimicrobial and disinfectant susceptibility
189 of *Salmonella* serotypes isolated from swine slaughterhouses. *Curr. Microbiol.*, v. 77,
190 n. 6, p. 1035-1042, 2020.
- 191 DOS SANTOS, R. L.; DAVANZO, E. F. A.; PALMA, J. M.; CASTRO, V. H. D. L.; DA
192 COSTA, H. M. B.; DALLAGO, B. S. L.; SANTANA, Â. P. Molecular characterization
193 and biofilm-formation analysis of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and
194 *Escherichia coli* isolated from Brazilian swine slaughterhouses. *Plos One*, v. 17, n. 9,
195 2022.
- 196 DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P.
197 Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin.*
198 *Microbiol.*, v. 42, n. 8, p. 3819-3822, 2004.
- 199 ELAFIFY, M.; DARWISH, W. S.; EL-TOUKHY, M.; BADAWY, B. M.; MOHAMED, R.
200 E.; SHATA, R. R. Prevalence of multidrug resistant *Salmonella* spp. in dairy products
201 with the evaluation of the inhibitory effects of ascorbic acid, pomegranate peel extract,
202 and D-tryptophan against *Salmonella* growth in cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 364,
203 n. 109534, 2022.
- 204 EUROPEAN COMMISSION. 2001. Commission Decision 2001/471/EC of 8 June
205 2001 laying down rules for the regular checks in the general hygiene carried out by the
206 operators in establishments according to Directive 64/433/EEC on health conditions
207 for the production and marketing of fresh meat and Directive 71/118/ECC on health
208 problems affecting the production and placing on the market of fresh poultry meat. Off.
209 J. Eur. Communities L 165:48–53.
- 210 EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY The European Union One Health 2021
211 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, v. 20, n. 12, p. 7666, 2022.
- 212 FAGERLUND, A.; MØRETRØ, T.; HEIR, E.; BRIANDET, R.; LANGSRUD, S. Cleaning
213 and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background
214 microbiota from meat processing surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 83, n. 17, 2017.
- 215 FAN, Y.; QIAO, J.; LU, Z.; FEN, Z.; TAO, Y.; LV, F.; BIE, X. Influence of different
216 factors on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and the regulation of cheY
217 gene. *Food Res. Int.*, v. 137, n. 109405, 2020.
- 218 FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ, M. J. *Listeria*
219 *monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain
220 characteristics, and implications for public health. *J. Food Prot.*, v. 77, n. 1, p. 150-170,
221 2014.
- 222 FERROCINO, I.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Microbiome and -omics application in
223 food industry. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 377, n. 109781, 2022.
- 224 FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo:
225 Atheneu, 2008. 168p.

- 226 FRAZILIO, D. A.; DE ALMEIDA, O. G. G.; NIÑO-ARIAS, F. C.; DE MARTINIS, E. C.
227 P. Finding a common core microbiota in two Brazilian dairies through culture and DNA
228 metabarcoding studies. *JFST*, v. 56, n. 12, p. 5326-5335, 2019.
- 229 GERBA, C. P. Indicator Microorganisms. *Environmental Microbiology (Second*
230 *Edition)*, P. 485-499, 2009.
- 231 GUO, J., QIN, S., WEI, Y., LIU, S., PENG, H., LI, Q., & LV, M. Silver nanoparticles
232 exert concentration-dependent influences on biofilm development and architecture.
233 *Cell Proliferation*, v. 52, n. 4, e12616, 2019.
- 234 HALKMAN, H.B.D., HALKMAN, A.K. Indicator Organisms. *Encyclopedia of Food*
235 *Microbiology (Second Edition)*, v.2, p.358-363, 2014.
- 236 HASCOËT, A. S.; RIPOLLES-AVILA, C.; GUERRERO-NAVARRO, A. E.;
237 RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Microbial ecology evaluation of an iberian pig processing
238 plant through implementing SCH sensors and the influence of the resident microbiota
239 on *Listeria monocytogenes*. *Appl. Sci.*, v. 9, n. 21, 2019.
