

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**



**Dissertação**

**Potencial de formação de biofilme e suscetibilidade ao extrato metanólico de  
*Butia odorata* em isolados de *Campylobacter jejuni***

**Letícia Klein Scheik**

Pelotas, 2018

**Letícia Klein Scheik**

**Potencial de formação de biofilme e suscetibilidade ao extrato metanólico de  
*Butia odorata* em isolados de *Campylobacter jejuni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área do conhecimento: Microbiologia de Alimentos).

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S318p Scheik, Letícia Klein

Potencial de formação de biofilme e suscetibilidade ao extrato metanólico de *Butia odorata* em isolados de *Campylobacter jejuni* / Letícia Klein Scheik ; Wladimir Padilha da Silva, orientador. — Pelotas, 2018.

71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Biofilme mono-espécie. 2. Biofilme duo-espécie. 3. Aço inoxidável. 4. Sanitizantes. 5. Extratos de plantas. I. Silva, Wladimir Padilha da, orient. II. Título.

CDD : 634.4

Letícia Klein Scheik

Potencial de formação de biofilme e suscetibilidade ao extrato metanólico de *Butia odorata* em isolados de *Campylobacter jejuni*

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26/02/2018

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)  
Doutor em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia da Conceição  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

---

Dr<sup>a</sup>. Louise Haubert  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico aos meus pais, ao meu irmão  
e ao meu amor.**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e pela força divina em momentos de dificuldade.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram nas minhas decisões, mesmo quando isso significaria estar ausente na maior parte do tempo. Vocês são para mim o exemplo de que tudo se consegue trabalhando com honestidade, e onde estou hoje é o reflexo de tudo que vocês já fizeram por mim. Eu amo vocês!

Ao meu irmão, pelo amor e dedicação por essa irmandade que vai além do sangue. Obrigada por toda a amizade.

À minha vózinha Oli, que agora mora no céu, agradeço por todos os abraços apertados com que me recebia quando eu chegava de viagem, e por todas as orações que fazia antes de eu partir para voltar.

Ao meu amor Oscar, companheiro nas horas boas e ruins. Obrigada pelos conselhos nos momentos onde pensei que não iria conseguir, pela paciência, por nunca virar as costas nos momentos mais difíceis, e por todo o amor que dedicas à mim. Com certeza, tu tornou essa caminhada mais “leve”, sempre tentando me fazer enxergar as coisas da melhor forma possível.

Ao meu serzinho de luz, minha Pepper, que mesmo sem saber, melhora meus dias com seu amor incondicional na forma de olhares e carinhos que me trazem paz.

Às minhas irmãs de coração, Marina e Carolina, que nunca negaram um mate para conversar e distrair da correria do dia-a-dia.

Ao meu orientador, professor Wladimir, por toda a sabedoria concedida e pelos votos de confiança. Hoje finalizo o mestrado com postura e visão muito diferentes de quando iniciei, e isso eu devo à ti. És um exemplo de profissional para mim.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela amizade, conselhos sobre projeto e pelos auxílios nos experimentos de mestrado. Obrigada Prof<sup>a</sup> Ângela, Andréia, Camila, Carla, Prof. Celso, Cláudio, Graciela, Greici, Guilherme, Gustavo, Helena, Isabela, Juliana, Kamila, Kauana, Isabela, Louise, Maiara, Mariana, Natalie, Pedro, Tassiana e Ytaciana. Agradeço especialmente à Darla e à Simone, por terem me auxiliado na reta final de experimentos, sem vocês este trabalho não seria o mesmo.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de executar este projeto.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Aos membros da banca, por terem aceito o convite para contribuir com melhorias para este trabalho.

À todos, que de alguma forma estiveram presentes comigo nessa caminhada, obrigada pelas palavras, conselhos e apoio.

Muito obrigada!

*“A persistência é o menor caminho do êxito.”*

(Charles Chaplin)

## Resumo

**Klein Scheik, Letícia. Potencial de formação de biofilme e suscetibilidade ao extrato metanólico de *Butia odorata* em isolados de *Campylobacter jejuni*.**

2018. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O emprego das Boas Práticas de Fabricação na indústria de alimentos, como a higienização de superfícies, é importante para evitar a formação de biofilmes. *Campylobacter jejuni*, que é o principal agente etiológico da campilobacteriose, pode sobreviver em condições adversas no ambiente pela capacidade de formação de biofilme. As bactérias formadoras de biofilme podem adquirir resistência à compostos utilizados como sanitizantes na etapa de sanitização, como o cloreto de benzalcônio (CB). Assim, faz-se necessário a busca por novos compostos com ação antibacteriana que possam ser utilizados em alternativa aos sanitizantes sintéticos. Os extratos de plantas vêm sendo amplamente estudados devido às suas características antimicrobianas e por serem compostos naturais. O extrato metanólico de *Butia odorata* Barb. Rodr. (EMB) teve sua ação antibacteriana comprovada em estudos anteriores. Portanto, os objetivos deste estudo foram avaliar a influência da superfície, temperatura, atmosfera e co-cultura com *Pseudomonas aeruginosa* sobre a formação de biofilme de *Campylobacter jejuni* isolados de abatedouro de frangos da região sul do Rio Grande do Sul, bem como identificar a presença de alguns genes relacionados à formação de biofilme nesses isolados. Também objetivou-se avaliar a suscetibilidade desses isolados ao EMB e ao CB, através do teste qualitativo de disco difusão em ágar para o EMB, e da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) para o EMB e para o CB. A atmosfera não afetou a formação de biofilme mono-espécie de *C. jejuni* tanto em poliestireno como em aço inoxidável. Houve maior formação de biofilme em temperaturas que não são as ótimas para a multiplicação de *C. jejuni*. A forma como *P. aeruginosa* foi inoculada para formar biofilmes duo-espécie com *C. jejuni* (concomitante ou pré-formado por *P. aeruginosa*), não influenciou a formação de biofilme pelos isolados. Nos biofilmes duo-espécie com *P. aeruginosa*, as maiores contagens de biofilme por *C. jejuni* em aço inoxidável ocorreram a 25 °C. Os sete isolados de *C. jejuni* avaliados possuem 10 genes envolvidos no processo de formação de biofilme, porém o gene *katA* não foi encontrado em três isolados, e o gene *kpsM* não foi encontrado em um isolado, o que não afetou a formação de biofilme por esses isolados. O EMB apresentou atividade antibacteriana contra os sete isolados no teste qualitativo de disco difusão em ágar, com halos de inibição acima de 23 mm. A CIM do EMB ficou entre 83,3 e 166,6  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , e a CBM foi o mesmo valor de CIM em todos os isolados. Já para o CB, o valor de CIM ficou entre 1 e 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e a CBM variou entre 1 e 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  entre os isolados. Dessa forma, o EMB pode tornar-se uma boa alternativa ao CB empregado na etapa de sanitização em indústrias de alimentos.

**Palavras-chave:** biofilme mono-espécie; biofilme duo-espécie; aço inoxidável; sanitizantes; extratos de plantas

## Abstract

**Klein Scheik, Letícia. Biofilm formation potential and susceptibility to *Butia odorata* methanolic extract in *Campylobacter jejuni* isolates. 2018. 71f.**

Dissertation (Master Degree em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

The employment of good manufacturing practice in the food industry, as surfaces sanitization, is important to avoid the biofilm formation. *Campylobacter jejuni*, which is the main etiological agent of campylobacteriosis, can survive in adverse environmental conditions by capacity of biofilm formation. Biofilm forming bacteria can acquire resistance to compounds used as sanitizers in sanitization step, such as benzalkonium chloride (BC). Thereby, it is necessary the search for new compounds with antibacterial activity which can be used in alternative to synthetic sanitizers. The plants extracts have been widely studied due to its antimicrobial characteristics and for being natural compounds. The *Butia odorata* Barb. Rodr. methanolic extract (BME) had its antibacterial activity proven in studies performed previously. Therefore, the aims of this study were evaluate the factors that influence of surface, temperature, atmosphere and co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* on biofilm formation in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry slaughterhouse of Southern Rio Grande do Sul, Brazil, as well identify the presence of some genes related to biofilm formation in these isolates. Moreover, was aimed to evaluate the susceptibility of these isolates to the BME and to the BC, through the agar disc diffusion qualitative test for BME, and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for BME and BC. The atmosphere did not affected the monospecies biofilm formation both in polystyrene and stainless steel. There was greater biofilm formation in temperatures that are not the optimals for *C. jejuni* growth. The way how *P. aeruginosa* was inoculated to form dual-species biofilms with *C. jejuni* (concomitant or preformed by *P. aeruginosa*) did not influenced the biofilm formation by the isolates. In duo-species biofilms with *P. aeruginosa*, the higher biofilm counts of *C. jejuni* in stainless steel occurred at 25 °C. The seven isolates had 10 genes that are involved in biofilm formation process, but the *katA* gene was not found in three isolates, and the *kpsM* gene was not observed in one isolate, which did not affected the biofilm formation by these isolates. The BME presented antibacterial activity against the seven *C. jejuni* isolates tested in the qualitative test of agar disc diffusion, resulting in inhibition halos above of 23 mm. The MIC of BME ranged between 83,3 and 166,6  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , and the MBC was the same value that MIC in all isolates. Already for BC, the MIC value stay between 1 and 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , and the MBC value ranged between 1 and 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  among isolates. In this way, the BME can become a good alternative to the BC employed in sanitization step in food industries.

**Keywords:** monospecies biofilm; dual-species biofilm; stainless steel; sanitizers; plants extracts

## Lista de Figuras

|          |                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Processo de formação de biofilme.....                                                                                                                                                                | 19 |
| Figura 2 | Morfologia celular de <i>Campylobacter jejuni</i> por microscopia eletrônica..                                                                                                                       | 21 |
| Figura 3 | <i>Quorum sensing</i> em bactérias.....                                                                                                                                                              | 26 |
| Figure 1 | Comparison of biofilm formation in polystyrene by seven<br><i>Campylobacter jejuni</i> isolates in aerobic monospecies biofilm,<br>microaerophilic monospecies biofilm and dual-species biofilm..... | 41 |

## Lista de Tabelas

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1  | Biofilm formation in stainless steel coupons by seven <i>Campylobacter jejuni</i> isolates.....                                                                                                                                                                     | 43 |
| Table 2  | Inhibition zones induced by <i>Butia odorata</i> Barb. Rodr. methanolic (BME) extract, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of BME and benzalkonium chloride (BC) in seven <i>Campylobacter jejuni</i> isolates..... | 44 |
| Table S1 | Source of the <i>Campylobacter jejuni</i> isolates analysed.....                                                                                                                                                                                                    | 50 |
| Table S2 | List of oligonucleotides used in this study.....                                                                                                                                                                                                                    | 50 |

## Lista de Abreviaturas e Siglas

|      |                                                            |
|------|------------------------------------------------------------|
| AI   | Auto-indutores/ <i>Auto-inducers</i>                       |
| ISI  | <i>American Iron and Steel Institute</i>                   |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i>                    |
| ATP  | Adenosina Trifosfato                                       |
| BA2  | <i>Blood agar base n° 2</i>                                |
| BC   | <i>Benzalkonium chloride</i>                               |
| BME  | <i>Butia odorata</i> Barb. Rodr. <i>methanolic extract</i> |
| BPF  | Boas Práticas de Fabricação                                |
| CB   | Cloreto de benzalcônio                                     |
| CDC  | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>          |
| CFU  | <i>Colony-forming unit</i>                                 |
| CQA  | Composto quaternário de amônio                             |
| CV   | <i>Crystal violet</i>                                      |
| DCTA | Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial        |
| DDBJ | <i>DNA Data Bank of Japan</i>                              |
| DNA  | <i>Desoxyribonucleic acid</i>                              |
| DO   | Densidade ótica                                            |
| EMB  | Extrato metanólico de <i>Butia odorata</i> Barb. Rodr.     |
| EMBL | <i>European Molecular Biology Laboratory</i>               |
| EPS  | Exopolissacarídeo                                          |
| FAEM | Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel                       |
| h    | hora(s)/ <i>hour(s)</i>                                    |
| IgG  | Imunoglobulina G                                           |
| Kb   | <i>Kilobyte</i>                                            |
| Mb   | Mega base                                                  |
| MBC  | <i>Minimmum bactericidal concentration</i>                 |
| MH   | Mueller-Hinton                                             |
| MHB  | Mueller-Hinton <i>broth</i>                                |
| MIC  | <i>Minimmum inhibitory concentration</i>                   |
| µg   | micrograma(s)/ <i>microgram(s)</i>                         |
| µL   | microlitro(s)/ <i>microliter(s)</i>                        |
| min  | minuto(s)/ <i>minut(s)</i>                                 |
| mL   | mililitro(s)/ <i>milliliter(s)</i>                         |
| mm   | milimetro(s)/ <i>milimeter(s)</i>                          |

|       |                                            |
|-------|--------------------------------------------|
| NCTC  | <i>National Colection of Type Cultures</i> |
| nm    | <i>nanometer(s)</i>                        |
| OD    | <i>Optical density</i>                     |
| Pb    | Pares de base                              |
| PBS   | Phosphate buffer saline                    |
| PCR   | <i>Plymerase Chain Reaction</i>            |
| PFGE  | <i>Pulsed-field Gel Eletrophoresis</i>     |
| PW    | <i>Peptoned water</i>                      |
| QAC   | <i>Quaternaty ammonium compound</i>        |
| SD    | <i>Standard deviation</i>                  |
| SGB   | Síndrome de Guillain-Barré                 |
| SLC   | Sobrenadante livre de células              |
| SMF   | Síndrome de Miller-Fisher                  |
| SR    | Síndrome de Reiter                         |
| TSA   | <i>Tryptic Soy agar</i>                    |
| UFC   | Unidade formadora de colônia               |
| UFPeI | Universidade Federal de Pelotas            |
| UK    | <i>United Kingdom</i>                      |
| USA   | <i>United States of America</i>            |
| VNC   | Viável não cultivável                      |
| WHO   | <i>World and Health Organization</i>       |
| °C    | Grau(s) Celsius/ <i>Celsius degree(s)</i>  |

