

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *SALMONELLA* HEIDELBERG
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Suelen Priscila Santos

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *SALMONELLA* HEIDELBERG PLANCTÔNICAS E
SÉSSEIS**

Suelen Priscila Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Higiene, inspeção, microbiologia e composição química de alimentos, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

Orientadora: Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues
Coorientador: Prof. Dr. Christian Oliveira Reinehr

Passo Fundo, RS, Brasil
2018

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *SALMONELLA* HEIDELBERG
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS**

Elaborada por
Suelen Priscila Santos

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

**Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF
(Orientador/Presidente)**

Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF

Giseli Aparecida Ritterbusch, Dra., UPF

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

CIP – Catalogação na Publicação

S237c Santos, Suelen Priscila
Cinética de crescimento de *Salmonella* Heidelberg
planctônicas e sésseis / Suelen Priscila Santos. – 2018.
53 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Dra. Laura Beatriz Rodrigues.
Coorientador: Dr. Christian Oliveira Reinehr.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2018.

1. *Salmonella* Heidelberg. 2. Microbiologia - Cultura
e meios de cultura. 3. Ciclo celular. I. Rodrigues, Laura
Beatriz, orientadora. II. Reinehr, Christian Oliveira,
coorientador. III. Título.

Catalogação: Bibliotecário Luís Diego Dias
de S. da Silva - CRB 10/2241

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho não seria possível sem o apoio e colaboração de inúmeras pessoas. Gostaria de agradecer todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para a realização desse sonho.

Em primeiro lugar, e mais importante de tudo, gostaria de agradecer aos meus pais e minha família pelo apoio incondicional.

À minha orientadora Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues inicialmente por confiar no meu trabalho, me acolhendo no PPGbioexp, pela orientação, amizade, incentivo a pesquisa e docência. Sempre irei ser grata pela orientadora que tive.

Ao Prof. Dr. Christian Oliveira Reinehr pela ajuda no desenvolvimento desse experimento.

Ao Prof. Dr. Elci Lotar Dickel, essencial à minha formação enquanto docente e profissional.

À Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos pelos ensinamentos, oportunidades de melhoramento profissional e pela amizade.

Ao Prof. Fernando Pilotto pelos valiosos ensinamentos e importante experiência prática.

Aos demais Professores do PPGBioexp pelos conhecimentos e inspiração para a pesquisa e docência.

À doutoranda Bruna Webber, que me auxiliou inúmeras vezes, compartilhando seus conhecimentos e me ensinando técnicas e protocolos, além da amizade.

Às mestrandas Carolina Peixoto, Luciane Manto e Máisa Benincá pela amizade, momentos felizes e, principalmente, pelo apoio durante toda essa jornada.

Aos demais colegas do PPGBioexp por todo o apoio e amizade.

Aos técnicos e bolsistas dos Laboratório de bacteriologia do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo pelos auxílios durante o experimento, excelente convívio e amizade.

Ao mestrando Eng. Agr. Bruno Tiago Sebastiani pelo incentivo em lutar e sonhar por esse sonho, estando ao meu lado auxiliando na prática de experimento e na vida.

À Universidade de Passo Fundo (UPF), pela formação adquirida, pela infraestrutura, equipamentos e materiais utilizados, mas principalmente pelo acolhimento como segunda casa, desde da graduação.

À CAPES e à UPF, pelo apoio financeiro e concessão da taxa, que me permitiu dedicação exclusiva e aprimoramento profissional, possibilitando a realização desse sonho.

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	17
2.2 <i>SALMONELLA</i> HEIDELBERG	19
2.3 BIOFILMES	19
2.3.1 Biofilme na Indústria de alimentos	21
2.3.2 Formação de Biofilme	22
2.4 MULTIPLICAÇÃO MICROBIANA	24
2.4.1 Crescimento populacional bacteriano	27
2.4.2 Curva de crescimento microbiano	29
2.4.3 Microbiologia Preditiva	30
3. ARTIGO	32
4. CONCLUSÕES	45
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
6. REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1.	Fases de formação do biofilme.....	23
FIGURA 2.	Ação catalisadora de enzimas em reações químicas.....	24
FIGURA 3.	Fatores que influenciam a atividade enzimática.....	25
FIGURA 4.	Desnaturação Proteica.....	25
FIGURA 5.	Velocidade de reações enzimáticas mínima, máxima e ótima.....	27
FIGURA 6.	Relação entre temperatura e crescimento de microrganismos em diferentes classes térmicas.....	27
FIGURA 7.	Fissão binária de procariontes.....	28
FIGURA 8.	Taxa de crescimento de uma cultura bactéria expressa em Log.....	28
FIGURA 9.	Curva de crescimento em fase exponencial.....	29
FIGURA 10.	Curva de crescimento microbiano.....	30

3. ARTIGO

FIGURA 1.	Curvas de crescimento de <i>Salmonella</i> Heidelberg planctônicas e sésseis a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $9\pm 1^{\circ}\text{C}$	40
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS

3. ARTIGO

- TABELA 1. Tempo médio de geração e velocidade específica de crescimento de *Salmonella* Heidelberg planctônica e sésseis. 39
- TABELA 2. Comparação do tempo médio de geração e velocidade específica de crescimento de *Salmonella* Heidelberg (SH) planctônica e *Salmonella* spp das modelagens no Pathogen Modelling Program e ComBase Predictor. 41
- TABELA 3. Tempo de alcance *Salmonella* Heidelberg (SH) planctônica e *Salmonella* spp das modelagens no Pathogen Modelling Program e ComBase Predictor para alcançar a dose infectante de *Salmonella* para humanos varia entre 10^6 e 10^8 UFC. 42

LISTA DE ABREVIATURAS

Aw	Atividade água
AP	Água Peptonada
BHI	Brain-Heart Infusion – Infusão Cérebro-coração
CDC	Center for Disease Control and Prevention
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EUA	Estados Unidos da América
EPS	Extracellular Polymeric Substances
kHz	Quilohertz
PCA	Plate Count Agar
pH	Potencial Hidrogeniônico
SH	<i>Salmonella</i> Heidelberg
TSA	Ágar triptona soja
TSB	Caldo triptona de Soja
mg	Miligramas
mL	Mililitro
UE	União Européia
UFC	Unidade de formação de colônias
UPF	Universidade de Passo Fundo
XLD	Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato
µl	Microlitro
µm	Micrometro
°C	Graus Celcius

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *SALMONELLA* HEIDELBERG PLANCTÔNICAS E SÉSSIL

Autor: Suelen Priscila Santos
Orientadora: Laura Beatriz Rodrigues
Coorientador: Christian Oliveira Reinehr
Passo Fundo, 27 de Julho de 2018

As doenças transmitidas por alimentos são causadas por bactérias, vírus, parasitas e toxinas. Dessas destaca-se a salmonelose uma doença alimentar grave causada pela bactéria *Salmonella* spp. sendo a *Salmonella* Heidelberg (SH) um dos sorovares de maior distribuição no mundo, associado a doenças humanas. A contaminação dos alimentos por salmonela ocorre principalmente por contaminação cruzada entre superfícies e alimento, uma vez que superfícies podem apresentar bactérias aderidas na forma de biofilmes. A capacidade de formação de biofilme é dependente da superfície utilizada nas plantas de processamento de alimentos sendo, o aço inoxidável o mais utilizado. Para evitar e remover os biofilmes das superfícies é essencial o estudo da cinética de crescimento do microrganismo, envolvendo a observação das fases de crescimento e o comportamento de células sésseis e planctônicas em função de diferentes temperaturas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de crescimento de SH planctônica e sésseis mantidas a $9\pm 1^\circ\text{C}$ e $36\pm 1^\circ\text{C}$, comparado-as com modelagens bacterianas no Pathogen Modeling Program (PMP) e no ComBase Predictor. Para o estudo da curva de crescimento de SH planctônica, obteve-se um inóculo de 10^3 UFC da cultura de SH, adicionados a tubos, em triplicata, contendo caldo triptona de soja sem glicose mantidos aerobicamente em incubadoras tipo B.O.D. sob temperatura de $9\pm 1^\circ\text{C}$ e $36\pm 1^\circ\text{C}$, incubados durante 0 min., 01 h, 02 h, 03 h, 04 h, 06 h, 08 h, 10 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h, 144 h, 168 h e 192 h. Após os tempos de incubação as células bacterianas foram quantificadas pelo método de contagem em gota (Drop plate) e os resultados foram expressos em UFC.mL⁻¹. No estudo da curva de crescimento de SH em fase sésseis os corpos de prova utilizados foram cupons de aço inoxidável, submetidos aos procedimentos de limpeza e esterilização. Para a formação dos biofilmes, os cupons foram cultivados em tubos submetidos ao mesmo protocolo do estudo de células planctônicas. Entretanto, após os períodos de incubação os cupons foram retirados dos meios de cultivo e imersos em Água Peptonada (AP) 0,1% por 1 minuto, introduzidos em tubos contendo AP 0,1%, submetidos ao banho de ultrassom (frequência de 40 kHz e potência de 81 W por 10 minutos) e quantificadas pelo método (Drop plate). Os resultados demonstram que as células de SH planctônicas e sésseis apresentam os tempos de geração maiores e velocidades específicas menores na temperatura de $9\pm 1^\circ\text{C}$. Nas temperaturas de $9\pm 1^\circ\text{C}$ e $36\pm 1^\circ\text{C}$ os tempos de gerações foram maiores e as velocidades específicas menores para células planctônicas do que as sésseis. Além disso, a curva de crescimento de células sésseis apresenta maior fase lag e exponencial quando mantidos a $9\pm 1^\circ\text{C}$, enquanto que a maior fase estacionária é a $36\pm 1^\circ\text{C}$. Para células planctônicas a maior fase lag é a $9\pm 1^\circ\text{C}$ e maior fase exponencial a 36°C .

Assim, conclui-se que a cinética de crescimento de SH é influenciada pela temperatura e pelas fases planctônica e séssil, apresentando as fases da curva de crescimento e velocidades de crescimento específica distintas. Na comparação entre a curva de crescimento de *Salmonella* Heidelberg planctônica e as modelagens bacterianas verificou-se diferentes parâmetros de crescimento a 10°C no PMP e ComBase, e a 36°C a modelagem no PMP demonstrou os valores mais próximos aos encontrados na SH. Assim sendo, reitera-se a importância da manipulação e conservação de alimentos em baixas temperaturas, a fim de controlar o crescimento microbiano garantindo a segurança alimentar.

Palavras-chaves: *Salmonella* Heidelberg, curva de crescimento, planctônica, séssil.

ABSTRACT

**Master's Dissertation Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

**GROWTH KINETICS OF *SALMONELLA* HEIDELBERG PLANKTONICS AND
SESSILES CELL**

Author: Suelen Priscila Santos
Advisor: Laura Beatriz Rodrigues
Passo Fundo, July 27, 2018.

Foodborne diseases are caused by bacteria, viruses, parasites, toxins, and others. Of these, salmonellosis stands out a serious foodborne illness caused by the bacterium *Salmonella* spp. *Salmonella* Heidelberg (SH) is one of the most widely distributed serovars in the world, associated with human diseases. The contamination of food by *Salmonella* occurs mainly by cross-contamination between surfaces and food, once, surfaces may have bacteria adhered in the form of biofilms. The capacity of biofilm formation is dependent on the surface used in the processing plants and stainless steel is the most used. To avoid and remove biofilms from the surfaces, producing safe food, it is essential to study the growth kinetics of the microorganism involving the observation of growth phases and the behavior of sessile and planktonic cells as a function of different temperatures. The objective of this work was to evaluate the growth kinetics of planktonic and sessile SH maintained at 9 ± 1 °C and 36 ± 1 °C, compared them with bacterial modeling in the Pathogen Modeling Program (PMP) and ComBase Predictor. For the study of the growth curve of planktonic SH, an inoculum of 10^3 CFU of SH culture, added to tubes, in triplicate, containing tryptone broth of glucose-free soybeans kept aerobically in B.O.D. were incubated for 0 min, 01 h, 02 h, 03 h, 04 h, 06 h, 08 h, 10 h, 12 h, 18 h, 24 h at a temperature of 9 ± 1 °C and 36 ± 1 °C, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h, 144 h, 168 h and 192 h. After the incubation times the bacterial cells were quantified by the (Drop plate) and the results were expressed in CFU.mL⁻¹. In the study of the SH curve in the sessile phase, the test pieces used were stainless steel coupons undergoing cleaning and sterilization procedures. For the formation of biofilms, the coupons were cultured in tubes submitted to the same protocol as the planktonic cell study. However, after the incubation periods the coupons were removed from the culture media and immersed in 0.1% Peptone Water (PW) for 1 minute, introduced into tubes containing 0.1% Pw, subjected to the ultrasonic bath (frequency of 40 kHz and power of 81 W for 10 minutes) and quantified by the method (Drop plate). The results show that planktonic and sessile SH cells have the highest generation times and lower specific rates at the temperature of 9 ± 1 °C. At temperatures of 9 ± 1 °C and 36 ± 1 °C, generation times were longer and speeds smaller for planktonic cells than sessile. In addition, the growth curve of sessile cells presents a higher lag and exponential phase when maintained at 9 ± 1 °C, while the largest stationary phase is at 36 ± 1 °C. For planktonic cells the largest lag phase is at 9 ± 1 °C and the highest exponential phase at 36 °C. Thus, it is concluded that the kinetics of SH growth is influenced by the temperature and the planktonic and sessile phases, presenting the phases of the growth curve and specific speeds of growth. In the comparison between the

planktonic *Salmonella* Heidelberg growth curve and the bacterial models, different growth parameters were observed at 10 ° C in PMP and ComBase, and at 36 ° C the PMP modeling showed values closer to those found in SH. Therefore, the importance of handling and preserving foods at low temperatures is reiterated in order to control microbial growth, guaranteeing food safety.