- 240 HUA, Z.; KORANY, A. M.; EL-SHINAWY, S. H.; ZHU, M. J. Comparative evaluation of
241 different sanitizers against *Listeria monocytogenes* biofilms on major food-contact
242 surfaces. *Front. Microbiol.*, v. 10, n. 2462, 2019.
- 243 IGLESIAS, M. A.; KRONING, I. S.; DECOL, L. T.; DE MELO FRANCO, B. D. G.; DA
244 SILVA, W. P. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria*
245 *monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. *Food Res.*
246 *Int.*, v. 100, p. 96-101, 2017.
- 247 IKNAYAN, K. J.; TINGLEY, M. W.; FURNAS, B. J.; BEISSINGER, S. R. Detecting
248 diversity: emerging methods to estimate species diversity. *TREE*, v. 29, n. 2, p. 97-
249 106, 2014.
- 250 ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE,
251 M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.;WEILL, F. X. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the
252 white–Kauffmann–Le minor scheme. *Microbiol. Res.*, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014.
- 253 JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 6 ed.
- 254 KABLE, M. E.; SRISENGFA, Y.; XUE, Z.; COATES, L. C.; MARCO, M. L. Viable and
255 total bacterial populations undergo equipment-and time-dependent shifts during milk
256 processing. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 85, n. 13, 2019.
- 257 KADAM, S. R.; BESTEN, H. M.W.; VEEN, S. V. D.; ZWIETERING, M. H.;
258 MOEZELAAR, R. T.; ABEE, T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm
259 formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int. J. Food Microbiol.*,
260 v.165, p. 259–264, 2013.
- 261 KAUR, T., PUTATUNDA, C., VYAS, A., & KUMAR, G. Zinc oxide nanoparticles inhibit
262 bacterial biofilm formation via altering cell membrane permeability. *Preparative*
263 *Biochemistry & Biotechnology*, v. 51, n. 4, p. 309-319, 2021.
- 264 KICH, J. D.; SOUZA, A. I.; MONTES, J.; MENEGUZZI, M.; COSTA, E. F.;

- 265 COLDEBELLA, A.; CARDOSO, M. Investigation of *Listeria monocytogenes*,
266 *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pig carcasses in Southern Brazil.
267 *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 40, p. 781-790, 2020.
- 268 KIM, B. R.; SHIN, J.; GUEVARRA, R. B.; LEE, J. H.; KIM, D. W.; SEOL, K. H.;
269 ISAACSON, R. E. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial
270 communities. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 27, n. 12, p. 2089-2093, 2017.
- 271 KONOPKA, A. What is microbial community ecology? *The ISME Journal*, v. 3, n. 11,
272 p. 1223-1230, 2009.
- 273 KOUTSOUMANIS, K. P.; KENDALL, P. A.; SOFOS, J. N. A comparative study on
274 growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when
275 grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology*, v. 21, n. 4, p. 415-422,
276 2004.
- 277 LANGE, A., GRZENIA, A., WIERZBICKI, M., STROJNY-CIESLAK, B., KALIŃSKA, A.,
278 GOŁĘBIEWSKI, M., & JAWORSKI, S. Silver and copper nanoparticles inhibit biofilm
279 formation by mastitis pathogens. *Animals*, v. 11, n. 7, 1884, 2021;
- 280 LARSEN, H. E.; SEELIGER, H. P. R. A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp.
281 n. In: *Proceedings of the Third International Symposium on Listeriosis*, p. 35-39, 1966.
- 282 LEE, B. H.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. Increased adhesion of *Listeria*
283 *monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress. *Front. Microbiol.*, v. 8, n.
284 2221, 2017
- 285 MAĆKIW, E.; KORSAK, D.; KOWALSKA, J.; FELIX, B.; STASIAK, M.; KUCHARZEK,
286 K.; POSTUPOLSKI, J. Incidence and genetic variability of *Listeria monocytogenes*
287 isolated from vegetables in Poland. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 339, n. 109023, 2021.
