

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 30/06/2024.

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.

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/controle 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.; YAMATOGLI, 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.; YAMATOIGI, 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.