Key words: *Salmonella* Heidelberg, growth kinetics, planktonics, sessiles.

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos esforços da ciência na produção de alimentos livres de patógenos, mais casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) são relatados no mundo. Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (1) anualmente, em média 48 milhões de pessoas adoecem, 128.000 são hospitalizados e 3.000 morrem por DTA. No Brasil entre os anos de 2007 a 2016 ocorreram 6.632 surtos, 469.482 expostos, 118.104 doentes, 17.186 hospitalizações e 109 óbitos por DTA (2).

Dessas DTAs, destaca-se a salmonelose uma doença alimentar grave causada pela bactéria *Salmonella* spp. As pessoas geralmente se contaminam ingerindo ovos crus ou mal cozidos; leite cru ou não pasteurizado e outros produtos lácteos; frutas e vegetais crus e produtos cárneos de aves crus ou pouco cozidos (3). Os sintomas mais comuns da salmonelose são: diarreia, febre e cólicas abdominais entre 12 a 72 horas após a infecção (1).

Qualquer pessoa pode se infectar com salmonela. Entretanto os grupos com maior risco de doença grave incluem: crianças menores de 5 anos, adultos com mais de 65 anos e pessoas com o sistema imunológico enfraquecido, diabetes ou passando por tratamento de câncer (1).

Salmonella pertence à família Enterobacteriaceae, são bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, apresentam-se em forma de bastonetes, medem (0,7 – 1,5 x 2,0 - 5µm), não fermentam lactose, apresentam flagelos peritríquios (5) e podem ser classificadas em dois grandes grupos: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*.

Salmonella enterica apresenta seis subespécies nomeadas: *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* e *salamae*. A *S. enterica* subsp. *enterica* causa cerca de 99% dos casos de salmonelose humana (6).

Dos surtos de DTAs entre 1973 a 2001, 6.633 surtos com etiologia conhecida, 184 (3%) foram causados por *Salmonella* Heidelberg, um veículo foi identificado em 101 surtos, desses 53 surtos foram atribuídos ao consumo de aves ou ovos (7). No Brasil, desde 1962, a *Salmonella* Heidelberg tem sido identificada em aves e produtos derivados (8).

A contaminação dos alimentos por salmonela ocorre ao longo da cadeia de produção alimentar, em especial nas plantas de processamento de alimentos da indústria, devido as instalações, utensílios e equipamentos apresentam bactérias aderidas na forma de biofilmes, podendo permanecer na indústria por vários meses ou anos. Essa capacidade de manter-se no

ambiente industrial resultando em contaminação cruzada é influenciada também pelo material que compõe a superfície utilizada na planta industrial. Dentre os materiais, o mais utilizado é o aço inoxidável constituído de carbono, cromo e níquel (9).

Os biofilmes são comunidades de células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato, imersas por uma matriz de substâncias extracelulares– EPS (10). Como etapas desse processo temos a fase inicial de adesão reversível; quando as bactérias passam da forma de vida planctônica para sésil, ou seja, aderem-se. Posteriormente, ocorre a fase de formação de micro colônias com adesão irreversível e por último a fase de maturação, quando ocorre o destacamento de células planctônicas (11).

O desenvolvimento de métodos eficazes para evitar a formação e para remoção de biofilmes bacterianos nas instalações industriais, necessita de conhecimentos preliminares a respeito da dinâmica de multiplicação do microrganismo e levando em conta a influência que fatores intrínsecos e/ou extrínsecos exercem na cinética de crescimento microbiano.

A dinâmica de multiplicação é expressa por meio da curva de crescimento microbiano, apresentando as fases lag, exponencial, estacionária e declínio. A fase lag é caracterizada pelo metabolismo ativo das células, ou seja, quando as células bacterianas adquirem os nutrientes necessários para a divisão celular. As fissões binárias das células produzem um crescimento exponencial em número celular. O crescimento exponencial é limitado pelo esgotamento das reservas de nutrientes e pelo acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo microbiano. Já na fase estacionária, não ocorre aumento no número de células e a multiplicação é contrabalanceada pela morte de outras. Quando a população bacteriana entra na fase de declínio, as células morrem rapidamente (12). Nesse contexto os objetivos do trabalho foram determinar os parâmetros cinéticos, por meio da combinação de curvas de crescimento isotérmico, de *Salmonella* Heidelberg em fase planctônica e fase sésil, comparado-as com modelagens bacterianas no Pathogen Modeling Program (PMP) e no ComBase Predictor.

A presente dissertação compreende, além desta introdução, uma revisão da literatura sobre doenças transmitidas por alimento, *Salmonella* Heidelberg, biofilmes, multiplicação microbiana e um capítulo na forma de artigo científico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas. Podendo ainda ser causadas por toxinas naturais, como por exemplo, cogumelos venenosos, toxinas de algas e peixes ou por produtos químicos prejudiciais que contaminam o alimento, como chumbo e agrotóxicos (13).

Os sintomas mais comuns das DTAs são: falta de apetite, náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais e febre. Em alguns casos, afecções extra-intestinais em diferentes órgãos e sistemas como no fígado, terminações nervosas periféricas, má formação congênita dentre outros (13).

As DTAs, além do aspecto de saúde pública, são importantes, pois afetam a economia, acarretando custos elevados com hospitalizações, ausência de trabalho, perdas financeiras relativas as preocupações dos consumidores quanto a qualidade dos produtos alimentícios (14). Nos EUA foi estimado que o gasto com DTAs por ano esteja entre 10 a 83 bilhões de dólares, já na Austrália o valor é superior a um bilhão de dólares e na Nova Zelândia em torno de 86 milhões de dólares (15).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (1) estima-se que anualmente cerca de 48 milhões de pessoas adoecem, 128.000 são hospitalizados e 3.000 morrem por DTA. No Canadá a incidência varia entre 3,1 e 5,0 milhões de pessoas e na Austrália, chega a 5,4 milhões de pessoas (16, 17). No Brasil entre 2007 e 2017 ocorreram 6.632 surtos, 469.482 expostos, 118.104 doentes, 17.186 hospitalizações e 109 óbitos por doenças transmitidas por alimentos (2).

Dos alimentos mais envolvidos em surtos no Brasil, 57,1% foram ignorados; 9,3% inconclusivos; 8,3% eram alimentos mistos; 6,2% água; 3,7% ovos e produtos à base de ovos; 2,8% leite; 2,1% carne bovina e derivados; 2% doces e sobremesas; 1,9% cereais, farináceos e produtos derivados e 6,3% outros produtos (18).

Os microrganismos causadores de zoonoses de origem alimentar mais comumente encontrados segundo Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e do Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (19) são as bactérias *Campylobacter* e *Salmonella*. No

último levantamento epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil (18) foi evidenciado que entre 2007 e 2017, os principais agentes etiológicos causadores de surtos são em 95% bactérias; 7,7% vírus; 1,8 % agentes químicos e outros e 1,2% protozoários. Dentre as bactérias: *E. coli* é mais identificada, seguido de *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *C. perfringens*.

Das DTAs a salmonelose é uma das principais no mundo (20), em 2016 no Brasil ocupava o primeiro lugar (2), atualmente é a segunda mais prevalente no Brasil atrás apenas da *E. coli* (18), essencialmente pelas suas características endêmicas, alta morbidade e dificuldade para a adoção de medida de controle (21).

O controle da doença é de grande interesse para a economia dos países, em virtude dos altos custos (22), *Salmonella* spp. é responsável por cerca de 1,2 milhões de casos de doença, 23.000 hospitalizações e 450 mortes nos Estados Unidos a cada ano. Sendo a ingestão de alimento a principal fonte de contaminação em cerca de 1 milhão dos casos dessa doença (23).

O grupo de risco dessa enfermidade compreende crianças, idosos e pessoas com sistema imunológico enfraquecido. A maioria das pessoas infectadas apresentam diarreia, febre e cólicas abdominais entre 12 a 72 horas após a infecção, geralmente se recuperam completamente. Além disso, um pequeno número de pessoas com *Salmonella* spp. podem desenvolver dores nas articulações (23).

A transmissão da salmonelose para o homem é decorrente do consumo de alimentos contaminados, por transmissão pessoa a pessoa, particularmente nos hospitais, sendo menos frequente (24) ou, por contato com animais infectados (25).

Os principais alimentos envolvidos em surtos são ovos crus ou pouco cozidos; leite cru ou não pasteurizado e outros produtos lácteos; frutas e vegetais crus e produtos cárneos de aves crus ou pouco cozidos (3). A relevância da carne de frango e seus derivados sobressai em virtude do preparo inadequado e da contaminação cruzada (4). Nos EUA os surtos de origem alimentar associados a produtos frescos têm aumentado nas últimas décadas, tendo a *Salmonella* como principal patógeno (26, 27).

Independente da causa e fonte, as DTAs tem sido foco de debates e investigações, devido à apreensão mundial na busca de estratégias que permitam o controle e, garantam a produção de alimentos seguros para o consumidor.

2.2 SALMONELLA HEIDELBERG

Salmonella é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos e com formato de bastonetes curtos. A maior parte das espécies são móveis (exceto os sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), apresentam flagelos peritríquios, são capazes de fermentar glicose produzindo ácido e gás, no entanto incapazes de metabolizar a lactose e a sacarose (28). Multiplicam-se em diferentes temperaturas, apresentando temperatura ótima na faixa de 38°C (29) e a temperatura mínima de 5°C. Portanto, são mesófilos, considerados relativamente termossensíveis, sendo destruídos quando submetidos a temperatura de 60°C por 15 a 20 minutos (28).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, possuindo mais de 25 gêneros bacterianos, incluindo uma diversidade de agentes patogênicos, como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. entre outros. Jongo (30) encontrou uma diferença de apenas 10% entre as sequências de DNA dos genomas de *E. coli* e de *Salmonella enterica*, indicando a probabilidade dos dois apresentarem o mesmo ancestral há 100 milhões de anos.

A classificação contém as espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta com seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica* (28).

S. Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Javiana* e *S. Heidelberg* são os sorovares mundialmente mais associados aos surtos de salmonelose (31). Sendo *Salmonella Heidelberg* um dos sorovares de maior distribuição mundial, associados a doenças humanas (32). É o terceiro sorovar mais isolado na avicultura no Canadá e o quarto em doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos (7), no Brasil, a SH já foi identificada em aves e produtos derivados (8, 33).

2.3 BIOFILMES

Microrganismos na forma de biofilme constituem-se no modo de vida microbiana prevalente na natureza (34), conferindo-lhe importante resistência à falta de nutrientes, alterações de pH, presença de radicais livres de oxigênio, ação de antibióticos e até mesmo ao sistema imunitário humano (35).

Biofilmes são agrupamentos de células bacterianas aderidas a superfícies bióticas e/ou abióticas, envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (extracellular polymeric substances, EPS) (36).

A camada de EPS é produzida pelos próprios microrganismos durante o processo de formação de biofilme, constituída de secreções dos microrganismos ou resultante de restos celulares dos microrganismos mortos. Composta basicamente de polissacarídeos, celulose, proteínas ou DNA (Ácido Desoxirribonucleico) exógeno. Essa estrutura permite que os microrganismos se aderem em superfícies, denotando papel estrutural, responsável pela continuidade desses biofilmes na indústria de alimentos (36).

Além disso, a EPS é responsável por nutrir e permitir o abastecimento de água ao interior do biofilme as bactérias aderidas. Para além dessa característica, a matriz possibilita que o DNA seja excretado, após sua liberação quando em lise celular, para o exterior, ocasionando a diversificação da população a nível genético (35). Em resumo, a formação de biofilme confere muitas vantagens às células microbianas em um ambiente da indústria alimentícia, como resistência física, resistência mecânica e proteção química principalmente (37).