- 288 MAES, S.; HEYNDRIKX, M.; VACKIER, T.; STEENACKERS, H.; VERPLAETSE, A.;
289 REU, K. D. Identification and spoilage potential of the remaining dominant microbiota
290 on food contact surfaces after cleaning and disinfection in different food industries. *J.*
291 *Food Prot.*, v. 82, n. 2, p. 262-275, 2019.
- 292 MCQUISTON, J. R.; PARRENAS, R.; ORTIZ-RIVERA, M.; GHEESLING, L.;
293 BRENNER, F.; FIELDS, P. I. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes
294 *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 5, p. 1923-1932, 2004.
- 295 MLADENOVIĆ, K. G.; GRUJOVIĆ, M. Ž.; KIŠ, M.; FURMEG, S.; TKALEC, V. J.;
296 STEFANOVIĆ, O. D.; KOCIĆ-TANACKOV, S. D. Enterobacteriaceae in food safety
297 with an emphasis on raw milk and meat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 105, n. 23, p.
298 8615-8627, 2021.
- 299 MONTERO, D.; BODERO, M.; RIVEROS, G.; LAPIERRE, L.; GAGGERO, A.; VIDAL,
300 R. M.; VIDAL, M. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria*
301 *monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship
302 to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Front. Microbiol.*, v. 6, n. 384, 2015.
- 303 MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. Residential bacteria on surfaces in the food industry
304 and their implications for food safety and quality. *CRFSFS*, v. 16, n. 5, p. 1022-1041,

- 2017.
- MOTA, J. D. O.; BOUE, G.; PREVOST, H.; MAILLET, A.; JAFFRES, E.; MAIGNIEN, T.; FEDERIGHI, M. Environmental monitoring program to support food microbiological safety and quality in food industries: A scoping review of the research and guidelines. *Food Control*, v. 130, n. 108283, 2021.
- MOURA, G.; TOMBORELLI, P.; CARVALHO, R. C.; SIGARINI, C.; CARVALHO, F.; VIEIRA, B.; FIGUEIREDO, E. E. *Listeria monocytogenes* and other species as persistent contaminants in the processing of chicken meat. *JAPR*, v. 28, n. 2, p. 470-478, 2019.
- OBE, T.; RICHARDS, A. K.; SHARIAT, N. W. Differences in biofilm formation of *Salmonella* serovars on two surfaces under two temperature conditions. *J. Appl. Microbiol.*, v. 132, n. 3, p. 2410-2420, 2022.
- OLIVEIRA, D. C.V.; JUNIOR, A.F.; KANENO, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; SILVA, N.C.C.; RALL, V.L.M. Ability of *Salmonella* spp. to Produce Biofilm Is Dependent on Temperature and Surface Material. *Foodborne Pathog. Dis.*, v. 11, n. 6, p. 478-483, 2014.
- OLIVEIRA, T. S.; VARJAO, L. M.; DA SILVA, L. N. N.; PEREIRA, R. D. C. L.; HOFER, E.; VALLIM, D. C.; DE CASTRO ALMEIDA, R. C. *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. *Food Control*, v. 88, p. 131-138, 2018.
- OXARAN, V.; LEE, S. H. I.; CHAUL, L. T.; CORASSIN, C. H.; BARANCELLI, G. V.; ALVES, V. F.; DE MARTINIS, E. C. P. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. *Food Microbiol.*, v. 68, p. 16-23, 2017.
- PERIN, A. P.; MARTINS, B. T. F.; BARREIROS, M. A. B.; YAMATOOGI, R. S.; NERO, L. A.; DOS SANTOS BERSOT, L. Occurrence, quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* sp. isolated from chicken meat in the state of Paraná, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v. 51, n.1, p. 335-345, 2020.
- PIRIE, J. H. The genus *Listerella pirie*. *Science*, v. 91, n. 2364, p. 383-383, 1940.