## Sumário

|                                                                                                                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 Introdução.....</b>                                                                                                                                                                    | <b>16</b> |
| <b>2 Revisão da Literatura.....</b>                                                                                                                                                         | <b>18</b> |
| <b>2.1 Boas Práticas de Fabricação na indústria de alimentos.....</b>                                                                                                                       | <b>18</b> |
| <b>2.2 Biofilmes.....</b>                                                                                                                                                                   | <b>19</b> |
| <b>2.3 Características do gênero <i>Campylobacter</i> e <i>Campylobacter</i> termofílicos...</b>                                                                                            | <b>20</b> |
| <b>2.4 Campilobacteriose.....</b>                                                                                                                                                           | <b>21</b> |
| <b>2.5 Formação de biofilme por <i>Campylobacter jejuni</i>.....</b>                                                                                                                        | <b>23</b> |
| 2.5.1 Genes envolvidos na formação de biofilme por <i>Campylobacter jejuni</i> .....                                                                                                        | 24        |
| 2.5.1.1 Flagelo (genes <i>flaAB</i> ).....                                                                                                                                                  | 25        |
| 2.5.1.2 <i>Quorum sensing</i> (gene <i>luxS</i> ).....                                                                                                                                      | 25        |
| 2.5.1.3 Resistência ao estresse oxidativo (genes <i>ahpC</i> , <i>docA</i> , <i>katA</i> e <i>sodB</i> ).....                                                                               | 27        |
| 2.5.1.4 Polissacarídeo capsular (gene <i>kpsM</i> ).....                                                                                                                                    | 27        |
| 2.5.1.5 Proteína de ligação à fibronectina (gene <i>cadF</i> ).....                                                                                                                         | 28        |
| 2.5.1.6 Resistência ao choque térmico (genes <i>clpP</i> , <i>dnaJ</i> e <i>racR</i> ).....                                                                                                 | 28        |
| <b>2.6 Agentes sanitizantes empregados na indústria de alimentos.....</b>                                                                                                                   | <b>29</b> |
| 2.6.1 Cloreto de Benzalcônio.....                                                                                                                                                           | 29        |
| <b>2.7 Alternativa aos sanitizantes sintéticos.....</b>                                                                                                                                     | <b>30</b> |
| 2.7.1 Extratos de plantas.....                                                                                                                                                              | 30        |
| 2.7.2 Extrato Metanólico de <i>Butia odorata</i> Barb. Rodr.....                                                                                                                            | 30        |
| <b>3 Artigo 1 – Factors that influence the biofilm formation and susceptibility to the <i>Butia odorata</i> Barb. Rodr. methanolic extract in <i>Campylobacter jejuni</i> isolates.....</b> | <b>32</b> |
| <b>4 Considerações Finais.....</b>                                                                                                                                                          | <b>52</b> |
| <b>Referências.....</b>                                                                                                                                                                     | <b>53</b> |
| <b>Apêndices.....</b>                                                                                                                                                                       | <b>67</b> |

## 1 Introdução

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) são condições e procedimentos higiênico-sanitários e operacionais sistematizados, aplicados em todo o fluxo de produção, com o objetivo de garantir a inocuidade, identidade, qualidade e a integridade dos alimentos de origem animal (BRASIL, 2017). A higienização incorreta de equipamentos, superfícies e utensílios utilizados na produção de alimentos pode conduzir a sérios problemas, dentre eles a formação de biofilmes.

Biofilmes são estruturas formadas por micro-organismos aderidos à uma superfície, envolvidos em uma matriz polimérica extracelular de exopolissacarídeos (EPS), produzida por eles (FENG et al., 2017). As bactérias podem formar biofilme em superfícies de alimentos, em superfícies abióticas (mesas, esteiras, equipamentos, facas, etc), e em superfícies adjacentes, como paredes e canos (GIAOURIS; NESSE, 2015; LIN et al., 2017). Os biofilmes também podem ser formados por uma espécie bacteriana (biofilme mono-espécie), duas (biofilmes duo-espécie) ou mais espécies (multi-espécies) (RICE; WUERTZ; KJELLEBERG, 2016).

*Campylobacter* spp. são bactérias Gram-negativas, de forma espiralada e que possuem flagelo, sendo que a maioria das espécies deste gênero multiplicam-se em atmosfera de microaerofilia. Apesar disso, *Campylobacter* spp. é o gênero bacteriano mais associado a doenças gastrointestinais em humanos no mundo (LAMAS et al., 2018). *Campylobacter* termofílicos é um grupo composto por espécies termotolerantes de *Campylobacter* spp., com temperatura ótima de multiplicação próxima a 42 °C. Sendo assim, seu principal reservatório é o trato intestinal de aves, como por exemplo, os frangos (BERTASI et al., 2016).

A campilobacteriose é uma doença transmitida por alimentos (DTA) causada pela ingestão de alimentos contaminados (principalmente carne de frango) com bactérias do gênero *Campylobacter*, sendo *C. jejuni* a espécie mais envolvida em casos da doença, e também a mais prevalente em aves (BOLTON, 2015). A infecção por *Campylobacter* é autolimitante, porém pode levar a óbito indivíduos dos grupos de risco (WHO, 2016), além de poder causar complicações pós-infecção, como as síndromes de Guillain-Barré, Miller-Fisher e Reiter (JOSHUA et al., 2006).

*Campylobacter jejuni* sobrevive na indústria de alimentos, principalmente, pela capacidade de formação de biofilme em superfícies (GUNTHER; CHEN, 2009). A matriz polimérica de EPS auxilia na manutenção de uma atmosfera microaerofílica que se forma no biofilme (BROWN et al., 2015), aumentando a resistência de *C.*

*jejuni*. Esse patógeno forma biofilmes mono, duo ou multi-espécie (JOSHUA et al., 2006; TEH; LEE; DYKES, 2010), com espécies como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Pseudomonas aeruginosa* (FENG et al., 2016), condição que promove proteção para *C. jejuni* contra tratamentos com sanitizantes e estresse oxidativo (ICA et al., 2012). Além disso, a formação de biofilme por *C. jejuni* pode ser reforçada em condições de aerobiose (REUTER et al., 2010).

De acordo com Reeser et al. (2007), o flagelo e o processo de *quorum sensing* afetam a formação de biofilme por *C. jejuni*. Ainda, algumas enzimas são importantes para a sobrevivência de *C. jejuni* na matriz polimérica do biofilme, como as enzimas que neutralizam as formas tóxicas de oxigênio dentro da célula (ATAACK; KELLY, 2009), fazendo com que a bactéria tolere o ambiente aeróbio. Fatores ambientais externos, como a temperatura, disponibilidade de nutrientes e nível de oxigênio, também influenciam a capacidade de formação de biofilme por *C. jejuni* (REUTER et al., 2010; TEH; LEE; DYKES, 2017a).

Segundo Stewart e Franklin (2008), as células bacterianas no biofilme são mais resistentes aos sanitizantes do que a célula planctônica. O cloreto de benzalcônio (CB) é um agente de sanitização amplamente utilizado na higienização de superfícies em indústrias de alimentos. Entretanto, a sua frequente aplicação, associada a utilização de doses subletais, podem levar a aquisição de resistência pelas bactérias presentes no ambiente. Assim, faz-se necessário a busca por alternativas aos sanitizantes usualmente empregados pela indústria de alimentos.

Extratos de plantas com potencial antimicrobiano vêm sendo estudados, podendo ser utilizados em substituição ou como complemento a agentes de sanitização utilizados comercialmente (BONIFÁCIO et al., 2014). Um extrato metanólico de *Butia odorata* Barb. Rodr. (EMB) foi produzido e avaliado quanto a sua atividade antibacteriana em recente pesquisa do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas. Esse extrato apresentou halos de inibição superiores a 20 mm para todas as bactérias Gram-negativas avaliadas no teste qualitativo de disco difusão em ágar (*S. Typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 e *P. aeruginosa* ATCC 15442) (MAIA et al., 2017).

Desta forma, os objetivos deste estudo foram avaliar fatores que influenciam o potencial de formação de biofilme em *Campylobacter jejuni* isolados de abatedouro de frangos da região sul do Rio Grande do Sul, a presença de genes relacionados à formação de biofilme, e a suscetibilidade desses isolados ao EMB e ao CB.

## **2 Revisão da Literatura**

### **2.1 Boas Práticas de Fabricação na indústria de alimentos**

Segundo Athaide (1999), as BPF são normas aplicadas em produtos, processos, serviços e instalações, que visam a promoção e a certificação da qualidade e da segurança dos alimentos. Este sistema de normas é um dos mais reconhecidos e eficientes para obter-se um alimento seguro, pois atua em todos os processos envolvidos na produção de alimentos e assegura, juntamente com outros programas, a qualidade do produto final. Assim, a segurança de alimentos é garantida com esforços combinados de todos os envolvidos na cadeia produtiva de alimentos (GOMES, 2006).

A higienização na indústria de alimentos compreende as etapas de limpeza e sanitização, e está inserida nas BPF e nos programas de qualidade, como o de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Tal prática visa a obtenção de alimentos seguros, principalmente sob os aspectos relacionados a contaminações com perigos químicos, físicos e microbiológicos (ANDRADE, 2008). Na higienização, os agentes químicos, como os detergentes, têm a função de remover resíduos orgânicos e minerais das superfícies de equipamentos e utensílios, enquanto os sanitizantes inibem os patógenos e reduzem para números aceitáveis a contagem de micro-organismos.

As características das superfícies auxiliam na realização de um procedimento de higienização adequado. O ideal é que não se formem poros nem ranhuras nas superfícies, e que estas sejam resistentes a deformações e corrosão (ANDRADE, 2008), pois estas imperfeições facilitam o acúmulo de matéria orgânica e micro-organismos e dificultam posteriormente a sua remoção pela higienização. Os principais materiais com que são feitas as superfícies comumente utilizadas na indústria de alimentos, como o aço inoxidável, polietileno, polipropileno, mármore, silicone e vidro, permitem a multiplicação de micro-organismos, o que pode conduzir ao processo de adesão bacteriana denominado formação de biofilme (LEJEUNE, 2003; MARSHALL, 1992; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

Portanto, a higienização é um processo de extrema relevância, que deve ser empregado como uma medida preventiva, com o intuito de evitar a adesão irreversível de patógenos, que podem conseqüentemente contaminar os alimentos no processo de produção, causando doenças para o consumidor final.

## 2.2 Biofilmes

Biofilme pode ser definido como um conjunto de células microbianas que se aderem a uma superfície e produzem um material extracelular, conhecido por EPS, no qual as células permanecem envoltas (DONLAN, 2002). O biofilme também pode conter partículas de matéria orgânica provenientes da superfície onde esse biofilme foi formado, o que servirá de substrato para as bactérias, expandindo a produção de biofilme.

A formação de biofilme ocorre basicamente em 4 etapas: adesão (célula na sua forma planctônica adere-se à superfície contendo imperfeições e resíduos orgânicos através de forças de van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas, sendo esta etapa reversível); expansão, onde as células iniciam a produção de EPS e aderem-se irreversivelmente (através de interações dipolo-dipolo e ligações covalentes), multiplicam-se e formam microcolônias, cobrindo a superfície; maturação, onde o crescimento bacteriano, juntamente com a constante produção de EPS, formam a camada de biofilme, que pode conter vários milímetros de espessura em questão de dias; e, a quarta etapa, é a dispersão, ocorrendo o destacamento de algumas partículas de biofilme contendo as células bacterianas, que podem contaminar os alimentos próximos a essa superfície de contato, ou então iniciar a formação de um novo biofilme em superfícies adjacentes na linha de produção (Figura 1) (FORSYTHE, 2002).