No biofilme os microrganismos comunicam-se por meio de moléculas sinalizadoras denominadas de *quorum sensing*, associadas a densidade populacional da comunidade. Para que ocorra a comunicação é necessário que exista *quorum* suficientemente alto para ser detectado pelas bactérias sendo, portanto, fundamental uma quantidade considerável de microrganismos secretando essas moléculas sinalizadoras. As regulações dessas moléculas dependem de: bioluminescência, fatores de virulência, formação de biofilmes, esporulação e reprodução (38).

Os microrganismos apresentam dentro da constituição do biofilme perfis genéticos distintos da forma planctônica. Quando são liberados em forma livre, apresentam vantagens em relação a outros microrganismos com a mesma constituição genética, cujo crescimento foi apenas em fase planctônica (35).

Portanto, células sésseis exibem características distintas das células planctônicas, resistindo mais aos métodos e agentes aplicados nos procedimentos de higienização (39, 40, 41), conseqüentemente mais resistentes a agentes antimicrobianos (42, 43, 44, 45). Em razão disso, pesquisas que avaliem o comportamento dos microrganismos em diferentes fases são essenciais para o desenvolvimento de métodos e agentes químicos eficazes de eliminação bacteriana.

2.3.1 Biofilme na Indústria de alimentos

Os biofilmes embora estejam sendo utilizados na indústria de alimentos para resolver problemas de tratamento de resíduos e de contaminações ambientais, em geral, sua relevância é atribuída a contaminação cruzada entre superfícies e alimentos. Uma vez que diversos pontos, equipamentos, materiais permitem a aderência e formação de biofilme por microrganismos.

Sendo as placas pasteurizadoras, mesas, luvas de funcionários, carcaças de animais, superfícies de contato, silos de armazenamento de matérias-primas e aditivos tubulação, material de embalagem, os principais locais para o estabelecimento de células sésseis (46).

Os biofilmes podem se formar rapidamente em ambientes da indústria de alimentos devido às falhas nos procedimentos de higienização de instalações, utensílios e equipamentos. Tornando sua eliminação um desafio, especialmente por se apresentarem mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células planctônicas (47).

A capacidade de formação de biofilme e o desenvolvimento a nível industrial é dependente da superfície utilizada nas plantas de processamento sendo, as superfícies utilizadas na produção de alimentos, como aço inoxidável, polietileno, madeira, vidro, polipropileno, borracha (48, 49). Para a utilização dessas superfícies, imprescindivelmente, precisam apresentar componentes não tóxicos, sem migração e absorção pelos alimentos, manifestar superfície lisa, dura, contínua sem fendas ou fissuras, sem deformações ou abaulamentos. Para a superfície de aço inoxidável, o material mais utilizado, as características incluem ainda: a resistência à corrosão, presença de superfícies lisas e impermeáveis, resistência a oxidação a altas temperaturas e fácil higienização. Com isso, torna-se necessário o cuidado de que, certas ligas podem ser corroídas por halogênicos (35).

O aço inoxidável utilizado é constituído de carbono, cromo e níquel, podendo se apresentar com diferentes concentrações entre os elementos. Mas as constituições mais utilizadas contem 18% de cromo e 8% níquel, formando o grupo das ligas de classe 300, por exemplo 304 e 316, os quais são resistentes à corrosão causada pelos principais agentes utilizados na higienização de superfícies (35).

Essa resistência conferida ao aço inoxidável é resultado da película protetora de óxido de cromo formado na presença de oxigênio. Além disso, distigui-se pelo acabamento da superfície, apresentando uma classificação em escala de 0 (zero), sem polimento, até 8, com espelhamento.

Ainda assim, uma variedade de estudos demonstram a capacidade de formação de biofilme na superfície de aço inoxidável (11, 40, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56).

Um importante microrganismo capaz de formar biofilme nessa superfície é *Salmonella entérica*, uma vez que expressa fatores de patogenicidade necessários para a aderência em superfícies, associado à expressão de genes e produção de matriz extracelular (57). Somado a isso, *Salmonella* tem demonstrado diminuição do perfil de sensibilidade a antimicrobianos (58, 59, 60, 61), consequência da administração demasiada de antibióticos em animais de produção, destinados a alimentação (58, 62) ou no tratamento de enfermidades em humanos. Tornando o estudo de biofilmes de *Salmonella* o foco de inúmeras pesquisas (63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 39, 73), demonstrando a preocupação da comunidade científica com a formação de biofilmes na indústria de alimentos, em razão da contaminação cruzada entre superfícies e alimentos (71).

2.3.2 Formação de Biofilme

Conceitua-se três estruturas diferentes de formação de biofilme: a estrutura tradicional do biofilme (estrutura plana e homogênea); o modelo homogêneo em mosaico (constituída por microcolônias de bactérias unidas por substâncias poliméricas extracelulares rodeadas por uma fase líquida); e a forma em cogumelo (estrutura de biofilme semelhante a um cogumelo com vários canais através dos quais passa a fase líquida) (74).

A formação do biofilme ocorre conforme as etapas apresentadas na Figura 1: adesão inicial, adesão irreversível, maturação, desenvolvimento e destacamento (75). Iniciando a formação de biofilme pelo condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; seguido do transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência; início do processo de adesão bacteriana; crescimento celular, colonização e adesão irreversível; formação de biofilme com alta atividade metabólica e liberação de células (76).

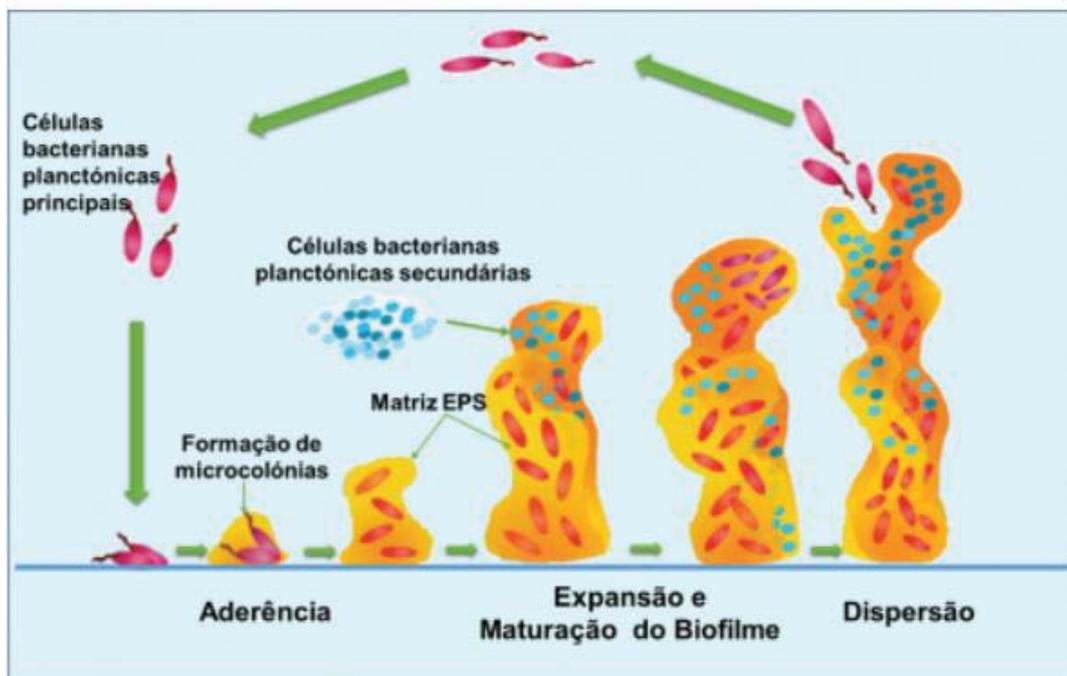


Figura 1: Fases de formação do biofilme.

Fonte: Adaptado de Tremblay et al., 2014

O processo de formação de biofilme inicia com a adesão das células planctônicas primárias, sendo controladas por interações iônicas negativas e/ou positivas entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas do biofilme que se forma a partir de resíduos do próprio ambiente. Apêndices celulares externos, como flagelos, fímbrias e pílís são fundamentais para o sucesso do processo de adesão celular inicial, formando pontes entre as células e a superfície. A fase inicial de adesão é reversível, seguida de adesão irreversível mediada pelos polímeros extracelulares. Após o contato com a superfície abiótica ou biótica, ocorre crescimento e divisão celular. Assim, se dá o pico de produção de material extracelular, ocasionando o fortalecimento das ligações entre as células e a superfície. Ao passar do tempo a adesão de outros microrganismos é facilitada, em seguida ocorre o destacamento de fragmentos do biofilme ou a liberação de células bacterianas, continuando o ciclo (78).

2.4 MULTIPLICAÇÃO MICROBIANA

O metabolismo microbiano refere-se a soma de todas as reações químicas, responsáveis pelo requerimento energético necessários para a sobrevivência dos microrganismos. Tais reações químicas são reguladas por enzimas, denominadas de catalisadoras, responsáveis por acelerar uma reação (Figura 2). Como catalisadoras, as enzimas são específicas, atuando em substâncias específicas, chamados de substratos da enzima e cada uma catalisa apenas uma reação. A enzima orienta o substrato, aumentando a probabilidade de a reação acontecer. O complexo-enzima-substrato, faz com que a colisão, seja eficiente, diminuindo a energia de ativação necessária a uma reação química (29).

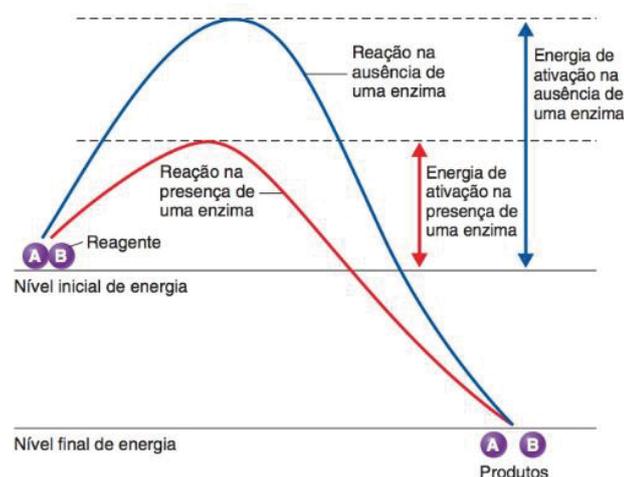


Figura 2: Ação catalisadora de enzimas em reações químicas

Legenda: Essa figura representa o progresso da reação $AB \rightarrow B + A$ tanto na ausência (linha azul) quanto na presença (linha vermelha) de enzima.

Fonte: Tortora et al, 2017.

Os fatores mais importantes que influenciam a atividade enzimática (Figura 3) são o pH, concentração do substrato, presença ou não de inibidores e temperatura. A maioria das enzimas tem um pH ótimo, permitindo a atividade máxima. A concentração do substrato interfere na ação catalisada da enzima em função da saturação. Os inibidores correspondem a substâncias que ocupam o sítio ativo de enzimas e competem com o substrato normal pelo sítio ativo. A temperatura influencia diretamente na velocidade de reação química. O aumento de temperatura aumenta a reação, entretanto altas temperaturas (acima da ótima), reduzem drasticamente as reações. A

temperatura ótima para as bactérias patogênicas, é em torno de 35°C a 40°C, temperaturas fora da faixa ótima, podem ocasionar a desnaturação de proteínas (Figura 4), perda da estrutura tridimensional, especialmente por quebras de ligações, como consequência a proteína perde a função biológica (29).