- PRATES, D. D. F.; HAUBERT, L.; DE FÁTIMA WÜRFEL, S.; CAVICCHIOLI, V. Q.; NERO, L. A.; DA SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes* in dairy plants in Southern Brazil: Occurrence, virulence potential, and genetic diversity. *J. Food Saf.*, v. 39, n. 6, 2019.
- QUIJADA, N. M.; MANN, E.; WAGNER, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M.; SCHMITZ-ESSER, S. Autochthonous facility-specific microbiota dominates washed-rind Austrian hard cheese surfaces and its production environment. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 267, p. 54-61, 2018.
- ROCOURT, J.; GRIMONT, P. A. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 33, n. 4, p. 866-869, 1983.

- RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R. D.; RIZZO, N. N.; FERREIRA, D.; OLIVEIRA, A. P. D.; LEVANDOWSKI, R.; NASCIMENTO, V. P. D. ATP-bioluminescence and conventional microbiology for hygiene evaluation of cutting room surfaces in poultry slaughterhouse. *Acta Sci. Vet.*, v. 46, n. 1534, p. 1-6, 2018.
- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P.; BERNÁRDEZ, M.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J.; COMESAÑA, Á. S.; CABO, M. L. Identification and metagenetic characterisation of *Listeria monocytogenes*-harbouring communities present in food-related industrial environments. *Food Control*, v. 95, p. 6-17, 2019.
- SABATER, C.; COBO-DÍAZ, J. F.; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; RUAS-MADIEDO, P.; RUIZ, L.; MARGOLLES, A. Novel methods of microbiome analysis in the food industry. *Int. Microbiol.*, v. 24, n.4, p. 593-605, 2021.
- SAINI, P. K.; MARKS, H. M.; DREYFUSS, M. S.; EVANS, P.; COOK JR, L. V.; DESSAI, U. Indicator organisms in meat and poultry slaughter operations: their potential use in process control and the role of emerging technologies. *J. Food Prot.*, v. 74, n. 8, p. 1387-1394, 2011.
- SANTOS, V. C.; RIBEIRO, D. C. S. Z.; FONSECA, L. M. Ocorrência de não conformidades físico-químicas e microbiológicas em leite e derivados no estado de Minas Gerais, no período de 2011 a 2015. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 71, p. 2111-2116, 2019.
- SCHAFER, D. F.; STEFFENS, J.; BARBOSA, J.; ZENI, J.; PAROUL, N.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L. Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. *LWT*, v. 86, p. 393-398, 2017.
- SEELIGER, H. P. R. Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977). Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie, v. 249, n. 4, p. 487-493, 1981.
- SEELIGER, H. P.; ROCOURT, J.; SCHRETTENBRUNNER, A.; GRIMONT, P. A.; JONES, D. *Listeria ivanovii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 34(3), 336-337, 1984.
- SEQUINO, G.; VALENTINO, V.; VILLANI, F.; DE FILIPPIS, F. Omics-based monitoring of microbial dynamics across the food chain for the improvement of food safety and quality. *Int. Food Res. J.*, n. 111242, 2022.
- SERENO, M. J.; VIANA, C.; PEGORARO, K.; DA SILVA, D. A. L.; YAMATOGLI, R. S.; NERO, L. A.; BERSOT, L. S. Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil. *Food Microbiol.*, v. 84, n. 103234, 2019.
- SOARES, V. M.; VIANA, C.; PEREIRA, J. G.; DESTRO, M. T.; NERO, L. A.; BERSOT, S. L.; PINTO, J. P. D. A. N. (2018). Absence of a continuous water spray system does not influence the microbiological contamination of the conveyor belts in chicken slaughterhouses. *LWT*, v. 97, p. 414-418, 2018.
- SOMERFIELD, P. J. Identification of the Bray-Curtis similarity index: Comment on Yoshioka (2008). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 372, p. 303-306, 2008.

- 386 STELLATO, G.; DE FILIPPIS, F.; LA STORIA, A.; ERCOLINI, D. Coexistence of lactic
387 acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment.
388 *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 81, n. 22, p. 7893-7904, 2015.