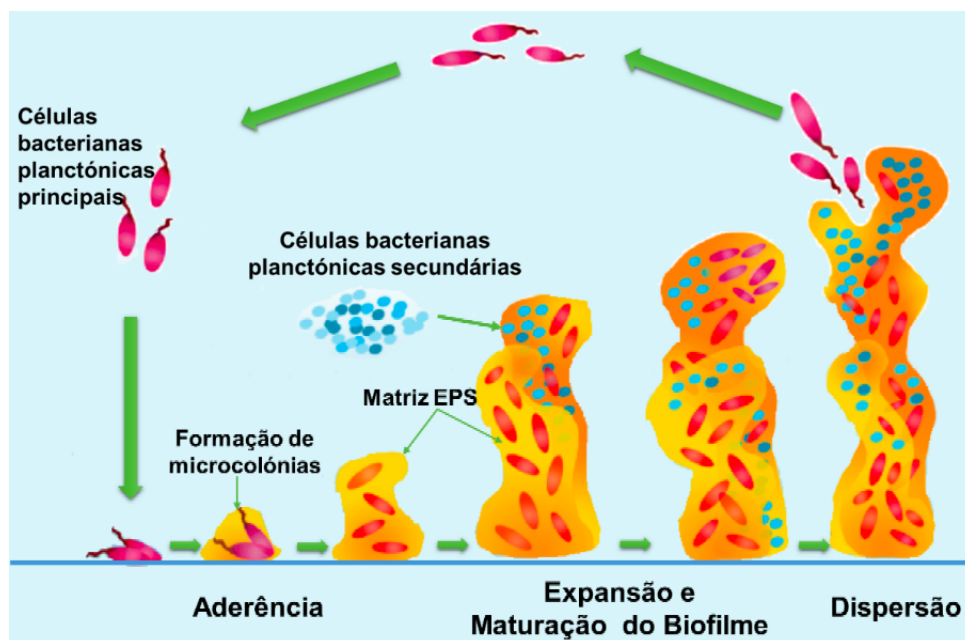


Figura 1. Processo de formação de biofilme

Fonte: <http://knoow.net>

A formação de biofilme em superfícies é considerada um dos maiores fatores de risco de contaminação cruzada no processamento de alimentos, como por exemplo, em tábuas de corte e facas (NGUYEN et al., 2012; REUTER et al., 2010). Isto significa que, uma vez que estes utensílios entrem em contato com um alimento contaminado, as bactérias presentes neste alimento podem formar biofilme na superfície destes utensílios e, caso estes não sejam corretamente higienizados, alimentos inócuos que serão consumidos crus manipulados nas mesmas condições podem adquirir uma carga bacteriana, chegando contaminados na mesa do consumidor.

Bactérias como *P. aeruginosa* e *S. enterica* são consideradas fortes formadoras de biofilme em ambientes de processamento de alimentos (PARIZZI et al., 2004; SOLANO et al., 2002; WHITELEY et al., 2001). Uma mesma matriz de biofilme pode conter uma, duas ou mais espécies bacterianas. Biofilmes compostos por mais de uma espécie geralmente são mais estáveis do que biofilmes mono-espécie (STEWART; FRANKLIN, 2008). Essas comunidades mistas de células sésseis são dinâmicas e com extensas interações que ocorrem entre as estirpes de diferentes espécies (MOONS; MICHIELS; AERTSEN, 2009), afetando significativamente a composição da matriz de EPS e, conseqüentemente, a estrutura do biofilme multi-espécie e a sua resistência a fatores ambientais externos como temperatura, e a tratamentos com agentes sanitizantes.

### **2.3 Características do gênero *Campylobacter* e *Campylobacter* termofílicos**

O gênero *Campylobacter* é pertencente à família *Campylobacteraceae* e atualmente compreende 36 espécies e 14 sub-espécies (EUZÉBY, 2016). Possui forma de bastonete curvo, também conhecido como “saca-rolhas” ou “asa-de-gaivota” (Figura 2). Apresenta um flagelo polar em uma ou ambas extremidades da célula, e é uma bactéria Gram-negativa e essencialmente microaerófila, multiplicando-se em concentrações de 10% de dióxido de carbono e 5% de oxigênio (HUMPHREY; O'BRIEN; MADSEN, 2007).

Algumas espécies de *Campylobacter* spp. possuem sua temperatura ótima de multiplicação próxima a 42 °C, e, por isso, são consideradas comensais da microbiota intestinal de animais de sangue quente, como as aves (PARK, 2002). Este grupo é denominado de *Campylobacter* termofílicos, e compreende as espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*. As fezes de aves contendo *Campylobacter*

termofílicos podem contaminar fontes de água, o que pode tornar-se uma fonte contaminação para outros animais (REESER et al., 2007).

Comparada com outras bactérias patogênicas transmitidas por alimentos, como *E. coli* e *Salmonella* spp., *C. jejuni* apresenta metabolismo fastidioso, isto é, necessita de condições específicas para multiplicar-se. Esta bactéria não é capaz de fermentar carboidratos, sua temperatura ideal de multiplicação é maior do que a maioria das bactérias mesófilas e, como citado anteriormente, é microaerofílica, não suportando os níveis de oxigênio presentes em uma atmosfera aeróbia (KEENER et al., 2004).



Figura 2. Morfologia celular de *Campylobacter jejuni* por microscopia eletrônica

Fonte: <http://www.bacteriainphotos.com>

## 2.4 Campilobacteriose

*Campylobacter jejuni* é um dos principais patógenos transmitidos por alimentos no mundo (MBOTO et al., 2012), devido ao grande número de casos de infecção por esta bactéria. A campilobacteriose, que é a infecção causada pela ingestão de alimentos contaminados por bactérias do gênero *Campylobacter*, é uma doença autolimitante (CDC, 2017). *Campylobacter jejuni* é a espécie mais envolvida em casos de campilobacteriose em humanos (WHO, 2018) sendo responsável por mais de 80% dos casos (EFSA; ECDC, 2015).

Segundo o CDC, estima-se que ocorram aproximadamente 1,3 milhão de casos de campilobacteriose a cada ano no mundo, já que muitos casos não são diagnosticados em decorrência da campilobacteriose ocorrer de forma esporádica, não sendo uma doença associada a surtos. A dose infectante é significativamente baixa: menos de 500 células da bactéria já podem causar a doença (CDC, 2017). No

Brasil, apesar de ser o segundo país que mais produz carne de frango, e o que mais exporta este produto no mundo (BRASIL, 2016), os dados sobre a prevalência de *C. jejuni* são escassos, não havendo informações suficientes sobre esse patógeno e nem programas de vigilância e notificação obrigatória da campilobacteriose, já que a análise de *Campylobacter* spp. não é preconizada em alimentos (BRASIL, 2001).

Os sintomas de campilobacteriose incluem diarreia (na maioria das vezes hemorrágica), dor abdominal, febre, dor de cabeça, náuseas e/ou vômitos, iniciando cerca de dois a cinco dias após a exposição à bactéria, e pode durar de três a seis dias (WHO, 2018). Algumas complicações pós-infecção por *Campylobacter* spp. podem ocorrer, conduzindo a severas sequelas, como as síndromes de Guillain-Barré (SGB), Miller-Fisher (SMF) e Reiter (SR) (SALLOWAY et al., 1996). A SGB é uma neuropatia auto imune, onde a semelhança entre os antígenos da bactéria que causou a infecção e as células dos nervos periféricos do hospedeiro, levam os anticorpos produzidos pelo organismo a atacarem suas próprias células (BUTZLER, 2004). As causas da SGB são diversas, mas geralmente essa doença é precedida por infecções causadas por bactérias e vírus, bem como doenças respiratórias. Porém, cerca de 40% dos pacientes com SGB apresentam evidências de terem sido acometidos previamente por campilobacteriose quando os sintomas neurológicos iniciam, sendo *C. jejuni* a espécie mais comumente associada (CDC, 2017).

A SMF é uma neuropatia multifocal, considerada uma variante da SGB, apresentando a tríade oftalmoplegia, ataxia e arreflexia como sintomas (DAMIANI; LAUDANNA; DAMIANI, 2011). Assim como a SGB, a SMF é caracterizada por uma paralisia flácida pós-infecciosa, causada por inflamação e lesão dos nervos periféricos (OVERELL et al., 2007). A presença de infecção pregressa por *C. jejuni* e *Haemophilus influenzae*, além de agentes virais, como citomegalovírus, parecem contribuir para a formação de anticorpos IgG anti-GQ1b na SMF através de reações imunológicas cruzadas contra a parede destes agentes (KOGA et al., 2005). Já a SR, também conhecida como artrite reativa, é uma doença que causa inflamação das articulações, tendões, olhos e uretra, e geralmente é desencadeada após infecção por bactérias como *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. e *Campylobacter* spp (CDC, 2017).

A campilobacteriose pode ocorrer através da ingestão de água contaminada, leite incorretamente pasteurizado e, ainda, pelo consumo de carne suína e bovina cruas ou mal cozidas. Entretanto, sugere-se que a principal via de transmissão de *C.*

*jejuni* aos humanos seja através do consumo ou manipulação de carne de frango crua ou mal cozida (WHO, 2018), já que este patógeno está presente naturalmente na microbiota dessas aves (ZIMMER et al., 2003). Portanto, a sobrevivência de *C. jejuni* na cadeia produtiva de frangos de corte torna-se um problema de saúde pública de extrema relevância, além da sua importância econômica, devido aos gastos com tratamentos com antibióticos e as hospitalizações decorrentes das sequelas pós-campilobacteriose (BATZ; HOFFMANN; MORRIS, 2012; GIBNEY et al., 2014; MANGEN et al., 2015).

## **2.5 Formação de biofilme por *Campylobacter jejuni***

Um paradoxo existente é que *C. jejuni*, mesmo sendo uma bactéria de metabolismo fastidioso e que não suporta as elevadas concentrações de oxigênio de um ambiente aeróbio, pode sobreviver a todas as adversidades, persistir na cadeia produtiva de frangos e ser a principal bactéria causadora de gastroenterite humana no mundo (FENG et al., 2016; GUNTHER; CHEN, 2009, JOSHUA et al., 2006). Este fato deve-se principalmente à capacidade desse micro-organismo permanecer viável por longos períodos de tempo através da formação de biofilme em superfícies de ambientes que, de acordo com a sua natureza fastidiosa e microaerofílica, não favoreceriam sua multiplicação.

Estirpes de *C. jejuni* podem formar biofilme em diversas superfícies de processamento de alimentos, como aço inoxidável, poliestireno e vidro (KALMOKOFF et al., 2006). A maioria das bactérias aderem-se mais facilmente em superfícies hidrofóbicas, como o aço inoxidável. Em estudo desenvolvido por Gunther e Chen (2009), a maior taxa de adesão de isolados de *Campylobacter* spp. foi em aço inoxidável, em comparação com o vidro e o poliestireno. Salienta-se que o aço inoxidável possui uma superfície rugosa em comparação aos outros materiais testados (GUNTHER; CHEN, 2009), o que facilita a adesão e a permanência destas bactérias na superfície.

Estudos demonstraram que *C. jejuni* pode formar biofilme sozinha (TEH; LEE; DYKES, 2014), ou com outras espécies bacterianas, bem como pode aderir-se em biofilmes pré-formados por outras bactérias (KEEVIL, 2003; TRACHOO; FRANK; STERN, 2002), fazendo com que a sua sobrevivência no ambiente seja reforçada na condição de biofilme (BUSWELL et al., 1998). Bactérias aeróbias auxiliam na persistência de *C. jejuni* em biofilmes através da diminuição da taxa de oxigênio na

matriz polimérica. *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria aeróbia, Gram-negativa e grande produtora de biofilme, e frequentemente é encontrada juntamente com *C. jejuni* em alguns ambientes de processamento de alimentos (HILBERT et al., 2010). Pesquisas recentes comprovaram que *P. aeruginosa* não somente estende o tempo de sobrevivência de *C. jejuni*, como também promove a sua multiplicação em biofilmes formados sob condição de aerobiose em relação ao biofilme mono-espécie de *C. jejuni* (CULOTTI; PACKMAN, 2015; ICA et al., 2012).