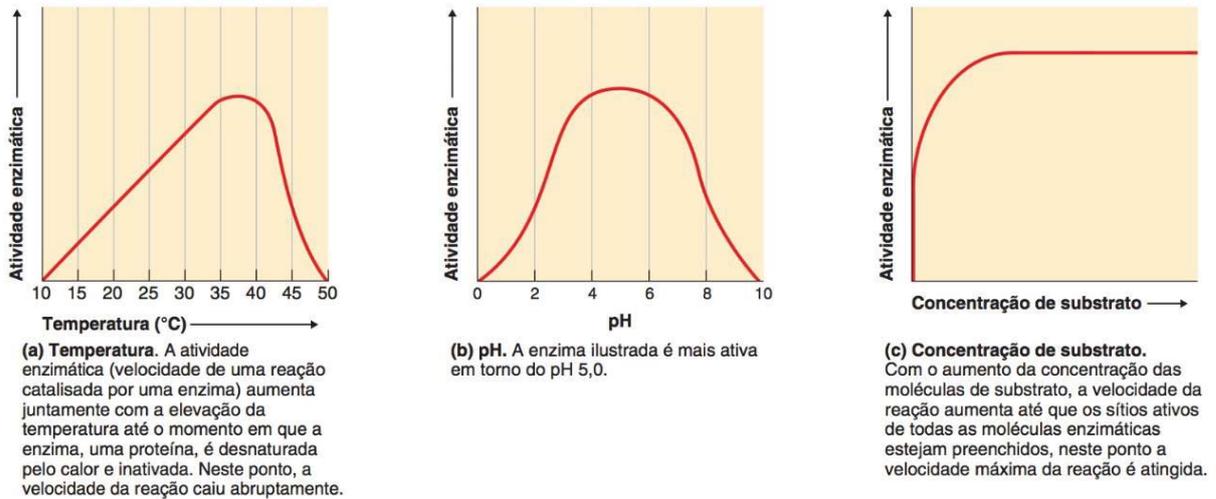


Figura 3: Fatores que influenciam a atividade enzimática.
Fonte: Tortora et al, 2017.

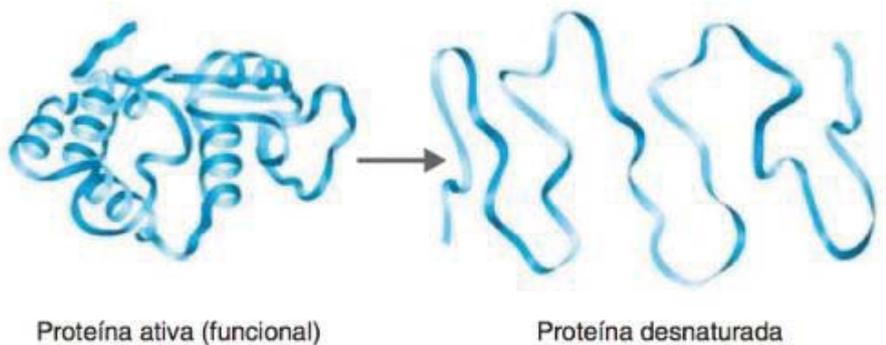


Figura 4: Desnaturaç o Proteica
Fonte: Tortora et al, 2017.

Al m disto, o crescimento microbiano ainda   influenciado por fatores intr secos e extr secos. Os fatores intr secos s o os par metros dos tecidos animais ou vegetais, que s o parte inerentes desses tecidos: atividade  gua, pH, potencial de oxirredu o e composi o qu mica. E os

parâmetros extrínsecos são aquelas propriedades do meio de armazenamento ou processamento que afetam os alimentos: temperatura, umidade relativa do ambiente e composição gasosa do ambiente (79).

Desses fatores, a temperatura é o fator essencial para o desenvolvimento e perpetuação dos microrganismos. Uma vez que microrganismos apresentam faixas de temperaturas específicas de multiplicação. À medida que a temperatura aumenta, as reações químicas e enzimáticas da célula passam a ocorrer com maior velocidade e o crescimento é acelerado (Figura 5). A temperatura máxima de crescimento representa a temperatura limite, a qual ocorre a desnaturação de um ou mais componentes celulares essenciais. Ainda, não estão bem definidos os fatores que controlam a temperatura mínima de crescimento, mas supõem-se que a membrana citoplasmática em baixas temperaturas se torna mais rígida, não permitindo o adequado suporte de nutrientes. Dado essas características, cada microrganismo apresenta uma temperatura mínima, abaixo da qual o crescimento não é possível, uma temperatura ótima, na qual o crescimento ocorre rapidamente, e uma temperatura máxima, acima da qual o crescimento torna-se impossível (80).

Assim sendo, classes térmicas de microrganismos são formados (Figura 6), variando conforme as faixas de temperaturas de crescimento microbiano, denominados de: psicotróficos, mesófilos e termófilos. Microrganismos psicotróficos apresentam o ponto ótimo situado em baixas temperaturas; mesófilos, com o ponto ótimo em temperaturas medianas; termófilos, com o ponto ótimo em altas temperaturas; e hipertermófilos, com o ponto ótimo correspondendo a temperaturas muito elevadas (80).

As taxas de crescimento em temperaturas baixas provavelmente seriam extremamente menores com o dobro do tempo. Apesar disso, se um organismo pode crescer em baixas temperaturas, apresentando um ritmo lento de multiplicação, ele ainda é capaz de se manter competitivo e sobreviver no ambiente. Por outro lado, a sobrevivência em baixas temperaturas pode também ser resultado de adaptações de proteínas “cold-chock” e crioprotetores, Proteínas cold-chock estão presentes até mesmo em *Escherichia coli* e apresentam várias funções, as quais incluem manutenção de outras proteínas em uma forma ativa sob condições de frio ou a ligação a RNAs específicos, facilitando a sua tradução. Crioprotetores são proteínas anticongelantes ou solutos específicos, que evitam a formação de cristais de gelo, responsáveis em romper a membrana citoplasmática de bactérias (80).

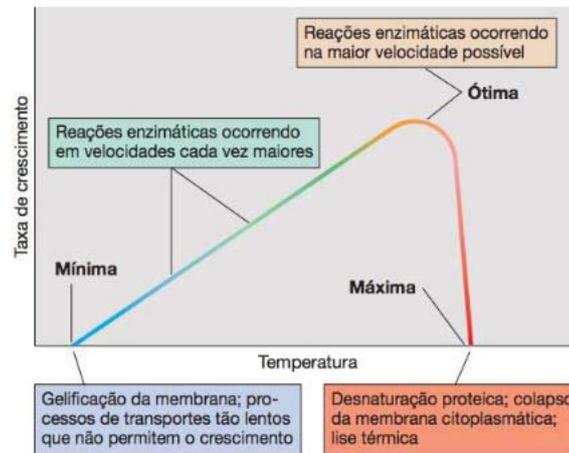


Figura 5: Velocidade de reações enzimáticas mínima, máxima e ótima.
Fonte: Madigan et al., 2016.

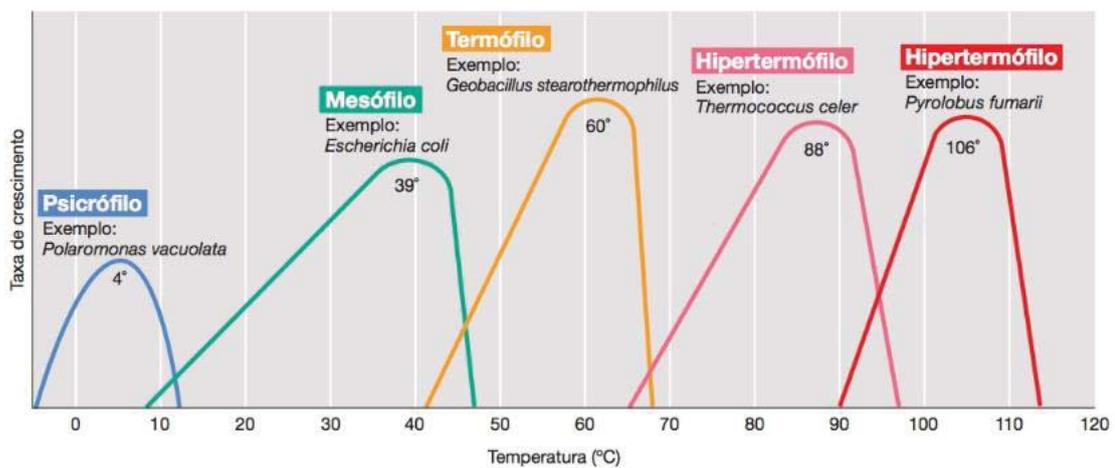


Figura 6: Relação entre temperatura e crescimento de microrganismos em diferentes classes térmicas.
Fonte: Madigan et al., 2016.

2.4.1 Crescimento populacional bacteriano

As bactérias se multiplicam por meio de fissão binária (Figura 7) onde uma célula divide-se individualmente em duas células filhas, o aumento no número da população ocorre de modo que uma única célula bacteriana, dá origem a duas células, as duas se dividem em mais quatro e assim sucessivamente, o intervalo de tempo entre cada nova geração é denominado de tempo de geração (29).

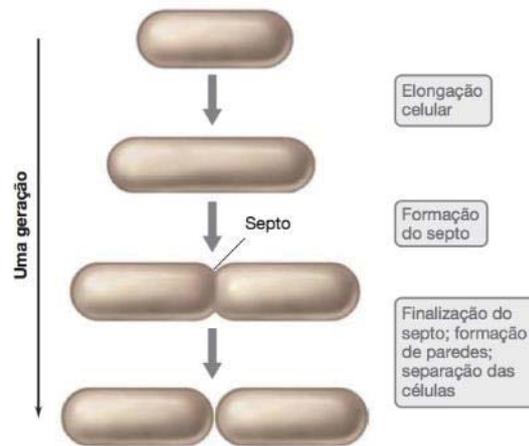


Figura 7: Fissão binária de procariontes
 Fonte: Madigan et al., 2016.

A partir das fissões binárias, bactérias multiplicam-se de forma constante durante um período de tempo. Esse aumento celular pode ser expresso matematicamente, utilizando-se uma progressão geométrica de crescimento exponencial (Fig 8). Desta forma, quando o número de células é logarítmica (\log_{10}) em função do tempo (um gráfico semilogarítmico), conforme ilustrado na Figura 9, obtém-se uma linha reta. O crescimento exponencial inicia relativamente lento, acelerando ao passar do tempo, sendo observado a taxa máxima de crescimento no estágios finais dessa fase (80).

Tempo (h)	Número total de células	Tempo (h)	Número total de células
0	1	4	256 (2^8)
0,5	2	4,5	512 (2^9)
1	4	5	1.024 (2^{10})
1,5	8	5,5	2.048 (2^{11})
2	16	6	4.096 (2^{12})
2,5	32	.	.
3	64	.	.
3,5	128	10	1.048.576 (2^{20})

Figura 8: Taxa de crescimento de uma cultura bactéria expressa em Log
 Fonte: Adaptada de Madigan et al., 2016.

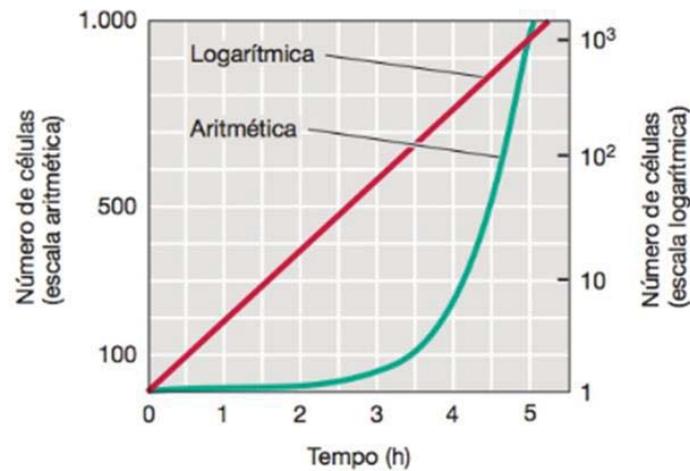


Figura 9: Curva de crescimento em fase exponencial
 Fonte: Adaptada de Madigan et al., 2016.

2.4.2 Curva de crescimento microbiano

A curva de crescimento bacteriano (Figura 10) considera o crescimento de uma população bacteriano em $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ durante um período de tempo, expressa por fases: lag; log; estacionária e declínio ou morte, descrito a seguir (29).

Na fase lag os microrganismos permanecem sem se reproduzirem por um certo período de tempo, imediatamente após serem inoculados em meio líquido. Nesse período, as células se apresentam em latência, uma vez que as populações estão enfrentando um período de intensa atividade metabólica, especialmente síntese de enzimas e de variadas moléculas.

A partir de um certo tempo, as células iniciam intensa divisão celular, entrando em um período de aumento logarítmico no número de células, atingindo um valor constante no número de gerações. Nessa fase, ocorre a maior atividade metabólica celular, ocasionando sensibilidade dos microrganismos a mudanças ambientais, afetando o seu desenvolvimento.

A fase estacionária inicia quando em um dado tempo a velocidade de crescimento bacteriano diminui, o número de células mortas, equivale ao número de células novas, uma vez que o crescimento ainda ocorre nessa fase. Essa morte celular é atribuída a diversos fatores, como o término de nutrientes, acúmulo de produtos de degradação, mudanças no pH, entre outros. Após esses eventos, especialmente de morte celular, se estabelece a última fase do crescimento microbiano, a fase denominada de declínio ou morte.