- 389 TEIXEIRA, L. A.; CARVALHO, F. T.; VALLIM, D. C.; PEREIRA, R. C.; CUNHA NETO,
390 A.; VIEIRA, B. S.; FIGUEIREDO, E. E. *Listeria monocytogenes* in export-approved
391 beef from Mato Grosso, Brazil: prevalence, molecular characterization and resistance
392 to antibiotics and disinfectants. *Microorganisms*, v. 8, n. 1, p. 18-27, 2019.
- 393 TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZEBY, J. P. Nomenclature
394 and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 55, n. 1, p. 521-
395 524, 2005.
- 396 TRUCHADO, P.; GIL, M. I.; QUERIDO-FERREIRA, A. P.; CAPÓN, C. L.; ÁLVAREZ-
397 ORDOÑEZ, A.; ALLENDE, A. Frozen Vegetable Processing Plants Can Harbour
398 Diverse *Listeria monocytogenes* Populations: Identification of Critical Operations by
399 WGS. *Foods*, v. 11, n. 11, p.1546-1552, 2022.
- 400 VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. Contamination sources,
401 serogroups, biofilm-forming ability and biocide resistance of *Listeria monocytogenes*
402 persistent in tilapia-processing facilities. *JFST*, v. 54, n. 12, p. 3867-3879, 2017.
- 403 VIANA, C.; SERENO, M. J.; PEGORARO, K.; YAMATOOGI, R. S.; CALL, D. R.; DOS
404 SANTOS BERSOT, L.; NERO, L. A. Distribution, diversity, virulence genotypes and
405 antibiotic resistance for *Salmonella* isolated from a Brazilian pork production chain. *Int.*
406 *J. Food Microbiol.*, v. 310, n. 108310, 2019.
- 407 VOSS-RECH, D.; KRAMER, B., SILVA, V. S.; REBELATTO, R.; ABREU, P. G.;
408 COLDEBELLA, A.; VAZ, C. S. L. Longitudinal study reveals persistent environmental
409 *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. *Veterinary Microbiology*, v. 233, p.
410 118-123, 2019.
- 411 WAGNER, E. M.; PRACSER, N.; THALGUTER, S.; FISCHER, K.; RAMMER, N.;
412 POSPÍŠILOVÁ, L.; RYCHLI, K. Identification of biofilm hotspots in a meat processing
413 environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. *Int. J. Food*
414 *Microbiol.*, v. 328, n. 108668, 2020.
- 415 WALCZAK, M., MICHALSKA-SIONKOWSKA, M., OLKIEWICZ, D., TARNAWSKA, P.,
416 & WARŻYŃSKA, O. Potential of carvacrol and thymol in reducing biofilm formation on
417 technical surfaces. *Molecules*, v. 26, n. 9, 2021.
- 418 WANG, B.; TAN, X.; DU, R.; ZHAO, F.; ZHANG, L.; HAN, Y.; ZHOU, Z. Bacterial
419 composition of biofilms formed on dairy-processing equipment. *Prep. Biochem.*
420 *Biotechnol.*, v. 49, n. 5, p. 477-484, 2019.
- 421 YANG, X.; WU, Q.; HUANG, J.; WU, S.; ZHANG, J.; CHEN, L.; ZHANG, Y. Prevalence
422 and characterization of *Salmonella* isolated from raw vegetables in China. *Food*
423 *Control*, v. 109, n. 106915, 2020.
- 424 ZACHARSKI, K. A.; SOUTHERN, M.; RYAN, A.; ADLEY, C. C. Evaluation of an
425 environmental monitoring program for the microbial safety of air and surfaces in a dairy
426 plant environment. *J. Food Prot.*, v. 81, n. 7, p. 1108-1116, 2018.

427 ZWIRZITZ, B.; WETZELS, S. U.; DIXON, E. D.; THALGUTER, S.; STESSL, B. Co-
428 occurrence of *Listeria* spp. and spoilage associated microbiota during meat processing
429 due to cross-contamination events. *Front. Microbiol.*, v. 12, n. 632935, 2021.