Fatores externos, como a disponibilidade de nutrientes, temperatura e atmosfera, também afetam a formação de biofilme por *C. jejuni*. Em alguns estudos, a formação de biofilme por esse micro-organismo foi significativamente maior em caldo Mueller-Hinton (MH), mesmo sendo um meio menos rico em nutrientes, do que em caldo Brucella e caldo Bolton, que são meios de cultivo ricos em nutrientes e específicos para *Campylobacter* spp. (REESER et al., 2007; TEH; LEE; DYKES, 2017a). De acordo com Teh, Lee e Dykes (2016), a temperatura pode induzir ou reprimir a expressão de genes envolvidos na formação de biofilme em *C. jejuni*, dependendo da estirpe. Além disso, a formação de biofilme em *C. jejuni* pode ser reforçada em atmosfera aeróbia (REUTER et al., 2010), como resposta ao estresse oxidativo provocado na bactéria em função do ambiente com elevado nível de oxigênio em que ela se encontra.

Em resposta a diversos estresses ambientais, como baixo pH e baixas temperaturas, *C. jejuni* pode entrar em estado de latência, permanecendo em uma forma viável não cultivável (VNC). Alguns estudos demonstraram que essa bactéria em sua forma VNC pode ser encontrada tanto em células planctônicas como na forma sésil (BUSWELL et al., 1998; ICA et al., 2012; TRACHOO; FRANK; STERN, 2002), e que células planctônicas de *C. jejuni* em estado VNC são capazes de aderir-se em superfícies e iniciar a formação de biofilme (DUFFY; DYKES, 2009).

### **2.5.1 Genes envolvidos na formação de biofilme por *Campylobacter jejuni***

A formação de biofilme por espécies como *P. aeruginosa* e *E. coli* é amplamente elucidada, entretanto, estudos genéticos sobre os possíveis mecanismos responsáveis pela produção de biofilme por *C. jejuni* ainda são escassos (TEH; LEE; DYKES, 2017b). Porém, há evidências que uma série de genes estejam envolvidos no processo de formação de biofilme nessa bactéria (MELO et al., 2017).

### 2.5.1.1 Flagelo (genes *flaAB*)

*Campylobacter jejuni* produz um único flagelo em um ou ambos pólos da célula. O papel do flagelo em *C. jejuni* é multifuncional, não conferindo somente a motilidade, mas também secretando proteínas de virulência e mediando a formação da microcolônia no processo de formação de biofilme (GUERRY, 2007; BARRERO-TOBON; HENDRIXSON, 2014). O filamento flagelar é composto por duas proteínas, a flagelina maior FlaA, e a flagelina menor FlaB, codificadas pelos genes *flaAB*, respectivamente.

Alguns estudos sobre a formação de biofilme em *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *Vibrio cholerae*, indicam que o flagelo desempenha um papel-chave para a formação da microcolônia nos estágios iniciais da formação de biofilme (DONLAN, 2002; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). De acordo com Svensson, Prisma e Gaynor (2014), a formação de biofilme é afetada pela presença do flagelo, e não pela sua função relacionada à motilidade, pois o flagelo facilita a adesão celular através de interações físico-químicas, superando as forças repulsivas associadas à superfície (O'TOOLE; KOLTER, 1998).

Em *C. jejuni*, isso também parece ocorrer. Reeser et al. (2007) compararam a formação de biofilme entre uma cepa mutante dos genes *flaAB*, e a cepa selvagem. Segundo os autores, ambas obtiveram semelhante taxa de multiplicação, atingindo a mesma densidade ótica (DO) em 24 h, porém, foi observada uma redução acentuada na adesão celular e na produção de biofilme em poliestireno pela cepa mutante aflagelada em comparação com a cepa selvagem. Resultado semelhante foi encontrado recentemente por Li et al. (2017), indicando que a adesão inicial do processo de formação de biofilme é flagelo-mediada, o que ressalta a importância do flagelo na formação de um biofilme maduro por *C. jejuni* (LI et al., 2017; REESER et al., 2007).

### 2.5.1.2 Quorum sensing (gene *luxS*)

O *quorum sensing* é o processo de comunicação entre as bactérias quando estas atingem uma densidade populacional específica (a partir de  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>), liberando pequenas moléculas sinalizadoras denominadas auto-indutores (AI), que são reconhecidas pelas proteínas receptoras das bactérias presentes no ambiente e desencadeiam a expressão de genes alvo (Figura 3) (PLUMMER, 2012), como por exemplo, os genes responsáveis pela formação de biofilme. Essa

interação entre as bactérias parece desempenhar um papel chave na adesão celular inicial, estrutura e crescimento do biofilme, dispersão celular, bem como na resistência do biofilme contra tratamentos com agentes químicos (MOONS et al., 2006; VAN DER VEEN; ABEE, 2011).

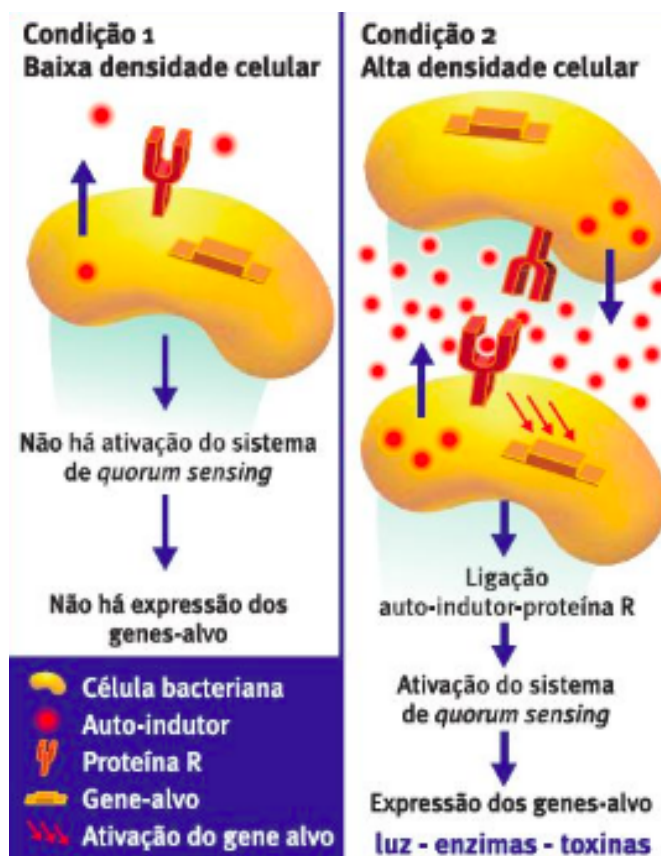


Figura 3. *Quorum sensing* em bactérias

Fonte: <http://scienceblogs.com.br>

Em *C. jejuni*, as moléculas sinalizadoras produzidas no processo de *quorum sensing*, as AI-2 produzidas pela proteína LuxS, parecem desempenhar um papel significativo no desenvolvimento do biofilme entre 48 e 72 h de incubação, de acordo com o estudo conduzido por Reeser et al. (2007), onde houve uma redução na taxa de produção do biofilme por uma cepa com mutação no gene *luxS*. Entretanto, quando cultivada juntamente com um sobrenadante livre de células (SLC) contendo moléculas AI-2 produzidas pela cepa selvagem, a taxa de produção de biofilme pela cepa mutante aumentou (REESER et al., 2007), demonstrando a importância da presença dessas moléculas sinalizadoras no ambiente para o processo de adesão de *C. jejuni* em superfícies.

### 2.5.1.3 Resistência ao estresse oxidativo (genes *ahpC*, *docA*, *katA* e *sodB*)

*Campylobacter jejuni* possui um genoma relativamente pequeno, de aproximadamente 1,6 Mb (PARKHILL et al., 2000), em comparação com outras bactérias. Mesmo assim, seu pequeno genoma contém diversos genes que codificam para enzimas que neutralizam as formas tóxicas de oxigênio geradas durante o processo de respiração celular (ATAACK; KELLY, 2009), sendo esta uma maneira da bactéria resistir ao estresse oxidativo.

A enzima que mais desempenha este papel no metabolismo de *C. jejuni* é a superóxido dismutase, codificada pelo gene *sodB*. Essa enzima converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é uma forma menos tóxica de oxigênio. O  $H_2O_2$  é transformado em água e oxigênio por outras enzimas específicas, principalmente a catalase (codificada pelo gene *katA*) e a alquil hidroperóxido redutase (codificada pelo gene *ahpC*) (ATAACK; KELLY, 2009).

O estresse oxidativo também desempenha um importante papel no desenvolvimento de biofilme por *C. jejuni* em condições de microaerofilia. Oh e Jeon (2014) produziram cepas de *C. jejuni* mutantes dos genes *ahpC*, *katA* e *sodB*, e verificaram que a cepa mutante *ahpC* demonstrou um aumento na formação de biofilme em condição de microaerofilia em comparação à cepa selvagem e às cepas mutantes *katA* e *sodB*. Já a complementação do gene *ahpC* na cepa mutada reduziu a taxa de formação de biofilme, assemelhando-se a cepa selvagem (OH; JEON, 2014), demonstrando que a mutação no gene *ahpC* é relevante na produção de biofilme em *C. jejuni* em condição de microaerofilia.

A enzima periplasmática citocromo-peroxidase, codificada pelo gene *docA*, que também converte o  $H_2O_2$  em água, porém está mais relacionada à sobrevivência de *C. jejuni in vivo*, sendo essencial na colonização e permanência no trato intestinal dos frangos (HENDRIXSON; DIRITA, 2004).

### 2.5.1.4 Polissacarídeo capsular (gene *kpsM*)

O gene *kpsM*, que codifica para a proteína capsular de transporte KpsM, é conservado no genoma de *C. jejuni* (MCLENNAN et al., 2008). De acordo com Bacon et al. (2001), o polissacarídeo capsular (PC) de *C. jejuni* facilita a sua permanência em ambientes adversos (BACON et al., 2001), e pode ser homólogo ao EPS presente no biofilme de outras espécies bacterianas. Esta hipótese sustenta-se uma vez que, na maioria das bactérias, a matriz extracelular dos biofilmes é

composta por polímeros de moléculas que contém carboidratos (MACK et al., 2000; NESPER et al., 2001; SHERLOCK; VEJBORG; KLEMM, 2005). Sendo uma proteína de transporte que está presente na cápsula de *C. jejuni*, a KpsM também pode atuar na regulação da entrada e saída de nutrientes da célula que está envolta na matriz polimérica do biofilme.

#### **2.5.1.5 Proteína de ligação à fibronectina (gene *cadF*)**

Diversos genes em *C. jejuni* foram descritos previamente como mediadores da adesão celular *in vitro*, como por exemplo o gene *cadF*, que codifica a CadF, uma proteína de ligação à fibronectina (KONKEL et al., 2010). Essa proteína é necessária para que ocorra a adesão e invasão de *C. jejuni* em células INT407 dos humanos, e ainda para que ocorra a colonização dessa bactéria no ceco de frangos (LARSON et al., 2013; MONTEVILLE; YOON; KONKEL, 2003).

Sulaeman et al. (2012) utilizaram uma cepa de *C. jejuni* mutante do gene *cadF* foi testada em relação à sua capacidade de aderir-se em uma superfície abiótica, o poliestireno. Os autores observaram que a cepa mutante obteve um índice de adesão inferior em comparação com a cepa tipo selvagem, indicando que a proteína CadF também desempenha um importante papel na adesão de *C. jejuni* em superfícies inertes (SULAEMAN et al., 2012).

#### **2.5.1.6 Resistência ao choque térmico (genes *clpP*, *dnaJ* e *racR*)**

A ClpP é uma proteína ATP-dependente de extrema importância no mecanismo de reparo celular e prevenção de danos causados na bactéria em situações de estresse térmico. A expressão do gene *clpP*, ou seja, a síntese da proteína ClpP, varia de acordo com a temperatura do ambiente, sendo super-expressa após um aumento repentino da temperatura (KONKEL et al., 1998; REID et al., 2008), ou reprimida com uma queda brusca de temperatura (BEALES, 2004).

Já o gene *dnaJ*, que possui como regulador transcricional o gene *racR* (BRAS et al., 1999), também codifica para uma proteína de resistência ao choque térmico e a altas temperaturas em *C. jejuni*, a qual está mais relacionada à colonização no trato intestinal dos frangos, justificando a natureza termofílica desta espécie. Alguns estudos comprovaram que uma mutação no gene *dnaJ* reduz drasticamente a capacidade de colonização de *C. jejuni* no trato intestinal dos frangos (KONKEL et al., 1998; ZIPRIN et al., 2001), sendo este um importante fator

de virulência para que a bactéria consiga persistir no frango até o momento do abate.

## **2.6 Agentes sanitizantes empregados na indústria de alimentos**

Como citado anteriormente, o emprego das BPF na indústria de alimentos é de extrema relevância para reduzir ao máximo as chances de formação de biofilme, e, conseqüentemente, a contaminação dos alimentos. Entretanto, a formação de biofilme pode ocorrer inclusive em superfícies onde as práticas de higienização são aplicadas, caso estas forem insuficientes ou aplicadas incorretamente. Deste modo, a escolha de um agente sanitizante deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície a ser higienizada (ROSSONI et al., 2000). Na indústria de alimentos, as principais classes de sanitizantes empregadas são os liberadores de cloro ativo, os iodóforos, os compostos quaternários de amônio (CQA) e os peróxidos (BRASIL, 2007).