Como na fase anterior, iniciou-se o decréscimo do número de células, o que ocorre nessa fase é que número de células mortas excede o número de células novas. De modo contínuo, o número de células diminui até uma pequena fração, no entanto, podem permanecer com pequenas células viáveis indefinidamente.

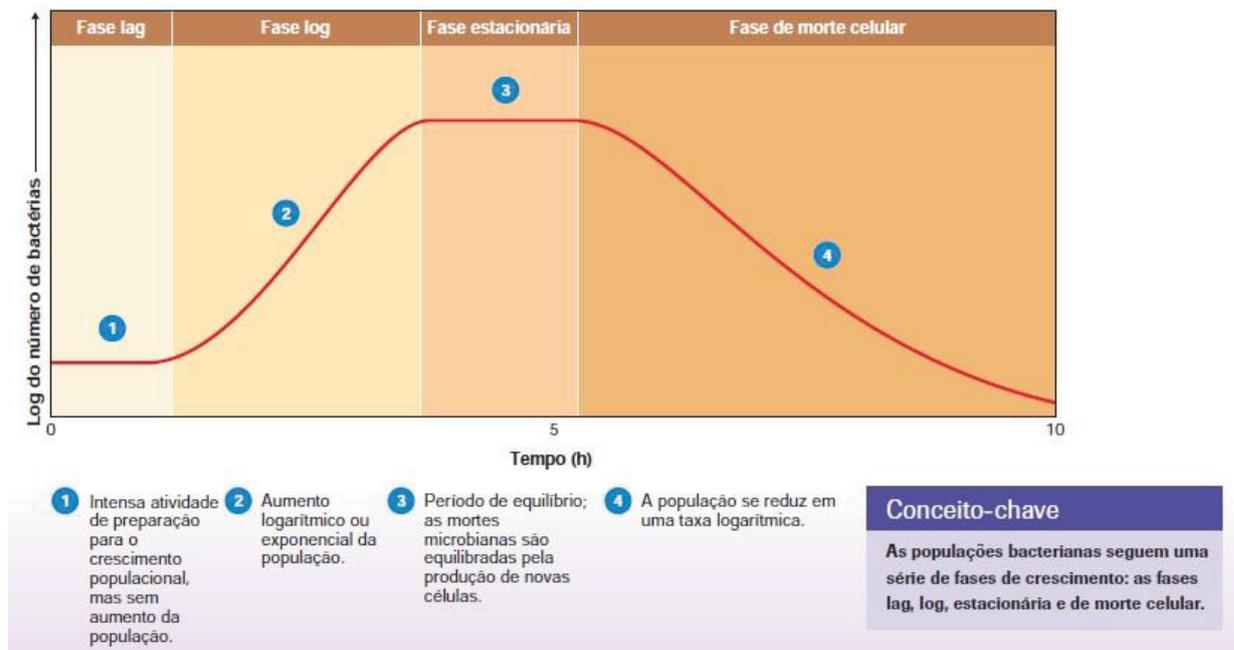


Figura 10: Curva de crescimento microbiano.
Fonte: Tortora et al., 2017.

O campo voltado para a pesquisa de bactérias importantes para a indústria de alimentos e para a saúde pública, exige o conhecimento de informações relacionadas aos microrganismos. Assim, estudos estão sendo realizados (81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89), modelando o crescimento microbiano dentro de avaliações de risco de segurança de alimentos, descrevendo a taxa de crescimento, curva de crescimento microbiana de diversos microrganismos, medindo quantitativamente a redução, buscando o entendimento das enfermidades, esclarecendo a cinética de crescimento do patógeno e comparando-a com o crescimento de outras linhagens bacterianas.

2.4.3 Microbiologia Preditiva

Para se avaliar esse crescimento uma ferramenta útil é a microbiologia preditiva. A qual vem sendo estudada e utilizada para favorecer a qualidade e a segurança microbiológica dos

alimentos. Surge como um elemento essencial à microbiologia de alimentos, contribuindo para o conhecimento do comportamento microbiano. Possibilitando assim, realizar análises de risco, avaliação de efeitos de processamentos, distribuição e estocagem na qualidade e segurança microbiológica, predição da vida útil de prateleira dos alimentos, bem como auxilia nas tomadas decisões na indústria (90).

A microbiologia Preditiva é constituída de três fases para desenvolver modelos preditivos de crescimento (91). O primeiro investiga o crescimento cinético em condições de temperaturas constantes, portanto isotérmica. O segundo prevê o efeito dos fatores extrínsecos e escolhe um modelo secundário, enquanto o terceiro ajusta os modelos primário e secundário combinando-os (92).

Os modelos terciários são constituídos por programas computacionais, os quais calculam as respostas microbianas em diferentes condições, comparando-as com seus efeitos e variações. Contribuindo para a modelagem das curvas de crescimento microbiano sob diferentes condições (90).

Para a validação dos modelos experimentais é realizado o emprego de softwares como o comBase Predictor, sendo um dos mais utilizados. Tratando-se de um conjunto de modelos de previsão de resposta de micro-organismos em função de fatores ambientais, incluindo a temperatura, pH e concentração de sal (93)

Outra ferramenta utilizada é o DMFit o qual ajusta as curvas bacterianas, onde uma fase linear é precedida e seguida por uma fase estacionária. Obtendo as estimativas de Crescimento máximo / taxa de mortalidade, Tempo de atraso, Contagem inicial de células, Contagem final de células e estimativa de erros padrão sobre esses parâmetros. (93)

Além desses, o Pathogen Modeling Program (PMP) da USDA é utilizado para prever o crescimento microbiano. Considerando as variáveis como a atmosfera (aeróbia, anaeróbia), temperatura, pH, atividade da água e, em alguns casos, nitrito e outros aditivos. As previsões são feitas para condições de temperatura estática (94).

3. ARTIGO

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *SALMONELLA* HEIDELBERG PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS

Suelen Priscila Santos^{1*}, Luciane Daroit², Christian Oliveira Reinehr³, Laura Beatriz Rodrigues²

(Artigo a ser submetido)

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.

² Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.

* Corresponding author: Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo. Campus I, Bairro São José. 99052-900 – Passo Fundo, RS, Brazil. E-mail: suelenp_@hotmail.com.

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *SALMONELLA* HEIDELBERG PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS

Resumo

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados, por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas. Dessas destaca-se a salmonelose uma doença alimentar grave causada pela bactéria *Salmonella* spp., sendo a *Salmonella* Heidelberg (SH) um dos sorovares de maior distribuição no mundo, associado a doenças humanas. A contaminação dos alimentos por salmonela ocorre principalmente por contaminação cruzada entre superfícies e alimento, uma vez, que superfícies podem apresentar bactérias aderidas na forma de biofilmes. O desenvolvimento de métodos eficazes para evitar e remover biofilmes bacterianos das instalações industriais, necessita de conhecimentos preliminares a respeito da cinética de crescimento microbiano. O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de crescimento de *Salmonella* Heidelberg planctônica e sésil mantidas a $9\pm 1^\circ\text{C}$ e $36\pm 1^\circ\text{C}$. Os resultados foram comparados com modelagens bacterianas no Pathogen Modeling Program (PMP) e no ComBase Predictor. Os resultados obtidos demonstram que a cinética de crescimento de *Salmonella* Heidelberg planctônicas e sésseis incubados nas temperaturas de $9\pm 1^\circ\text{C}$ e $36\pm 1^\circ\text{C}$ diferiram-se entre si. A temperatura de 9°C demonstrou uma influência sobre o comportamento microbiano, aumentando o tempo entre uma multiplicação e outra, diminuindo a contagem bacteriana em log por hora em baixas temperaturas. Na comparação entre a curva de crescimento de *Salmonella* Heidelberg planctônica obtida e das modelagens PMP e ComBase Predictor observa-se que, a 10°C , as modelagens apresentaram parâmetros superiores aos encontrados nesse experimento. Na temperatura de 36°C o PMP demonstrou os valores mais próximos aos encontrados na SH.

Palavras chave: *Salmonella* Heidelberg, Curva de crescimento, planctônicas, sésseis, Pathogen Modeling Program e ComBase.

Introdução

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são uma grande preocupação para a saúde pública, causando importantes doenças. Atingem a economia, acarretando custos elevados com hospitalizações, ausência de trabalho, perdas financeiras relativas as preocupações dos consumidores ⁽¹⁾ além, das barreiras comerciais impostas a países com incidência de específicos enfermidades.

A contaminação dos alimentos por Salmonela ocorre principalmente por contaminação cruzada entre superfícies e alimento. Uma vez, que instalações, utensílios e equipamentos podem apresentar bactérias aderidas na forma de biofilmes, apresentam-se mais resistentes e perpetuam-se nas plantas de processamento de alimentos.

Essa capacidade de manter-se no ambiente industrial é influenciada pelo material da superfície utilizada na planta industrial. Dentre os materiais, o mais utilizado é o aço inoxidável constituído de carbono, cromo e níquel ⁽²⁾, em diferentes concentrações desses elementos. O que usualmente utiliza-se são superfícies que contenham 18% de cromo e 8% níquel, formando o grupo

das ligas de classe 300, por exemplo 304 e 316, os quais são resistentes à corrosão causada pelos principais agentes utilizados na higienização de superfícies⁽³⁾.

Os biofilmes podem se formar rapidamente em ambientes da indústria de alimentos devido a falhas nos procedimentos de higienização de instalações, utensílios e equipamentos. Sendo formados por uma comunidade de células microbianas organizados dentro de um complexo de estruturas, aderidos a uma superfície biótica ou abiótica⁽⁴⁾, envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (extracellular polymeric substances, EPS)⁽⁵⁾. Constituem-se no modo de vida microbiana prevalente na natureza⁽⁶⁾, conferindo-lhe importante resistência à falta de nutrientes, alterações de pH, presença de radicais livres de oxigênio, ação de antibióticos e até mesmo ao sistema imunitário humano⁽³⁾.

Para avaliar esse crescimento, uma ferramenta útil é a microbiologia preditiva, que vem sendo estudada e utilizada para favorecer a qualidade e a segurança microbiológica dos alimentos, desses o Pathogen Modeling Program⁽⁷⁾ e o ComBase Predictor⁽⁸⁾ são os mais utilizados. O PMP é utilizado para prever o crescimento microbiano, considerando as variáveis como a atmosfera (aeróbia, anaeróbia), temperatura, pH, atividade da água e, em alguns casos, nitrito e outros aditivos. E o programa ComBase Predictor permite desenvolver uma previsão da resposta do microrganismo em função de fatores ambientais, além disso, o DMFit no comBase ajusta e constrói as curvas de respostas microbianas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de crescimento de *Salmonella* Heidelberg planctônica e sésil mantidas a $9\pm 1^\circ\text{C}$ e $36\pm 1^\circ\text{C}$. Os resultados foram comparados com modelagens bacterianas no Pathogen Modeling Program (PMP) da USDA e no ComBase Predictor.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e Micologia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo em Passo Fundo/RS. Foram utilizadas amostras de *Salmonella* Heidelberg previamente isoladas e gentilmente cedidas por empresas.

Os microrganismos estocados em Brain-Heart Infusion (BHI) com 20% glicerol sob congelamento, foram reativados em Brain-Heart Infusion (BHI) e a pureza verificada utilizando-se um meio de enriquecimento não seletivo, isoladas em Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD)

e incubados a 37°C. Posteriormente foram avaliados os padrões de colônias e confirmadas por bioquímica e sorológica. Após, foram estocados em Ágar Triptona Soja (TSA) inclinado.

O inóculo inicial foi preparado a partir dos estoques em Ágar TSA inclinado inoculados em placas de Agar TSA. Uma colônia isolada de cada amostra de *Salmonella* Heidelberg foi inoculada, individualmente, em Caldo Triptona de Soja (TSB) a 36±1°C por 18 a 24 horas. Em seguida, 20 µL de cada amostra foi semeado em caldo TSB e incubados a 36±1°C por 24 horas, para obtenção da cultura bacteriana fisiologicamente ativada. *Salmonella* Heidelberg foram submetidas a diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% para obtermos o inóculo inicial de 10³ para os estudos de células planctônicas e sésseis. Esta população foi verificada, em todo o experimento, por semeadura em placas contendo ágar padrão de contagem (PCA, HiMedia®).

Para o estudo da curva de crescimento de *Salmonella* Heidelberg em fase planctônica, obteve-se a um inóculo de 10³ UFC da cultura de *Salmonella* Heidelberg. Sendo adicionados a tubos, em triplicata, contendo 4,5 mL de caldo TSB sem glicose mantidos aerobicamente em incubadoras tipo B.O.D. sob temperatura de 9±1°C e 36±1°C. Nas temperaturas de 9±1°C e 36°C, os tempos verificados foram: 0 min., 01 h, 02 h, 03 h, 04 h, 06 h, 08 h, 10 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h, 144 h, 168 h e 192 h. Quando as amostras atingiram os tempos determinados de incubação, foram quantificadas pelo método de contagem em gota (Drop plate) e os resultados expressos em UFC.mL⁻¹.