### **2.6.1 Cloreto de benzalcônio**

O cloreto de benzalcônio (CB) é um agente sanitizante pertencente ao grupo dos CQA, que é comumente utilizado em ambientes de processamento de alimentos na etapa de sanitização de superfícies (BUFFET-BATAILLON et al., 2012; HEGSTAD et al., 2010). Os CQA possuem ação antimicrobiana contra diversos micro-organismos, já que estes compostos atuam na permeabilidade da membrana celular, causando extravasamento de compostos celulares, mesmo em baixas concentrações (STEWART; FRANKLIN, 2008).

Apesar da ação efetiva do CB na eliminação de bactérias, o frequente uso deste composto, combinado com a aplicação em sub doses, podem conduzir ao desenvolvimento de mecanismos de adaptação celular e, em consequência, de resistência aos sanitizantes (DYNES et al., 2009; PAGEDAR; SINGH; BATISH, 2012). A resistência aos CQA vem sendo reportada há algum tempo, tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas de origem alimentar (LANGSRUD; SUNDHEIM; BORGHMANN-STRAHSEN, 2003; SIDHU; SORUM; HOLCK, 2002).

A resistência adquirida aos sanitizantes pelas células bacterianas na sua forma séssil é significativamente maior em relação à célula planctônica (BRIDIER et al., 2011). Portanto, torna-se extremamente necessária a busca por alternativas aos

sanitizantes sintéticos como o CB, que também possuam ação bactericida contra patógenos como *C. jejuni*.

## **2.7 Alternativa aos sanitizantes sintéticos**

### **2.7.1 Extratos de plantas**

As pesquisas com foco em atividade antimicrobiana de extratos de plantas são amplamente promissoras, pois, além de serem compostos de origem natural, há diversas plantas que podem ser exploradas para a produção de óleos essenciais ou extratos, que terão seu potencial antimicrobiano avaliado (SIRSAT; MUTHAIYAN; RICKE, 2009). Particularmente, extratos de plantas produzidos a partir de solventes alcoólicos têm sido propostos ultimamente por possuírem potencial antimicrobiano contra patógenos de origem alimentar. (SERIO et al., 2014), podendo ser potenciais alternativas ao uso de sanitizantes sintéticos.

Alguns estudos recentes avaliaram a atividade antibacteriana de extratos de plantas contra *Campylobacter* spp. (BEZEK et al., 2016; KLANCNIC et al., 2017), e observaram que estes reduziram o potencial de adesão e formação de biofilme das cepas testadas, atuando como moduladores de fatores de virulência desse patógeno. Klancnic et al. (2017) verificaram que após a utilização de extrato do mosto de pele e semente da uva Pinot noir, as cepas de *C. jejuni* foram incapazes de invadir e de sobreviver dentro de células humanas tipo H4, reforçando ainda mais a importância da utilização destes compostos naturais como antibacterianos.

### **2.7.2 Extrato Metanólico de *Butia odorata* Barb. Rodr.**

O *Butia odorata* é um fruto proveniente do butiazeiro, pertencente à família *Arecaceae*, nativa e amplamente distribuída na América do Sul (LORENZI et al., 2010). Recentemente, o extrato metanólico de *Butia odorata* Barb. Rodr. (EMB), no qual utilizou-se o metanol como solvente para extração dos compostos do fruto, foi produzido e avaliado quanto ao seu potencial antibacteriano (MAIA et al., 2017). De acordo com MAIA et al. (2017), o EMB apresentou halos de inibição superiores a 20 mm para as bactérias Gram-negativas submetidas ao teste qualitativo de disco difusão em ágar (*S. Typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* NCTC 12900 e *P. aeruginosa* ATCC 15442). A avaliação da ação antibacteriana do EMB contra *C. jejuni* possui relevância no âmbito científico, já que o potencial de inibição do extrato de planta

proposto ainda não foi avaliado contra o gênero *Campylobacter* spp., e também por não haver estudos que objetivaram avaliar a atividade antibacteriana de extratos de plantas da mesma família do *Butia odorata* contra bactérias deste gênero.

**3 Artigo 1 – Factors that influence the biofilm formation and susceptibility to the *Butia odorata* Barb. Rodr. methanolic extract in *Campylobacter jejuni* isolates**

Artigo a ser submetido para o periódico *International Journal of Food Microbiology*,

Qualis CAPES A1, Fator de Impacto: 3.339

## Factors that influence the biofilm formation and susceptibility to the *Butia odorata* Barb. Rodr. methanolic extract in *Campylobacter jejuni* isolates

Letícia Klein Scheik<sup>1</sup>; Darla Silveira Volcan Maia<sup>1</sup>; Simone de Fátima Rauber Würfel<sup>2</sup>; Mauricéia Greici de Oliveira<sup>1</sup>; Tassiana Ramires<sup>1</sup>; Natalie Rauber Kleinubing<sup>1</sup>; Graciela Volz Lopes<sup>1</sup>; Wladimir Padilha da Silva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

\*Corresponding author

E-mail address: silvawp@ufpel.edu.br

### Abstract:

*Campylobacter jejuni* can form biofilms in abiotic surfaces under different conditions. Bacteria in biofilms can resist to compounds used as sanitizers in sanitization step. Therefore, it is necessary the search for new compounds with antibacterial activity which can be used in alternative to syntetic sanitizers, e.g., plants extracts. The aim of this study was evaluate factors that influence the biofilm formation in *C. jejuni*, as surface, temperature, atmosphere and co-culture with *Pseudomonas aeruginosa*. Furthermore, were evaluated genes involved in biofilm formation in *C. jejuni*, and evaluated the susceptibility to the *Butia odorata* methanolic extract (BME). The monoespecies biofilm formation by *C. jejuni* and the duo-species biofilm formation by *P. aeruginosa* with *C. jejuni* were evaluated in polystyrene and stainless steel, under different temperatures and atmosphere conditions. The duo-species biofilm formation was evaluated with concomitant inoculation of *P. aeruginosa* and *C. jejuni*, and with a preformed 24 h biofilm by *P. aeruginosa*. The atmosphere was not relevant for the monospecies *C. jejuni* biofilm formation in polystyrene and in stainless steel. There was more biofilm formation in temperatures not optimal for *C. jejuni* growth. In general, the ways of inoculation of *P. aeruginosa* (concomitant or preformed) in dual-species biofilms with *C. jejuni* did not affected the biofilm formation. In stainless steel, more biofilm was formed at 25 °C than at 7 °C. All isolates presented 10 genes involved in biofilm formation. However, the *katA* gene was not found in three isolates, and the *kpsM* was not found in one isolate. Despite this, the biofilm formed by these isolates was not affected. The BME showed antibacterial activity for all seven *C. jejuni* isolates tested in the qualitative test, resulting in inhibition halos above of 23 mm. The minimum inhibitory concentration (MIC) of BME ranged between 83,3 and 166,6 µL.mL<sup>-1</sup>, and the minimum bactericidal concentration (MBC) was the same value that MIC in all isolates. Already for benzalkonium chloride (BC), a sanitizer widely used in food industries, the MIC value stay between 1 and 2 µg.mL<sup>-1</sup>, and the

MBC value ranged between 1 and 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  among isolates. Therefore, BME can be an alternative to this synthetic sanitizer.

**Keywords:** stainless steel; monospecies biofilms; dual-species biofilms; benzalkonium chloride

## 1 Introduction

*Campylobacter* spp. is the major cause of bacterial gastroenteritis in the world, resulting at least 96 million illnesses each year (WHO, 2016). Of 36 species of that genus, *Campylobacter jejuni* is the main specie involved in human diseases attributed to *Campylobacter* infections (Tam et al., 2003; Moore et al., 2005). *Campylobacter jejuni* is a Gram-negative and thermophilic bacteria, which lives in temperatures close to 42 °C, make it a commensal organism of the gastrointestinal tract of warm-blooded animals, such as birds, especially poultry (Park, 2002). Moreover, *C. jejuni* has a microaerophilic nature, multiplying in atmospheres containing low rates of oxygen (approximately 5%) (Bronnec et al., 2016).

All these characteristics become *C. jejuni* a fastidious microorganism, which limits its ability to survive outside of animal hosts (Ica et al., 2012). However, despite the fastidious metabolism of *C. jejuni* and its sensitivity to the oxygen levels found in the environment, the ability of this pathogen to survive within food products and cause a large number of human disease cases is a paradigm (Gunther and Chen, 2009). Therefore, some studies suggest that one of the ways of *C. jejuni* survive in hostile environments is through the biofilm formation (Kalmokoff et al., 2006; Feng et al., 2016).

*Campylobacter jejuni* is capable to form biofilms on abiotic surfaces, like stainless steel and polystyrene (Kalmokoff et al., 2006). The biofilms can be monospecies or multispecies (Joshua et al., 2006; Teh et al., 2010), or even *C. jejuni* can adhere to biofilms preformed by other bacterial species (Trachoo et al., 2002; Keevil, 2003), such as *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, some researches suggest that occurs a stimulation of biofilm formation by *C. jejuni* under aerobic conditions, lead by enzymes of oxidative stress response (Oh and Jeon, 2014; Oh et al., 2016).

The mechanisms required for *C. jejuni* to form biofilms on abiotic surfaces are still unknown. However, it is accepted that external and internal factors are involved in the biofilm formation process of this pathogen. As external factors,

surface, temperature, atmosphere and nutritional characteristics of the growth media can influence the ability of *C. jejuni* to form biofilms (Reeser et al., 2007). On the other hand, intrinsic factors, such as some genes related to biofilm formation, can be fundamental in all steps of this process. A study developed by Svensson et al. (2014), demonstrated that the presence of flagellum, but not the motility itself, is essentially required for biofilm formation in *C. jejuni*. Moreover, some authors described that the presence of AI-2 molecules of the quorum sensing process (produced by the LuxS protein) in the medium, is crucial for biofilm formation in *C. jejuni* (Reeser et al., 2007; Golz et al., 2012; Plummer, 2012). Besides the mentioned genes above, several other have been searched and related to play some role in biofilm formation process of *C. jejuni*, like the stress response genes *ahpC*, *docA*, *kata*, *sodB*, *dnaJ*, *racR* and *clpP* (Konkel et al., 1998; Hendrixson and DiRita, 2004; Attack and Kelly, 2009; Oh and Jeon, 2014), and the adherence genes *cadF* and *kpsM* (Bacon et al., 2001; Sulaeman et al., 2012).

To avoid the biofilm formation by pathogens as *C. jejuni* in the food processing environment, is important the application of good manufacturing practice, with correct hygiene of surfaces and utensils. The benzalkonium chloride (BC) is a sanitizer belonging to the group of quaternary ammonium compounds (QAC), widely employed in the sanitization step in food industry (Hegstad et al., 2010; Buffet-Bataillon et al., 2012). However, due to frequent use of sanitizers, and application in sub lethal doses, bacteria can acquire resistance to this compounds, mainly in biofilms form (Simões et al., 2010). Therefore, is necessary the development of new compounds which can be applied as alternative to synthetic sanitizers.

Recently, the *Butia odorata* Barb. Rodr. methanolic extract (BME) was produced and its antibacterial activity was tested. According to Maia et al. (2017), all Gram-negative bacteria tested were inhibited in the qualitative evaluation by the agar disc diffusion method (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 e *P. aeruginosa* ATCC 15442). Therefore, the BME can be a promising alternative to the synthetic sanitizers, being that this extract has not been tested yet against *C. jejuni*.

The aim of this study was evaluate factors that can influence the biofilm formation by *C. jejuni*, as surface, temperature, atmosphere and co-culture with *P. aeruginosa*. We also intended to identify genes involved in biofilm formation by *C.*

*jejuni*, and evaluate the susceptibility of this microorganism to the BME and to the BC.

## 2 Material and methods

### 2.1 Bacterial isolates

Seven *C. jejuni* isolates from the culture collection of the Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DCTA/FAEM/UFPel), isolated between June and August of 2014 (Oliveira, 2016), were tested. The Table S1 in the supplemental material shows the source of the isolates in the poultry slaughter line. The seven isolates belong to different genotypic profiles, classified according to the Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Oliveira, 2016). Before the tests, the isolates stored at -80 °C in freezing media, and the reference strain *C. jejuni* ATCC 33291, were grown in Petri dishes with blood agar base n° 2 (BA2, Acumedia®, Lansing, Miami, USA) supplemented with 5 % (v/v) of defibrinated horse blood. The plates were incubated at 42 °C for 48 h in microaerophilic conditions (5% oxygen, 10% carbon dioxide, and 85% nitrogen, White Martins®) in anaerobic jars. After incubation, typical colonies were grown again in BA2 plates, and incubated in the same conditions for 24 h. The strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *P. aeruginosa* ATCC 15442 also used for the tests, were grown in Tryptic Soy agar (TSA, Kasvi®, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) and incubated at 37 °C for 24 h.

### 2.2 Inoculum preparation

The inoculums were prepared before the tests. The colonies of the BA2 plates after 24 h of incubation were suspended in 5 mL of phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2) and the optical density (OD) at 595 nm was adjusted in a ELISA Plate Analyzer reader microplate (Robonick®, readwell PLATE) to an approximate value of 0.250, equivalent to a cell concentration of  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>.

### 2.3 Biofilm formation in polystyrene

The ability of biofilm formation of seven *C. jejuni* isolates was determined according Reeser et al. (2007), with modifications. The inoculum at  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> was diluted in Mueller-Hinton broth (MHB, Difco®, Livonia, Miami, USA) to a  $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup> final cell concentration. 96-well microtiter plates (CralPlast®, Cotia, São Paulo, Brazil)

were used, which were filled with MHB and the standard inoculum in a 1:9 proportion. The reference strain of *S. aureus* was used as positive control, and wells with just MHB was the negative control. The plates were then incubated under aerobic or microaerophilic conditions, at 7 °C, 25 °C or 42 °C, totalizing six treatments, for six days (Teh et al., 2017).

To determinate the capacity of *C. jejuni* to form dual-species biofilms, *P. aeruginosa* was used as co-culture with the isolates of *C. jejuni*. The standardized inoculum of *P. aeruginosa* was added along with *C. jejuni* inoculums in a 1:1 proportion, and a final 1:9 proportion of mixed inoculum:medium. To evaluate if *C. jejuni* can attach in preformed biofilms, *P. aeruginosa* was incubated in microtiter plates at 37 °C for 24 h. Then, the medium was removed, and a new MHB was added, along with the inoculum of each isolate of *C. jejuni*. The plates were then incubated under aerobic conditions at 7 °C or 25 °C, totalizing four treatments (concomitant inoculation and inoculation in preformed biofilm of *P. aeruginosa*), for six days. The assays were performed in triplicate and three biological replicates.

Biofilm formation was determined using the crystal violet staining method as described by Stepanovic et al. (2007), with modifications. Briefly, after the incubation period, the medium containing unattached planktonic cells was removed from the plates and the wells were washed three times with 210 µL of PBS. Then, was added 150 µL of methanol for 20 min (Synth®, Diadema, São Paulo, Brazil) and dried at 25 °C for 1 h for fixation of the biofilm. After, the wells were stained with crystal violet (CV, Pró-Cito®, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil) for 15 min. The colorant was discarded and three subsequent washes were performed with distilled water to remove excess of stain, and the plates were dried for 1 h at 37 °C. The bound CV was decolourised with ethanol 92 °GL for 30 min. The absorbance of the solubilized dye of each well was measured at 550 nm to determine the biofilm formation.

## 2.4 Biofilm formation in stainless steel

To evaluate the biofilm formation potential of the *C. jejuni* isolates in stainless steel, AISI 304#4 stainless steel coupons (0.366 mm roughness, square, 10 mm:10 mm:1 mm) were used. Before use, the coupons were washed with a neutral detergent, rinsed with distilled water, immersed in 70% (v/v) ethanol for 1 h at room temperature, rinsed again with distilled water, individually placed in glass tubes containing 9 mL of MHB and sterilised at 121 °C for 15 min (Parizzi et al, 2004).

The biofilm formation of *C. jejuni* isolates were carried out according to the method described by Kostaki et al. (2012), with modifications. The inoculum at  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> was diluted in MHB to a  $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup> final cell concentration. Then, 1 mL of the standardized inoculum of each isolate was added in the glass tubes containing sterilised coupons and 9 mL of MHB, and incubated under microaerophilic or aerobic conditions at 7 °C or 25 °C, totalizing four treatments, for six days, with renewal of growth medium and inoculum every 48 h. To the dual-species biofilm formation, 0.5 mL of the standardized inoculum of *P. aeruginosa* was added concomitant to 0.5 mL of each *C. jejuni* isolate inoculum in each glass tube with the coupons and MHB. Coupons with preformed biofilms of *P. aeruginosa*, incubated for 24 h at 37 °C, were also inoculated with *C. jejuni* isolates. All the glass tubes were incubated under aerobic conditions at 7 °C or 25 °C, totalizing four treatments, for six days, also with renewal of growth medium and inoculum every 48 h. The tests were performed in three biological replicates.

After incubation period, the biofilm formation was evaluated by agar plating. The coupons were removed of the glass tubes and submitted to 1 min in 5 mL of peptoned water 0,1% (PW, bacteriological peptone, Acumedia®, Lansing, Miami, USA), to remove the planktonic cells. Then, the coupons were placed in a tube containing 10 mL of PW and submitted to vortex for 2 min (to remove the sessile cells). Serial decimal dilutions were prepared from suspension and plated onto Columbia agar plates (Oxoid®, Basingstoke, Hampshire, UK), which were incubated in microaerophilic conditions at 42 °C for 48 h for posterior counting of *C. jejuni* colonies. For the dual-species tests, the dilutions were also plated onto TSA plates and incubated at 37 °C for 24 h under aerobic atmosphere.

## **2.5 DNA extraction and detection of genes involved in biofilm formation by Polymerase Chain Reaction**

The DNA extraction of the isolates was performed according to the protocol proposed by Green and Sambrook (2012), with modifications. Genomic DNA of each isolate was extracted from one plate of microaerophilic 24 h culture grown in BA2. The extracted DNA was quantified using a NanoVue™ Plus quantitative spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK).

The amplification reactions were performed using 12.5 µL of 2x GoTaq Colorless Master Mix (Promega®, Madison, Wisconsin, USA), 10 pmol.µL<sup>-1</sup> of each

primer and 10 ng of genomic DNA. The PCR was performed in a thermocycler (MJ Research PTC-100 Thermal Cycler®) using standardized cycling parameters: 95 °C for 1 min for initial denaturation, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, variable annealing (Table S2 of the supplemental material) for 1 min, primer extension step at 72 °C for 1 min, and final extension step at 72 °C for 5 min. The results were obtained by electrophoresis on 1.5% agarose gel, using 1 Kb DNA ladder molecular weight marker (Invitrogen®, Waltham, Massachusetts, USA). DNA bands were stained with GelRed (Biotium®, Fremont, California, USA) and visualized using a transilluminator L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia®, Cotia, São Paulo, Brazil).

The lengths of the expected PCR products are also shown in Table S2 in the supplemental material. As positive control, the strains *C. jejuni* 100 and *C. jejuni* 104 deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession numbers CP023446 and CP023343, respectively, were used. A mixture without the addition of DNA was incorporated as negative control of the reaction.

## **2.6 Antibacterial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. methanolic extract**

To evaluate if the BME have antibacterial activity against *C. jejuni*, the qualitative agar disc diffusion method was employed (Bauer et al., 1966). Standardized inoculums at  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> of seven isolates and the reference strain of *C. jejuni* were spotted in Petri dishes with MH agar (Kasvi®, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil), supplemented with 5% (v/v) of defibrinated horse blood. Then, sterilised paper filter discs (6 mm) were impregnated with 20 µL of BME and placed on the agar. The plates were incubated at 42 °C for 48 h under microaerophilic conditions. Standard erythromycin discs (15 µg) were used as positive control and sterilised water was used as negative control, also impregnated in the paper filter discs. The test was performed in two biological replicates.

## **2.7 Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of *Butia odorata* Barb. Rodr. methanolic extract and benzalkonium chloride**

Minimum inhibitory concentration (MIC) of the BME was evaluated according to Weerakkody et al. (2010), with modifications. The BME was tested at concentrations of 333.3, 166.6, 83.3, 41.6, 20.8, 10.4, 5.2 and 2.6 µL.mL<sup>-1</sup>. In 96-well microtiter plates with MHB and predetermined concentrations of BME, were added

the inoculums of *C. jejuni* isolates and the reference strain at  $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>. The plates were incubated at 42 °C for 24 h under microaerophilic conditions. The MIC of the BC was also evaluated, performed according the method described by Mavri and Možina (2012). The concentrations of BC tested were 4, 2, 1, 0.512, 0.256, 0.128, 0.064, 0.032 and 0.016 µg.mL<sup>-1</sup>. The microtiter plates were filled as described above for the BME test, and incubated at the same conditions. Inoculum without BME and BC were used as positive control, and uninoculated medium without BME and BC was used as negative control. MIC tests were performed in two biological replicates. After 24 h of incubation, 100 µL from wells without visible microbial growth were plated onto Columbia plates and incubated at 42 °C for 48 h under microaerophilic conditions for posterior counting. After incubation period, minimum bactericidal concentration (MBC) was defined as the lowest compounds concentration at which all cells inoculated were killed.

## 2.8 Statistical analysis

Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test ( $p < 0.05$ ) using SAS® Platform University Edition.

## 3 Results

### 3.1 Biofilm formation in polystyrene

Biofilm formation on polystyrene by seven *C. jejuni* isolates and by *C. jejuni* ATCC 33291 incubated for six days is shown in Figure 1. No significant differences were detected in biofilm formation between aerobic (Figure 1-a) and microaerophilic (Figure 1-b) conditions in monospecies biofilm of *C. jejuni* ( $p < 0.05$ ). However, there was a significant difference in biofilm formation between the tested temperatures in aerobic conditions for the majority of isolates (5/7) and for the reference strain ( $p < 0.05$ ). The biofilm formation was higher at 25 °C than at 42 °C for four isolates in monospecies biofilms ( $p < 0.05$ ). At 7 °C the biofilm formation was also higher than at 42 °C for four isolates. Under microaerophilic atmosphere, just for one isolate (isolate 5) there was significant difference between temperatures.

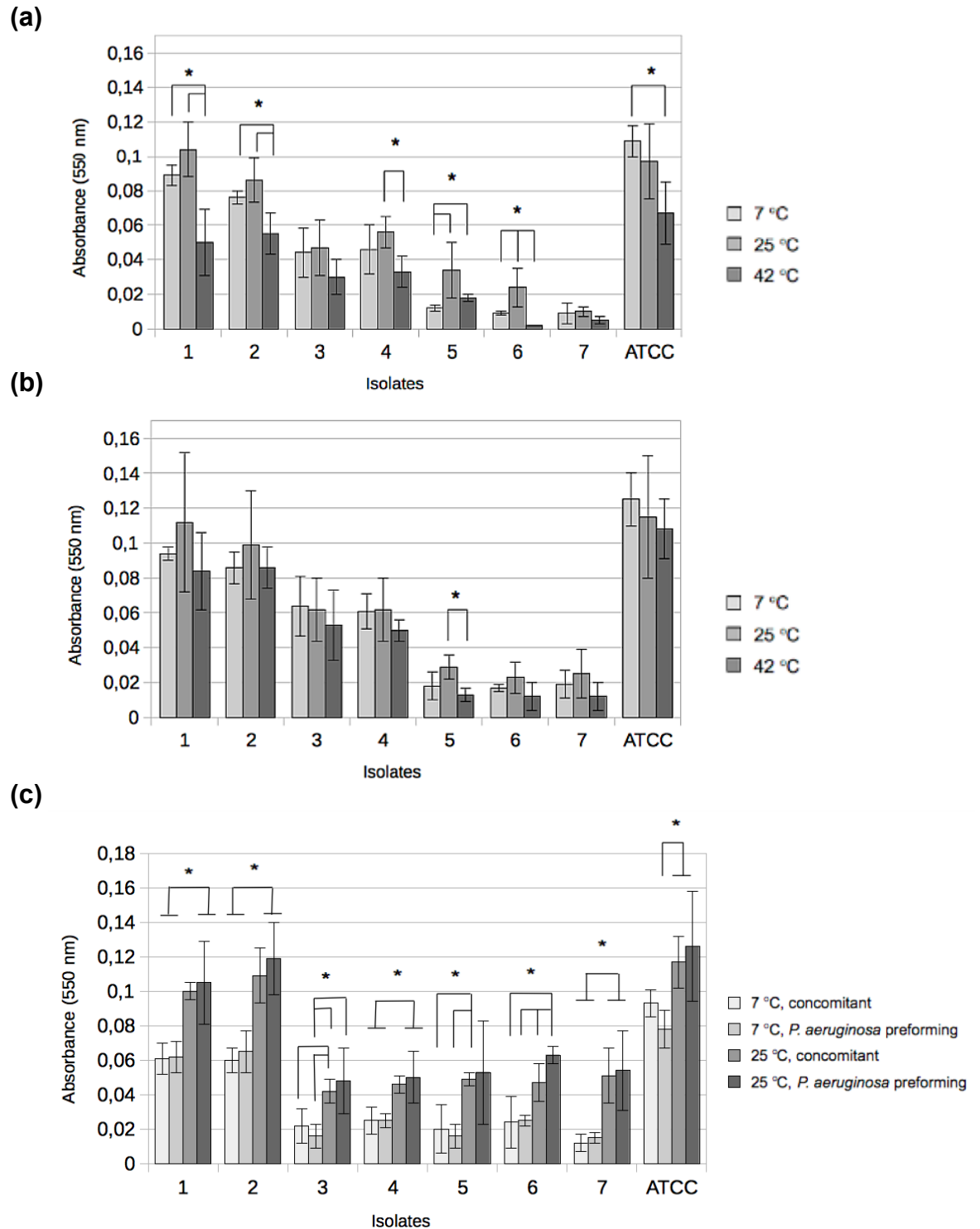


Figure 1: Comparison of biofilm formation on polystyrene by seven *C. jejuni* isolates and *C. jejuni* ATCC 33291 in (a) aerobic monospecies biofilm, (b) microaerophilic monospecies biofilm and (c) dual-species biofilm, incubated for 6 days. The absorbance values are the differences between the absorbance of the negative control (uninoculated medium) and the wells that contained media inoculated with bacteria. All results are presented as mean  $\pm$  SD where  $n = 3$ ; Symbol \* indicates significant differences in biofilm formation under different temperatures within the same bacteria where  $p < 0.05$  according to Tukey test