No estudo da curva de crescimento de *Salmonella* Heidelberg em fase sésil os corpos de prova utilizados foram cupons de aço inoxidável AISI 316, com área de 1 cm², confeccionados nas dimensões de 1 cm de largura x 1 cm de comprimento e 0,1 cm de espessura. Os cupons passaram por procedimentos de limpeza manual com auxílio de esponja, água e detergente neutro líquido; enxague com água destilada; imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente; enxágue com água destilada e esterilização em autoclave a 121°C por 30 minutos.

Para a formação dos biofilmes, os corpos de prova foram cultivados em tubos. Foi adicionado 4,5 mL de caldo triptona de soja sem glicose e 0,5 mL das culturas individuais de cada *Salmonella* Heidelberg, com aproximadamente 10³ UFC em cada tubo.

Os corpos de prova de aço inoxidável foram imersos em culturas de microrganismo e incubados a 9±1°C e 36±1°C, os tempos verificados foram: 0 min., 01 h, 02 h, 03 h, 04 h, 06 h, 08 h, 10 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h, 144 h, 168 h, 192 h cada amostra foi quantificada^(9, 10, 11). Essas temperaturas foram certificadas através do uso de termômetros

calibrados e certificados. Todos os ensaios foram realizados com três repetições. Ao longo do experimento foram medidos o Ph e a Aw das amostras.

Nos tempos determinados, os cupons foram retirados dos meios de cultivo com o auxílio de uma pinça estéril e imersos em 5 mL de Água Peptonada 0,1% (AP, HiMedia®), por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Posteriormente, introduzidos em tubos contendo 5 mL de Água Peptonada 0,1% e sonicados por 10 minutos em banho de ultrassom (frequência de 40 kHz e potência de 81 W) para desadesão de células sésseis^(11, 12).

Diluições apropriadas foram transferidos para placas de Petri contendo meio PCA para contagem total de microrganismos e utilizado o método de contagem em gota (Drop plate), inoculando cinco gotas de 10µL de cada diluição, com leitura após 24 horas de incubação a 37°C. Para determinar o resultado foi aplicada a fórmula: $\text{UFC.cm}^{-2} = (\text{VD/VA}).\text{Av.D/A}$, como segue: VD: volume do diluente usado no enxágue (5 mL), VA: volume da alíquota usada no plaqueamento (0,05 mL ou 0,1 mL), Av: média da contagem obtida nas placas (UFC), D: diluição usada na contagem, A: área do cupom (2 cm²), expresso em $\log_{10}.\text{UFC.cm}^{-2}$ ⁽¹³⁾.

As curvas de multiplicação de *Salmonella* Heidelberg foram construídas no programa ComBase Predictor, por meio do DMFit sendo ajustado as curvas bacterianas em função de diferentes modelos (Baranyi e Roberts, modelos bifásicos). Essas curvas foram comparadas com curvas de crescimento de *Salmonella* spp. realizadas por modelagem bacteriana obtidas pelo Pathogen Modelling Program, do United States Department of Agriculture (USDA), versão 6.1. e pelo ComBase para o crescimento de *Salmonella* spp. Nesses programas foram inseridas condições semelhantes aos utilizados nesse experimento, incluindo a dose inicial de 10³ UFC; pH de 7,8; Aw de 0,997 e temperaturas de 10°C e 36°C.

O tempo médio de geração e a velocidade específica de crescimento foram realizados com os dados experimentais através das seguintes equações⁽¹⁴⁾:

Tempo médio de geração (G)

$$G = \frac{t}{3.322(\log N_i - \log N_f)}$$

Onde: t = tempo transcorrido (em minutos) Ni = número inicial de células (em UFC.mL⁻¹) Nf = número final de células (em UFC.mL⁻¹)

Velocidade específica de crescimento (µ)

$$\mu = \frac{1nN_t - 1nN_i}{t}$$

Onde: t = tempo transcorrido (em minutos) N_i = número inicial de células (em UFC.mL⁻¹) N_f = número final de células (em UFC.mL⁻¹).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Resultados e Discussão

Para a determinação das fases da curva de multiplicação bacteriana utilizou-se a análise estatística pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) e a curva de crescimento realizada a partir das médias das repetições. As contagens de células planctônicas e sésseis incubados nas temperaturas de $9 \pm 1^\circ\text{C}$ e $36 \pm 1^\circ\text{C}$ diferiram-se entre si.

Na fase planctônica entre as diferentes temperaturas, somente os tempos de 0, 1 e 2 horas não apresentaram diferenças estatísticas, enquanto que para células sésseis a partir de 1 hora de incubação já demonstraram diferenças entre as médias. As células planctônicas a 36°C apresentaram diferença a partir do tempo de 4 horas, dando início a fase de multiplicação exponencial. Quando na temperatura de $9 \pm 1^\circ\text{C}$ as médias evidenciam variações, não ficando esclarecido o momento exato da transição entre fase lag e exponencial. Desse modo, visualiza-se uma tendência de fase exponencial entre os tempos 144 horas e 156 horas.

Além disso, a cinética de crescimento de SH incubado $9 \pm 1^\circ\text{C}$ e $36 \pm 1^\circ\text{C}$ foram diferentes para o estudo de células planctônicas e sésseis, explicito nas curvas de multiplicação construídas no programa comBase Predictor, por meio do DMFit. Esse programa permitiu ajustar as curvas bacterianas em função de diferentes modelos (Baranyi e Roberts, modelos bifásicos). Os parâmetros de crescimento encontrados neste experimento para células planctônicas foram comparados com o crescimento de *Salmonella* spp. “in raw ground beef” modelado pelo programa Pathogen Modelling Program-PMP e pelo ComBase para o crescimento de *Salmonella* “in egg”. As células sésseis não foram comparadas aos programas, pois não há informação de curvas de crescimento obtidas a partir de biofilmes bacterianas, além de poucos trabalhos estudando sistematicamente a formação de biofilme por períodos de incubação prolongados.

A curva de crescimento de células planctônicas de *Salmonella* Heidelberg a 36°C apresenta tempo médio de geração (G) de 1,05 horas e velocidade específica de crescimento (μ) de 0,66 log/h, fase lag com duração de 2 horas, atingindo o ponto máximo de crescimento exponencial com 24

horas de incubação. Na modelagem pelo PMP a 36°C, o tempo médio de geração (G) é de 1,11 horas e velocidade específica de crescimento (μ) de 0,62 log/h, duração da fase Lag é de 1,1 h, com fase exponencial de 23,9 horas de duração. Na modelagem no ComBase a 36°C, o tempo médio de geração (G) é de 1,92 horas e velocidade específica de crescimento (μ) de 0,36 log/h, duração da fase exponencial de 34 horas.

A curva de crescimento de células planctônicas de *Salmonella* Heidelberg a 9±1°C exibe o tempo médio de geração (G) de 3,46 horas e velocidade específica de crescimento (μ) de 0,20 log/h, duração de fase lag de 144 horas e 12 horas de fase exponencial. Na modelagem pelo PMP a 10°C, o tempo médio de geração (G) é de 7,37 horas e velocidade específica de crescimento (μ) de 0,094 log/h, a fase lag apresenta 15,6 horas de duração e a exponencial 154,4 horas. Na modelagem no ComBase a 10°C, o tempo médio de geração (G) é de 11,55 horas e velocidade específica de crescimento (μ) de 0,06 log/h, com duração da fase exponencial de 198 horas.

A curva de crescimento de células sésseis de *Salmonella* Heidelberg a 36±1°C expressa o tempo médio de geração (G) de 0,42 horas e velocidade específica de crescimento (μ) de 1,65 log/h, sem fase lag, com fase exponencial de 8 horas de duração, fase estacionária com 148 horas, seguido de declínio. Para a curva de crescimento das células sésseis incubadas a 9±1°C, o tempo médio de geração (G) é de 2,16 horas e velocidade específica de crescimento (μ) de 0,32 log/h.

Observa-se (Tabela 1) que as SH planctônicas e sésseis apresentam os tempos de geração maiores e velocidades específicas menores na temperatura de 9±1°C. Nas temperaturas de 9±1°C e 36±1°C, os tempos de gerações foram maiores e as velocidades específicas menores para células planctônicas do que as sésseis. Provavelmente, por que células sésseis apresentam taxas de crescimento inferiores do que bactérias em suspensão⁽³⁾.

Tabela 1: Tempo médio de geração e velocidade específica de crescimento de *Salmonella* Heidelberg planctônica e sésseis.

Parâmetros	Planctônicas		Sésseis	
	9±1°C	36±1°C	9±1°C	36±1°C
G (h)	3,46	1,05	2,15	0,42
μ(log/h)	0,20	0,66	0,32	1,65

Legenda: O parâmetro G representa o tempo de geração em horas e o μ a velocidade específica de crescimento em log por hora.

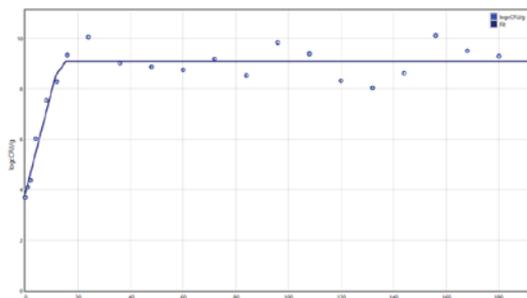
Dessa maneira, a temperatura teve uma influência considerável sobre o comportamento microbiano, aumentando o tempo entre uma multiplicação e outra, diminuindo a contagem bacteriana em log por hora em baixas temperaturas. Esse comportamento é resultado de alterações nas reações químicas que acontecem no metabolismo microbiano, responsáveis pelos requerimentos energéticos necessários a sobrevivência. Tais reações químicas são reguladas por enzimas catalisadoras, que em temperaturas baixas diminuem sua atividade biológica. Resultando em taxas de crescimento com o dobro do tempo do que em condições de temperatura ótima de desenvolvimento⁽¹⁵⁾. Sendo assim, destaca-se que se uma célula microbiana consegue se multiplicar em baixas temperaturas, mesmo em um ritmo lento de multiplicação, ela ainda representa um risco a saúde da população.

Dentro da cinética de multiplicação, a fase de declínio ou morte dos microrganismos é resultado da queda brusca no número de células viáveis, devido ao esgotamento de nutrientes do meio de cultura e pelo aumento dos produtos tóxicos resultante do próprio metabolismo microbiano. Portanto, mesmo ocorrendo a redução da contagem bacteriana, algumas células permanecem viáveis, passíveis de adaptação e recuperação. Já que dependendo do microrganismo, esse pode ser tolerante e resistir a condições extremas, conseqüentemente, pode não ser eliminado⁽¹⁶⁾.

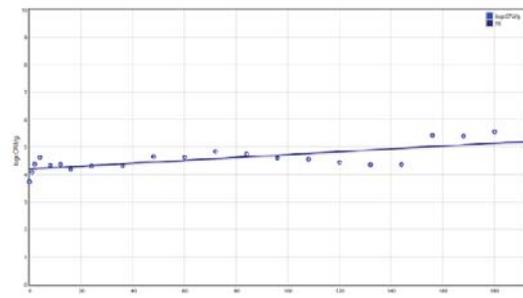
A curva de crescimento de *Salmonella* Heidelberg se demonstrou diferente em função da temperatura e das fases planctônicas e sésseis (Figura 1). As células sésseis apresentam maior fase lag e exponencial quando mantidos a 9±1°C, enquanto que a maior fase estacionária é expressa a

$36\pm 1^\circ\text{C}$. Para células planctônicas a maior fase lag é na temperatura de $9\pm 1^\circ\text{C}$ e fase exponencial mais acentuada a 36°C . Desse modo, a temperatura de $9\pm 1^\circ\text{C}$ teve influência na duração da fase lag, fazendo com que as células bacterianas passassem maior tempo a adquirirem os nutrientes necessários para a divisão celular. Por outro lado, a temperatura de $36\pm 1^\circ\text{C}$ influenciou a fase exponencial de células planctônicas, resultado da temperatura ótima em que as células bacterianas iniciam as fissões binárias produzindo um crescimento exponencial em número celular intenso.