There was significant difference in the biofilm formation in co-culture with *P. aeruginosa* among the seven isolates at different temperatures (Figure 1-c) ( $p < 0.05$ ). The biofilm formation was enhanced at 25 °C than at 7 °C for five of the seven isolates. However, the ways of inoculation of *P. aeruginosa* (concomitant with *C. jejuni* or preformation by *P. aeruginosa*), at the same temperature within the same isolate caused no significant difference in the biofilm formation for all seven isolates ( $p < 0.05$ ). For both monospecies and dual-species biofilms, the reference strain had the largest values of OD, followed by the isolates 1 and 2.

### 3.2 Biofilm formation in stainless steel

The results of biofilm formation on stainless steel coupons are shown in Table 1. In monospecies biofilm, the cells count of the biofilm formed at 25 °C was significantly higher than at 7 °C ( $p < 0.05$ ). Comparing the atmosphere conditions within the same temperature, no statistical difference was detected in biofilm formation under aerobic or microaerophilic atmosphere at 7 °C for the isolates 2, 3, 5 and 6 ( $p < 0.05$ ). In this temperature, the isolate 1 formed more biofilm under aerobic condition, and the isolates 4 and 7 formed more biofilm at microaerophilic atmosphere. However, at 25 °C no significant difference was found between aerobic and microaerophilic conditions in the biofilm formation for the isolates 2, 3, 4 and 6 ( $p < 0.05$ ). In this temperature, the isolate 1 also formed more biofilm under aerobic condition, and the isolates 5 and 7 formed more biofilm at microaerophilic atmosphere.

In the case of dual-species biofilms, there was significant difference between the temperatures tested to the most isolates, but not between concomitant and preformation of *P. aeruginosa* biofilms within the same temperature ( $p < 0.05$ ). The biofilm formation was higher with biofilm preformed by *P. aeruginosa* for the isolates 4 and 6, at 7 °C and 25 °C, respectively.

The isolates 1 and 2 had a significantly higher biofilm formation at 25 °C under aerobic atmosphere in monospecies biofilm than in co-culture with *P. aeruginosa* ( $p < 0.05$ ). On the other hand, all seven isolates had a higher biofilm formation at 7 °C in dual-species biofilm (either in concomitant growth or in preformed biofilm of *P. aeruginosa*) than in monospecies biofilm under aerobic condition.

Table 1. Biofilm formation in stainless steel coupons by seven *Campylobacter jejuni* isolates

| Biofilm formation (log CFU.cm <sup>2</sup> )   |                   |                   |                  |                  |                   |                  |                  |                                   |
|------------------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------------------------|
| Monospecies biofilm                            | Isolates          |                   |                  |                  |                   |                  |                  | <i>C. jejuni</i><br>ATCC<br>33291 |
|                                                | 1                 | 2                 | 3                | 4                | 5                 | 6                | 7                |                                   |
|                                                |                   |                   |                  |                  |                   |                  |                  |                                   |
| 7 °C, aerobic                                  | 3,70<br>± 0,00 b  | 4,00<br>± 0,12 a  | 4,54<br>± 0,01 a | 0,00<br>± 0,00 a | 0,00<br>± 0,00 a  | 5,31<br>± 0,15 a | 4,40<br>± 0,09 a | 4,00<br>± 0,02 b                  |
| 7 °C, microaerophilic                          | 0,00<br>± 0,00 a  | 3,70<br>± 0,06 a  | 4,70<br>± 0,48 a | 6,70<br>± 0,06 c | 0,00<br>± 0,00 a  | 5,23<br>± 0,19 a | 5,70<br>± 0,17 b | 0,00<br>± 0,00 a                  |
| 25 °C, aerobic                                 | 10,56<br>± 0,00 e | 10,85<br>± 0,00 d | 8,54<br>± 0,50 c | 7,70<br>± 0,11 d | 8,00<br>± 0,32 c  | 7,70<br>± 0,17 b | 7,70<br>± 0,04 c | 8,23<br>± 0,18 d                  |
| 25 °C, microaerophilic                         | 9,00<br>± 0,33 d  | 10,88<br>± 0,01 d | 9,70<br>± 0,06 c | 8,54<br>± 0,10 d | 10,04<br>± 0,21 d | 7,70<br>± 0,06 b | 9,92<br>± 0,32 d | 10,24<br>± 0,24 e                 |
| Dual-species biofilm                           |                   |                   |                  |                  |                   |                  |                  |                                   |
| 7 °C, concomitant                              | 6,67<br>± 0,49 cd | 6,35<br>± 0,01 b  | 6,30<br>± 0,04 b | 5,61<br>± 0,01 b | 5,00<br>± 0,40 b  | 6,84<br>± 0,46 b | 5,57<br>± 0,67 b | 5,96<br>± 0,02 c                  |
| 7 °C, preformation by<br><i>P. aeruginosa</i>  | 6,89<br>± 0,01 c  | 6,90<br>± 0,01 b  | 6,41<br>± 0,01 b | 6,88<br>± 0,05 c | 6,11<br>± 0,05 b  | 6,79<br>± 0,10 b | 6,10<br>± 0,08 b | 6,04<br>± 0,00 c                  |
| 25 °C, concomitant                             | 7,97<br>± 0,44 d  | 9,26<br>± 0,40 c  | 8,89<br>± 0,52 c | 8,37<br>± 0,31 d | 7,98<br>± 0,13 c  | 7,79<br>± 0,01 b | 8,81<br>± 0,06 d | 8,20<br>± 0,06 d                  |
| 25 °C, preformation by<br><i>P. aeruginosa</i> | 8,63<br>± 0,03 d  | 8,94<br>± 0,26 c  | 8,92<br>± 0,15 c | 7,70<br>± 0,16 d | 8,10<br>± 0,05 c  | 8,23<br>± 0,00 c | 7,41<br>± 0,06 c | 8,81<br>± 0,01 d                  |

\* All results are presented in mean ± SD where n = 3; same letters in the column indicate no significant difference between the samples where p < 0.05 in the Tukey test.

### 3.3 Identification of genes related to biofilm formation in *Campylobacter jejuni*

Seven isolates (100%) presented the flagella genes (*flaAB*), quorum sensing gene (*luxS*), oxidative response stress genes (*ahpC<sup>m</sup>*, *sodB* and *docA*), adherence (*cadF*) and heat shock response (*clpP*, *dnaJ* and *racR*). The *katA* gene, which codifies for catalase enzyme, was detected in four isolates (3, 4, 5 and 6), and capsular polysaccharide gene *kpsM* was found in all isolates, with except of the isolate 6.

### 3.4 Antibacterial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. methanolic extract (BME), minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of BME and benzalkonium chloride

The results of the antibacterial activity qualitative test of BME, as well the MIC and MBC values of BME and BC are shown in Table 2.

Table 2. Inhibition zones induced by *Butia odorata* Barb. Rodr. methanolic extract (BME), minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of BME and benzalkonium chloride (BC) in seven *Campylobacter jejuni* isolates

| Isolates                    | Inhibition zone diameter (mm) | BME ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) |       | BC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |     |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|------------------------------|-----|
|                             |                               | MIC                           | MBC   | MIC                          | MBC |
| 1                           | 26 $\pm$ 5,7                  | 83,3                          | 83,3  | 1                            | 4   |
| 2                           | 26,5 $\pm$ 0,7                | 166,6                         | 166,6 | 2                            | 2   |
| 3                           | 25 $\pm$ 0                    | 166,6                         | 166,6 | 1                            | 4   |
| 4                           | 23,5 $\pm$ 2,1                | 166,6                         | 166,6 | 1                            | 2   |
| 5                           | 24 $\pm$ 2,8                  | 166,6                         | 166,6 | 1                            | 1   |
| 6                           | 24 $\pm$ 1,4                  | 166,6                         | 166,6 | 1                            | 2   |
| 7                           | 25,5 $\pm$ 3,5                | 166,6                         | 166,6 | 1                            | 2   |
| <i>C. jejuni</i> ATCC 33291 | 24 $\pm$ 4,2                  | 333,3                         | 333,3 | 1                            | >4  |

\* All results are presented in mean  $\pm$  SD where n = 2.

The MIC value of BME was 83,3  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  for the isolate 1, and 166,6  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  for the other six isolates. The MBC of the BME was the same value of the MIC for all isolates and for *C. jejuni* reference strain.

The MIC value of BC was 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for all isolates, with the exception of the isolate 2, which MIC was 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The MBC was the same value of MIC just for the isolates 2 and 5. For the isolates 4, 6 and 7 the MBC was 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , for the isolates 1 and 3 the MBC was 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , and *C. jejuni* reference strain was not inhibited even at the highest tested concentration of BC (4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

## 4 Discussion

After the evaluation of the biofilm formation by seven *C. jejuni* isolates on polystyrene, it was observed that they formed biofilm under different conditions. The atmosphere did not influenced the monospecies biofilm formation on that surface, because the values of absorbance, either in aerobic and in microaerophilic conditions, were very similar, without statistical differences. This is matter of concern, since *C. jejuni* is a microaerophilic bacteria, which in the first instance, would not survive in environments with high levels of oxygen. Thus, *C. jejuni* becomes a pathogen of great importance, since it has the capacity to survive in aerobic environments and to maintain itself through the biofilm formation. Bronnec et al. (2016) also have found that the values of biofilm formation on polystyrene did not differ between aerobiosis and microaerophilic atmosphere.

The temperature was a factor extremely significant to the biofilm formation by *C. jejuni*, either in monospecies and in duo-species biofilm. The monospecies biofilm formation in polystyrene was higher at 25 °C than at 7 °C and at 42 °C, which is the optimal temperature of growth for *C. jejuni*. This fact is extremely relevant since proves that this pathogen survives through biofilms in response to the environmental stress and conditions that are not optimal for it. *Campylobacter jejuni* isolates formed biofilm at 7 °C, that are the temperature commonly used in cutting rooms of poultry slaughterhouses where the poultry carcasses are manipulated. In addition, the *C. jejuni* isolates formed biofilm at room temperature (25 °C), therefore, can form biofilm in any food industry environment. Few studies evaluated the biofilm formation of *C. jejuni* in temperatures lower than 42 °C and 37 °C. Reeser et al. (2007) showed that the biofilm formation by *C. jejuni* was higher at 37 °C compared to 25 °C, the opposite of the found in this study.

In dual-species biofilm, the biofilm formation was significantly higher at 25 °C than in 7 °C, and there was no difference in biofilm formation by the *C. jejuni* isolates with concomitant inoculation of *P. aeruginosa*, and the induction of biofilm preformed by *P. aeruginosa*. Culotti and Packman (2015) showed that both co-inoculation with *P. aeruginosa* or deposition on pre-established *P. aeruginosa* biofilms facilitate the growth *C. jejuni* growth in biofilms. In the same study, the authors also demonstrated that the *C. jejuni* tested were not capable to form monospecies biofilm in polycarbonate surfaces (Culotti and Packman, 2015), demonstrating that the biofilm formation is a strain-dependent characteristic.

In the case of biofilm on stainless steel, more biofilm was formed at 25 °C than at 7 °C, both in monospecies and duo-species biofilms. This result is in agreement with Nguyen et al. (2012), who described that the biofilm formation by *C. jejuni* in stainless steel is enhanced with highest temperatures. In stainless steel, the atmosphere condition (aerobiosis or microaerophilic) also did not interfere in the monospecies biofilm formation at the same temperature for four isolates (2, 3, 5 and 6 at 7 °C, and the isolates 2, 3, 4 and 6 at 25 °C). Already for the isolate 1, the biofilm formation was higher under aerobic atmosphere in both temperature tested, while the isolate 7 had higher biofilm formation at microaerophilic conditions also for both temperature tested.