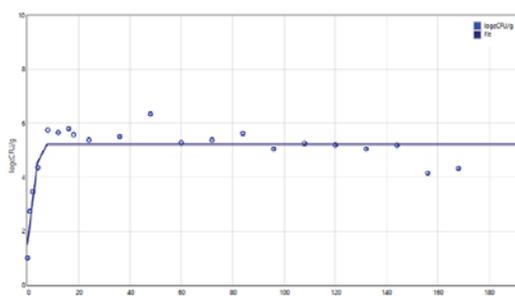
Na comparação do tempo médio de geração e velocidade específica de crescimento de *Salmonella* Heidelberg planctônica e *Salmonella* spp das modelagens no Pathogen Modelling Program e ComBase Predictor (Tabela 2). Observa-se que a 10°C as modelagens apresentaram parâmetros superiores aos encontrados nesse experimento. Na temperatura de 36°C o PMP demonstrou os valores mais próximos aos encontrados na *S. Heidelberg*. Desse modo, as modelagens realizadas no ComBase apresentaram diferentes previsões de resposta microbiana com os parâmetros obtidos nesse estudo.



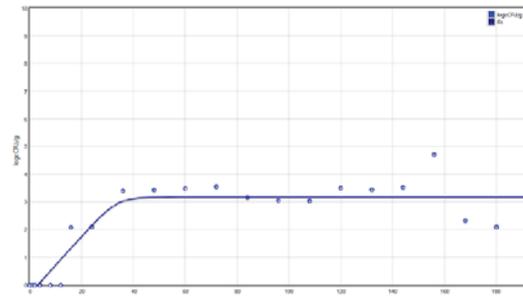
Salmonella Heidelberg planctônica a $36\pm 1^\circ\text{C}$



Salmonella Heidelberg planctônica a $9\pm 1^\circ\text{C}$



Salmonella Heidelberg sésseis a $36\pm 1^\circ\text{C}$



Salmonella Heidelberg sésseis a $9\pm 1^\circ\text{C}$

Figura 1: Curvas de crescimento de *Salmonella* Heidelberg planctônicas e sésseis a $36\pm 1^\circ\text{C}$ e $9\pm 1^\circ\text{C}$.

Legenda: Os pontos representam os dados inseridos no DMFIT do programa Combase e a linha o ajustado das curvas bacterianas em função de diferentes modelos (Baranyi e Roberts, modelos bifásicos) predito no programa.

Fonte: ComBase, 2018.

Tabela 2: Comparação do tempo médio de geração e velocidade específica de crescimento de *Salmonella* Heidelberg (SH) planctônica e *Salmonella* spp das modelagens no Pathogen Modelling Program e ComBase Predictor.

Parâmetros	SH planctônica*		PMP**		ComBase**	
	9±1°C	36±1°C	10°C	36°C	10°C	36°C
G (h)	3,46	1,05	7,37	1,11	11,55	1,92
μ (log/h)	0,20	0,66	0,094	0,62	0,06	0,36

Legenda: O parâmetro G representa o tempo de geração em horas e o μ a velocidade específica de crescimento em log por hora.

* *Salmonella* Heidelberg (SH) planctônica

** Modelagens no Pathogen Modelling Program de *Salmonella* spp.

*** Modelagens no ComBase de *Salmonella* spp.

A dose infectante de *Salmonella* para humanos varia entre 10^6 e 10^8 UFC, uma vez que depende do estado imunológico e do grau de resistência do hospedeiro⁽¹⁷⁾. Neste estudo, a dose infectante (Tabela 3) foi alcançada para SH planctônicas a 36±1°C após 4 horas de incubação, mantendo-se em faixas superiores a 10^8 UFC ao longo do experimento. Na modelagem pelo PMP as células planctônicas a 36°C atingiram a dose infectante com 5 horas e na modelagem no ComBase a 36°C foi com 16,4 horas. Quando a 9±1°C as SH planctônicas não atingiram as doses infectantes, mas na modelagem pelo PMP, a partir de 64 horas obteve-se 10^6 , entretanto, na modelagem pelo ComBase a 10°C, a dose 10^6 foi obtida com 93,8 horas. Para as SH sésseis a 36±1°C chegou-se a dose máxima de 10^6 com 60 horas de incubação, enquanto que as SH sésseis a 9±1°C não atingiram as doses infectantes.

Tabela 3: Tempo de alcance *Salmonella* Heidelberg (SH) planctônica e *Salmonella* spp das modelagens no Pathogen Modelling Program e ComBase Predictor para alcançar a dose infectante de *Salmonella* para humanos varia entre 10^6 e 10^8 UFC.

Parâmetros	SH planctônica*		PMP**		ComBase**	
	9±1°C	36±1°C	10°C	36°C	10°C	36°C
Dose infectante 10⁶ a 10⁸ UFC	Não atingiu	≥ 4 h	≥ 64 h	≥ 5 h	≥ 93,8h	≥ 16,4 h

Legenda: *Modelagem de *Salmonella* Heidelberg (SH) planctônica.

** Modelagens no Pathogen Modelling Program de *Salmonella* spp.

*** Modelagens no ComBase de *Salmonella* spp.

Desta forma, a dose infectante de *Salmonella* spp foi alcançada em temperatura de 36°C, como corroborado com as modelagens de *Salmonella* realizados no PMP e ComBase. Ratificando o risco de salmonelose pelo consumo de alimentos mantidos em temperatura ambiente. Por outro lado, as baixas temperaturas de 9±1°C, usualmente empregada na refrigeração como método de conservação e controle microbiano foram eficientes para evitar que a SH alcançasse as doses infectantes, ao contrário dos resultados obtidos nas modelagens bacterianas.

Conclusão

A cinética de crescimento de *Salmonella* Heidelberg foi influenciada pela temperatura, apresentando tempo médio de geração e fases da curva de crescimento distintos, com diferença entre as formas de vida planctônicas e sésseis. Os parâmetros obtidos nesse estudo, quando comparados com as modelagens demonstraram que no ComBase Predictor a 10°C, as modelagens apresentaram parâmetros superiores aos encontrados nesse experimento e a 36°C o PMP demonstrou os valores mais próximos aos encontrados na SH. Desse modo, os resultados ratificam a importância da manipulação e conservação de alimentos em baixas temperaturas, controlando a taxa de multiplicação bacteriana, especialmente de microrganismos patogênicos, que mesmo em doses baixas podem alcançar doses infectantes e causar danos a saúde do consumidor.

Agradecimento

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa CAPES e a Universidade de Passo Fundo.

Referências

1. ZENG D, CHEN Z, JIANG Y, XUE F, Li B. Avanços e Desafios na Detecção de Viabilidade de Agentes Patogênicos de Alimentos. *Frente. Microbiol.* 2016; 7:1833.
2. ANDRADE N.J. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Editora Varela, 2008.
3. AZEVEDO NF, CERCA N. Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria (1. ed.). Portugal: Publindústria Edições Técnicas. 2012.
4. COSTERTON JW, STEWART OS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1318-22.
5. SAUER K RICKARD AH, DAVIES DG. Biofilms and biocomplexity. *Microbe, Washington,* 2007 Jul;2(7):347-353.
6. NIKOLAEV YA, PLAKUNOV VK. Biofilm: “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology.* 2007 Apr;76(2):125-138.
7. PATHOGEN MODELING PROGRAM. USDA ARS Eastern Regional Research Center. Disponível em: <<https://pmp.errc.ars.usda.gov/tutorial.aspx>>. Acesso em: 16 maio 2018.
8. COMBASE PREDICTOR, 2018. Disponível em: <http://modelling.combase.cc/ComBase_Predictor.aspx>. Acesso em: 16 maio 2018.
9. ROSSONI EMM, GAYLARDE CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J Food Microbiol.* 2000 Oct 1;61(1):81-5.
10. KUSUMANINGRUM HD, RIBOLDI G, HAZELEGER WC, BEUMER RR. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int J Food Microbiol.* 2003 Aug 25;85(3):227-36.
11. WEBBER B, POTTKER ES, OLIVEIRA AP, ORSATO J, DAROIT L, SANTOS LR, RODRIGUES LB. *Salmonella* Enteritidis Em Polietileno Sob Diferentes Temperaturas E Tratamentos Para Remoção De Biofilmes. In: IX Simpósio de Alimentos, 2015, Passo Fundo, RS. Anais do IX Simpósio de Alimentos. 2015; 9: 1-6.
12. SCHERBA G, WEIGEL RM, O'BRIEN JR., W. D. Quantitative assessment of the germicidal efficacy as ultrasonic energy. *Appl Environ Microbiol.* 1991 Jul; 57(7): 2079–2084.
13. GIBSON H, TAYLOR JH, HALL KE, HOLAH JT. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J Appl Microbiol.* 1999 Jul;87(1):41-8.
14. PELCZAR MJ. et al. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações.* Vol. 1. 2ª. Ed. Makron Books, 1997.
15. TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. *Microbiologia.* 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

16. YENI F, YAVAŞ S, ALPAS H, SOYERY. Most Common Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce: A Review of Recent Outbreaks, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016; 56(9):, 1532-1544.
17. HUMPHREY TJ. *Salmonella*, stress responses and food safety. *Science and Society*. 2004; 2: 504-509.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que:

- a) As curvas de crescimento de *Salmonella* Heidelberg planctônicas e sésseis foram diferentes, apresentando duração de fases, tempo médio de geração e velocidades específicas de crescimento distintas.
- b) A curva de crescimento de células sésseis apresenta maior fase lag e exponencial quando mantidos a $9\pm 1^\circ\text{C}$, enquanto que a maior fase estacionária é expressa a $36\pm 1^\circ\text{C}$.
- c) As células planctônicas demonstraram maior fase lag na temperatura de $9\pm 1^\circ\text{C}$ e maior fase exponencial a 36°C .

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste experimento são de fundamental relevância devido à possibilidade de permanência de *Salmonella* Heidelberg nas superfícies industriais na forma de biofilme. Constatando-se que o tempo de permanência em fase lag antecedendo o início do crescimento em fase exponencial foi maior nas temperaturas baixas, usualmente empregadas para controle microbiano. Além disso, o comportamento distinto das células planctônicas e sésseis demonstram que os métodos e substâncias utilizadas para o controle de microrganismos testados em células planctônicas podem não ser eficazes no combate de células sésseis. Dessa maneira, o conhecimento das fases da curva de crescimento permite a indústria estabelecer os procedimentos de sanitização com maior precisão, tomando como base o tempo máximo permitido entre as higienizações sem que se inicie o crescimento exponencial bacteriano.

Por isso, tais resultados impulsionam novas pesquisas incluindo a construção das curvas de crescimento na presença de métodos de controle como bacteriófagos, óleos essenciais, métodos alternativos de sanitização como água eletrolisada, radiação ultravioleta, permitindo o estudo da influência desses métodos nas fases e nos parâmetros de crescimento microbiano.

6. REFERÊNCIAS

1. Center for Disease Control and Prevention. Burden of Foodborne Illness: Overview, 2018. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/foodborneburden/estimates-overview.html>>. Acesso em: 03 jul. 2018.
2. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2016. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta---o-Surtos-DTA-2016.pdf>> Acesso em: 03 jun. 2018.
3. Food and Drug Administration. Get the Facts about *Salmonella*!, 2017. Disponível em: < <https://www.fda.gov/animalveterinary/resourcesforyou/animalhealthliteracy/ucm509766.htm#people>>. Acesso em: 20 out. 2017.
4. Colla FL, Rodrigues LB, Borsoi A, Dickel EL, Nascimento VP, Santos LR. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 2012 out-dez; 79(4):603-606.
5. Levinson W, Jawetz E. Microbiologia médica e imunologia. 7 ed. Porto Alegre. Artmed. 2005. p. 133 – 136.
6. Lan R, Reeves PR, Octavia S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol* 2009 Sep;9(5):996–1005.
7. Chittick P, Sulka A, Tauxe RV, Fry AM. Summary of National Reports of foodborn outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. *Journal of Food Protection*. 2006 May;69(5):1150-3.
8. Hofer E, Silva-Filho SJ, Reis EMF. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 1997 Apr;17(2):55-62.
9. Andrade N.J. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Editora Varela, 2008.
10. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002 Apr;15(2):167-93.
11. Boari CA, Alves MP, Tebaldi VMR, Savian TV, Piccoli RH. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*. 2009 out-dez; 29(4): 886-895.
12. Quinn PJ. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.470.

13. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos. 2017. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>>. Acesso em: 25 jun. 2018.
14. Zeng D, Chen Z, Jiang Y, Xue F, Li B. Avanços e Desafios na Detecção de Viabilidade de Agentes Patogênicos de Alimentos. Frente. Microbiol. 2016; 7 : 1833.
15. McLinden T, Sargeant JM, Thomas MK, Papadopoulos A, Fazil A. Custos componentes de doenças transmitidas por alimentos: uma revisão de escopo. BMC Public Health. 2014;
16. Keerthirathne TP, Ross K, Fallowfield H, Whiley H. A Review of Temperature, pH, and Other Factors that Influence the Survival of *Salmonella* in Mayonnaise and Other Raw Egg Products. Pathogens. 2016 Nov 18;5(4).
17. Rohde A, Hammerl JA, Al Dahouk S. Detecção de zoonoses bacterianas transmitidas por alimentos por hibridação in situ por fluorescência. Controle de Alimentos. 2016; 69 : 297–305.
18. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2017. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>> Acesso em: 03 jun. 2018.
19. Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (CEPCD) Relatório da União Europeia sobre as tendências e fontes de zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de origem alimentar em 2016. EFSA, J. 2017.
20. Lourenço MCS, Reis EFM, Valls R. *Salmonella* entérica subsp houtenae sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2004 Jun; 46(3):169-170.
21. Guerin PJ, Vold LAA, Viltstrand P. Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: a case study in Norway. Euro Surveill. 2005 Mar;10(3):48-50.
22. Taitt CR, Shubin YS, Angel R. Detection of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium by using a Rapid, Array-Based Immunosensor Appl Environ Microbiol. 2004 Jan;70(1):152-8.
23. Center for Disease Control and Prevention. *Salmonella*, 2018a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/Salmonella/index.html>>. Acesso em: 01 jun. 2018.
24. Pinto UM, Cardoso RR, Vanetti MCD. Detecção de Listeria, *Salmonella* e Klebsiella em serviço de alimentação hospitalar. Revista de Nutrição. 2004 Jul-Sept; 17(3):319-326.
25. Wells SJ, Fedorka-Cray PJ, Dargatz DA. Faecal shedding of *Salmonella* spp. By dairy cows on farm and at cull cow markets. Journal of Food Protection 2001; 64(1):3-11

26. Tauxe R, Kruse H, Hedberg C, Potter M, Madden J, Wachsmuth K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce - a preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic Criteria for Foods. *J Food Prot.* 1997 Nov;60(11):1400–8.
27. Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe RV. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J J Food Prot.* 2004 Oct;67(10):2342-53.
28. Forsythe SJ. *Microbiologia da segurança alimentar.* Porto Alegre, Brazil: Artmed, p.410; 2002.
29. Tortora GJ, Funke Br, Case CL. *Microbiologia.* 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
30. Jong HK, Parry CM, Poll TVD, Wiersinga WJ. Host-pathogen interactions in invasive Salmonellosis. *PLOS Pathogens.* 2012 Oct;8(10):1-5.
31. Robinsom, S. The Big Five: Most Common *Salmonella* Strains in Foodborne Illness Outbreaks. *Food Safety News,* 2013. Disponível em: <<http://www.foodsafetynews.com/2013/08/the-five-most-common-Salmonella-strains/#.UsbJ5dJDunI>>. Acesso em 03 jan. 2018.
32. Grimont PAD, Weill FX. *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars.* WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella.* France: Institute Pasteur, 2007.
33. Nascimento VP, Oliveira JD, Ribeiro AR, Santos LR dos, Cardoso MO, Pontes AP, Silva AB da, Rocha SLS. Identificação de sorovares de *Salmonella* em cortes e carcaças de frango. In: Congresso brasileiro de microbiologia, 1997, Rio de Janeiro, RJ. *Anais.* Rio de Janeiro: 1997:287-287.
34. Nikolaev YA, Plakunov VK. Biofilm: “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology.* 2007 Apr;76(2):125-138.
35. Azevedo NF, Cerca N. *Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria (1. ed.).* Portugal: Publindústria Edições Técnicas. 2012.
36. Sauer K Rickard AH, Davies DG. Biofilms and biocomplexity. *Microbe,* Washington, 2007 Jul;2(7):347-353.
37. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016 Aug 11;14(9):563-75.

38. Wang, C.; Yan, C.; Fuqua, C.; Zhang, L. H. Identification and characterization of a second quorum-sensing system in *Agrobacterium tumefaciens* A6. *Journal of bacteriology*. 2014;196(7):1403-1411.
39. Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol*. 2001 Mar 20;64(3):367-72.
40. Moretro T, Vestby LK, Nesse LL, Storheim SE, Kotlarz K, Langsrud S. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *J Appl Microbiol*. 2009 Mar;106(3):1005-12.
41. Wong HS, Townsend KM, Fenwick SG, Trengove RD, O'Handley RM. Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella* Typhimurium biofilms to disinfectants. *J Appl Microbiol*. 2010 Jun;108(6):2222-8.
42. Papavasileiou K, Papavasileiou E, Tseleni-Kotsovili A, Bersimis S, Nicolaou C, Ioannidis A, Chatzipanagiotou S. Comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms of *Salmonella* enterica strains isolated from children with gastroenteritis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2010 Nov;29(11):1401-5.
43. Tabak M, Scher K, Chikindas ML, Yaron S. The synergistic activity of triclosan and ciprofloxacin on biofilms of *Salmonella* Typhimurium. *FEMS Microbiology Letters*, 2009 Nov;301(1):69-76.
44. Majtan J, Majtanova L, Xu M, Majtan V. In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium isolated in Slovakia. *Journal of Applied Microbiology*. 2008 May;104(5):1294–1301.
45. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2002 Apr; 66(2): 86–92.
46. Camargo AC, Woodward JJ, Call DR, Nero LA. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian Scenario. 2017 Nov;14(11):623-636.
47. Simões M, Vieira MJ. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. *Proceedings of the international conference processes in biofilms: fundamentals to applications*. Davis: CRC. 2009:58-62.
48. Abdallah M, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib N.-E. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol*. 2014 Jul;196(7):453-72

49. Colagiorgi A, Bruini I, Di Ciccio PA, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. (2017). *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens*. 2017 Sep 4;6(3).
50. Ramesh N, Joseph SW, Carr LE, Douglass LW, Wheaton F. Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. *Poult Sci*. 2002 Jun;81(6):904-10.
51. Pan Y, Breidt F, Kathariou S. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Dec;72(12):7711-7.
52. Giaouris ED, Nychas GJ. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*. 2006 Dec;23(8):747-52.
53. Chia TWR, Goulter RM, Mcmeekin T, Dykes GA, Fegan N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food microbiology*. 2009 Dec;26(8):853-9.
54. Gião MS, Keevil CW. Hydrodynamic shear stress to remove *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel and polytetrafluoroethylene surfaces. *J Appl Microbiol*. 2013 Jan;114(1):256-65.
55. Vivian, R. C. Avaliação da formação de biofilme e sensibilidade ao ácido peracético por *Salmonella* spp. Isolada de abatedouro avícola. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2014.
56. Šilňhová-Hrušková L, Mořková P, Šilňha D, Vytřasová J. Detection of biofilm formation by selected pathogens relevant to the food industry. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne*. 2014;64(3):169-175.
57. Milan C, Timm CD. Fatores de virulência associados à formação de biofilme por *Salmonella enterica*: minirrevisão. *Science and Animal Health*. 2015 Jan-Jun;3(1):94-104.
58. Cruchaga S, Echeita A, Aladueña A, García-Peña J, Frias N, Usera MA. Antimicrobial resistance in *Salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998. *J. J Antimicrob Chemother*. 2001 Mar;47(3):315-21.
59. Nielsen, B.; Mogelmoose, V.; Sorensen, L.L. et al. Tracing back multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 from pork at the slaughterhouse to a specific swine herd by strategical use of serology and culture. In: *International Symposium On The Epidemiology And Control Of Salmonella In Pork*, 3., 1999, Washington. *Proceedings*. Washington, 1999:261-263.

60. Parry CM. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Oct;16(5):467-72.
61. Parry CM, Threlfall EJ. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal *Salmonellae*. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Oct;21(5):531-8.
62. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents*. 2001 Jun;17(6):431-7.
63. Cabarkapa I, Marija Š, Jovanka L, Bojana K, Nevena B, Dubravka M, Ljiljana S. Biofilm Forming Ability Of *Salmonella* Enteritidis In Vitro, *Acta Veterinaria*. 2015 Sep; 65(3), 371-389.
64. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*. 2012 Mar;45(2):502–531.
65. Milan C, Agostinetti A, Conceição RCS, Gonzalez HL, Timm CD. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2015 Mar-Apr; 67(2):642-646.
66. Ahmad I, Wigren E, Le Guyon S, Vekkele S, Blanka A, El Mouali Y, et al. The EAL-like protein STM1697 regulates virulence phenotypes, motility and biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol*. 2013;90(6):1216–1232.
67. Soni KA, Oladunjoye A , Nannapaneni R , MW de Schilling , Silva JL , Mikel B , Bailey RH . Inhibition and inactivation of *Salmonella* typhimurium biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. *J Food Prot*. 2013 Feb;76(2):205-12.
68. Tondo EC1, Machado TR, Malheiros Pda S, Padrão DK, de Carvalho AL, Brandelli A. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. *Braz J Microbiol*. 2010 Oct;41(4):1027-37.
69. Rodrigues LB, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP, Trenhago G, Rodegheri SC, Taglieti RM, Dickel EL, Nascimento VP. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilmes em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(3): 225-230, 2009.
70. Kim SH, Wei CI. Biofilm formation by multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104 and other pathogens. *J Food Prot*. 2007 Jan;70(1):22-9.
71. Stepanović S1, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*. 2004;38(5):428-32.

72. Stepanovic S, Cirkovi I, Mija V, Svabic-Vlahovi C. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*. 2003 Jun;20(3):339–343.
73. Austin JW, Sanders G, Kay WW, Collinson SK. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol*. 1998 May;162(2):295-301.
74. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 1995; (49):711-745.
75. O'toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79.
76. Characklis, W.G., Marshall, K.C. Editora John Wiley and sons, 1990. Inc, 93- 130.
76. Characklis WG. Biofilm development: a process analysis. In: *Microbial Adhesion and Aggregation*. Ed. K. C. Marshall, Sprig Verlag, New York, 1984.
77. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res*. 2014 Apr; 78(2): 110–116.
78. Christensen BE, Characklis WG, Physical and chemical properties of biofilms. In: *Biofilms*.
79. Jay JM. *Microbiologia de alimentos*. Artmed, 2005.
80. Madigan, Michael T, John MM, Paul VD, David PC. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016
81. Ross T, McMeekin TA. Modeling microbial growth within food safety risk assessments. *Risk Anal*. 2003;23(1):179–197.
82. Santiago LB, Chapaval L, Alves FSF, Brito IF, Sousa FGC, Pinheiro RR. Determinação da curva de crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 46^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2009. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27661/1/AAC-Determinacao-da-curva-de-crescimento-da-Corynebacterium-pseudotuberculosis.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2018.
83. Sabike II, Fujikawa H, Edris AM. The Growth Kinetics of *Salmonella* Enteritidis in Raw Ground Beef. *Biocontrol Sci*. 2015;20(3):185-92.
84. Souza NA, Martins MLL. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz. J. Microbiol*. 2018 July;32(4):271-275.
85. Mürmann L, Santos MC, Cardoso M. Curvas de crescimento e destruição térmica de sorovares de *Salmonella* sp. isolados de lingüiça frescal de carne suína. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2007;35(3):309-313.

86. Malheiros PS. Avaliação da cinética de crescimento, resistência ácida e resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul e comparação com outros sorovares. 86f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.
87. Huang L. Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically-tenderized beef. *Int J Food Microbiol.* 2010 May 30;140(1):40-8.
88. Zaher SM, Fujikawa H. Effect of native microflora on the growth kinetics of *Salmonella* enteritidis strain 04-137 in raw ground chicken. *J Food Prot.* 2011 May;74(5):735-42.
89. Diez- Garcia M, Capita R, Alonso-Calleja C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology.* 2012 Sep;31(2):173-80.
90. McDonald K, SUN DW. Predictive food microbiology for the meat industry: A review. *Int J Food Microbiol.* 1999 Nov 1;52(1-2):1-27.
91. Huang L. Dynamic determination of kinetic parameters, computer simulation, and probabilistic analysis of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef during cooling. *International Journal of Food Microbiology,* 2015 Feb 16;195:20-9.
92. Huang L. Dynamic kinetic analysis of growth of *Listeria monocytogenes* in a simulated comminuted, non-cured cooked pork product. *Food Control.* 2017 Jan 71:60–167.
93. Pathogen Modeling Program. USDA ARS Eastern Regional Research Center. Disponível em: <<https://pmp.errc.ars.usda.gov/tutorial.aspx>>. Acesso em: 16 maio 2018.
94. Combase Predictor, 2018. Disponível em: <http://modelling.combase.cc/ComBase_Predictor.aspx>. Acesso em: 16 maio 2018.