The biofilm formation by the isolates 1 and 2 at 25 °C under aerobiosis was higher when in monoculture biofilm than when in co-culture with *P. aeruginosa* at the

same conditions. The different behaviour between some isolates under the same treatment conditions can indicate that the source of the isolate also can be a determinant factor in the biofilm formation profile of the isolates.

Regarding to the genes involved in biofilm formation of *C. jejuni*, we can suggest that the absence of the *kata* gene in the isolates 1, 2 and 7, and the absence of the *kpsM* gene in the isolate 6 did not interfere in the capacity of these isolates to form biofilms at different conditions, not being crucial genes for the biofilm formation in *C. jejuni* isolates. Joshua et al. (2006) evaluated the biofilm formation of *C. jejuni* strains mutants for the *kpsM* gene, and observed that the mutants can form biofilms even without this.

The inhibition diameters of the BME tested against *C. jejuni* isolates were very similar to the halos obtained by other Gram-negative bacteria submitted at the same extract (Maia et al., 2017). The mean of the inhibition halos for *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* and *E. coli* O157:H7 was  $24 \pm 3,0$  mm, while the mean of the halos for the isolates tested in this study was  $24,8 \pm 2,55$  mm. The results are promising since it is extremely important the development of new compounds with antibacterial activity against Gram-negative bacteria, such as *C. jejuni*.

The MIC values for the BME tested against *C. jejuni* isolates also were the same values of MBC for the seven isolates. This means that the minimum concentration of BME that inhibits the bacteria, also is capable to kill all the cells of the medium. The MIC values for BC ranged between 1 and  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . These values were also found in strains of *C. jejuni* in the study developed by Mavri and Možina (2013). The MBC values ranged between 1 and  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . For the most isolates, the MBC was the double or even the quadruple of the MIC value, and for *C. jejuni* ATCC 33291, not even the most concentration tested of BC was able to kill the cells.

## Conclusions

*Campylobacter jejuni* isolates from poultry slaughterhouse are capable to form biofilm in polystyrene and stainless steel, under temperatures not optimal for it, and even under aerobiosis. The atmosphere is not a relevant factor on the biofilm formation in polystyrene, and there was more biofilm formation in temperatures not optimal for *C. jejuni* growth. In general, the ways of inoculation (concomitant or preformed by *P. aeruginosa*) in dual-species biofilms with *C. jejuni* did not affect the biofilm formation. In stainless steel, more biofilm was formed at 25 °C, and the

atmosphere also did not affected the monospecies biofilm formation. Of the evaluated genes, all the isolates presented 10 genes involved in biofilm formation. In another hand, *katA* and *kpsM* genes were not found in three and one isolate, respectively. The BME showed antibacterial activity against *C. jejuni*. Therefore, it can be a promising compound to be used in sanitization step of food industry in alternative to synthetic sanitizers, as BC.

### Acknowledgments:

The authors wish to thank to National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (483807/2012-5; 162947/2014-3).

### References

- Atack, J. M., Kelly, D. J., 2009. Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: responses, resistance and regulation. *Fut. Microbiol.* 4, 677-690. doi: 10.2217/fmb.09.44
- Bacon, D. J., Szymanski, C. M., Burr, D. H., Silver, R. P., Alm, R. A., Guerry, P., 2001. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Mol. Microbiol.* 40, 769-777.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardizing single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 4, 493-496.
- Bronnec, V., Turonova, H., Bouju, A., Cruveiller, S., Rodrigues, R., Demnerova, K., Tresse, O., Haddad, N., Zagorec, M., 2016. Adhesion, biofilm formation, and genomic features of *Campylobacter jejuni* Bf, an atypical strain able to grow under aerobic conditions. *Front. Microbiol.* 7:1002. doi: 10.3389/fmicb.2016.01002
- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A., 2012. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds - a critical review. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 39, 381-389. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.011.
- Culotti, A., Packman, A. I., 2015. *Pseudomonas aeruginosa* facilitates *Campylobacter jejuni* growth in biofilms under oxic flow conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91. doi: 10.1093/femsec/fiv136.
- Feng, J., Lamour, G., Xue, R., Mirvakli, M. N., Hatzikiriakos, S. G., Xu, J., Li, H., Wang, S., Lu, X. 2016. Chemical, physical and morphological properties of bacterial biofilms affect survival of encased *Campylobacter jejuni* F38011 under aerobic stress. *Int. J. Food Microbi.* 238, 172-182. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.008.
- Golz, G., Sharbati, S., Backert, S., Alter, T., 2012. Quorum sensing dependent phenotypes and their molecular mechanisms in Campylobacterales. *Europ. J. Microbiol. Immun.* 2, 50-60. doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.1.8.
- Green, M. R., Sambrook, J., 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press, 4<sup>a</sup> edition.
- Gunther, N. W., Chen, C. Y., 2009. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. *Food Microbiol.* 26, 44–51. doi: 10.1016/j.fm.2008.07.012.

- Hegstad, K., Langsrud, S., Lunestad, B. T., Scheie, A. A., Sunde, M., 2010. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microbial. Drug. Resist.* 16, 91-104. doi: 10.1089/mdr.2009.0120.
- Hendrixson, D. R., DiRita, V. J., 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol. Microbiol.* 52, 471-484. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.03988.x.
- Ica, T., Caner, V., Istanbulu, O., Nguyen, H. D., Ahmed, B., Call, D. R., Beyenal, H., 2012. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1033-1038. doi: 10.1128/AEM.07364-11.
- Joshua, G. W. P., Guthrie-Irons, C., Karlishhev, A. V., Wren, B. W., 2006. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiol.* 152, 387-396. doi: 10.1099/mic.0.28358-0.
- Kalmokoff, M., Lanthier, P., Tremblay, T-L., Foss, M., Lau, P. C., Sanders, G., Austin, J., Kelly, J., Szymanski, C. M., 2006. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 188, 4312-4320. doi: 10.1128/JB.01975-05.
- Keevil, C. W., 2003. Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy. *Water Scie. and Technol.* 47, 105-116.
- Konkel, M. E., Kim, B. J., Klena, J. D., Young, C. R., Ziprin, R., 1998. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 66, 3666-3672.
- Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G.-J., Giaouris, E., 2012. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 2586-2595. doi: 10.1128/AEM.07099-11.
- Maia, D. S. V., Aranha, B. C., Chaves, F. C., Silva, W. P. 2017. Antibacterial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extracts. *Trends Phyto. Res.* 1, 3, 169-174.
- Mavri, A., Možina, S. S., 2012. Involvement of efflux mechanisms in biocide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Med. Microbiol.* 61, 800-808. doi: 10.1099/jmm.0.041467-0.
- Mavri, A., Možina, S. S., 2013. Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 304-312. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.006.
- Moore, J. E., Corcoran, D., Dooley, J. S., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D. A., Megraud, F., Millar, B. C., 2005. *Campylobacter*. *Vet. Res.* 36, 351-382. doi:10.1051/vetres:2005012.
- Nguyen, V. T., Fegan, N., Turner, M. S., Dykes, G. A., 2012. Role of attachment to surfaces on the prevalence and survival of *Campylobacter* through food systems. *J. Food Protect.* 75, 195-206. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-012.
- Oh, E., Jeon, B., 2014. Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Plos One*, 9, 7. doi: 10.1371/journal.pone.0087312.
- Oh, E., Jong-Chul, K., Jeon, B., 2016. Stimulation of biofilm formation by oxidative stress in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. *Virul.* 7, 846-851. doi: 10.1080/21505594.2016.1197471.

- Oliveira, Mauricéia Greici de., 2016. *Campylobacter* thermophilic in slaughter line of broilers: occurrence, molecular characterization and virulence profile. 2016. 90 p. Thesis (Doctorate in Science and Food Technology) - Faculty of Agronomy, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil.
- Parizzi, S. Q. F., Andrade, N. J., Soares, N. F. F., Silva, C. A. S., Monteiro, E. A. M. 2004. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. Brazil. Arch. Biol. Technol, 47, 77-83.
- Park, S. F., 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. Int. J. Food. Microbiol. 74, 177–188.
- Plummer, P. J., 2012. LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. Front. Cell. Infec. Microbiol. 2, 22. doi: 10.3389/fcimb.2012.00022.
- Reeser, R. J., Medler, R. T., Billington, S. J., Jost, B. H., Joens, L. A., 2007. Caracterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1908-1913. doi: 10.1128/AEM.00740-06.
- Simões, L. C., Simões, M., Vieira, M. J., 2010. Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. Appl. Environ. Microbiol. 76, 6673-6679. doi: 10.1128/AEM.00872-10.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Apmis. 115, 891-899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x.
- Sulaeman, S., Hernould, M., Schaumann, A., Coquet, L., Bolla, J. M., Dé, E., 2012. Enhanced adhesion of *Campylobacter jejuni* to abiotic surfaces is mediated by membrane proteins in oxygen-enriched conditions. Plos One. 7, e46402. doi: 10.1371/journal.pone.0046402.
- Svensson, S. L., Pryjma, M., Gaynor, E. C., 2014. Flagella-mediated adhesion and extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of *Campylobacter jejuni*. Plos One, 9, e106063. doi: 10.1371/journal.pone.0106063.
- Tam, C.C., O'Brien, S.J., Adak, G.K., Meakins, S.M., Frost, J.A., 2003. *Campylobacter coli* – an important foodborne pathogen. J. Infect. 47, 28–32.
- Teh, K. H., Flint, S., French, N., 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. Int. J. Food Microbiol. 143, 118-124. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.037.
- Teh, K. H., Lee, S. M., Dykes, G. A., 2017. The influence of dissolved oxygen level and medium on biofilm formation by *Campylobacter jejuni*. Food Microbiol. 61, 120-125. doi: 10.1016/j.fm.2016.09.008.
- Trachoo, N., Frank, J., Stern, N., 2002. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. J. Food Protect. 65, 1110-1116.
- Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, M. S., Dykes, G. A., 2010. *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. Food Cont., 21, 1408–1414.
- WHO. Estimates of the global burden of foodborne diseases. Geneva, Switzerland. Available at: [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/ferg/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/), accessed January 30, 2018.

## Supplemental material

**Table S1.** Source of the *Campylobacter jejuni* isolates analysed

| Isolates ID (PFGE profile) | Collect        | Resistance profile  | Virulence genes                     | Source in slaughter line   |
|----------------------------|----------------|---------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 1                          | Second collect | Enro, Nal           | <i>cadF, ciaB, cdtA, cdtB, cdtC</i> | Poultry after bleeding     |
| 2                          | First collect  | Enro, Nal, Cipro    | <i>cadF, ciaB, cdtA, cdtB, cdtC</i> | After chiller water        |
| 3                          | Second collect | Enro, Nal, Dox, Tet | <i>cadF, ciaB, cdtA, cdtB, cdtC</i> | Poultry after evisceration |
| 4                          | Second collect | Enro, Nal           | <i>cadF, ciaB, cdtA, cdtB, cdtC</i> | Cecum                      |
| 5                          | Second collect | Susceptible         | <i>cadF, ciaB, cdtA, cdtB, cdtC</i> | Poultry after chiller      |
| 6                          | Second collect | Enro, Nal           | <i>cadF, ciaB, cdtA, cdtB, cdtC</i> | Liver                      |
| 7                          | First collect  | Susceptible         | <i>cadF, ciaB, cdtA, cdtB, cdtC</i> | Poultry after scald        |

\*Enro: enrofloxacin; Nal: nalidixic acid; Cipro: ciprofloxacin; Dox: doxycyclin; Tet: tetracyclin

**Table S2.** List of oligonucleotides used in this study

| Target gene             |          | Sequence (5' → 3')                                     | PCR product (pb) | Annealing temperature (°C) | Reference                      |
|-------------------------|----------|--------------------------------------------------------|------------------|----------------------------|--------------------------------|
| <i>ahpC<sup>m</sup></i> | fw<br>rv | CATGATAGTTACTAAAAAGCTTTAG<br>GTTAAAGTTTAGCTTCGTTTTTGCC | 599              | 55                         | Oh and Jeon (2014)             |
| <i>cadF</i>             | fw<br>rv | TTGAAGGTAATTTAGATATG<br>CTAATACCTAAAGTTGAAAC           | 400              | 45                         | Konkel et al. (1999)           |
| <i>clpP</i>             | fw<br>rv | TGGGAGCATTTTTGCTTAGTTG<br>CTCCACCTAAAGGTTGATGAATCAT    | 90               | 50                         | Ghunaim et al. (2015)          |
| <i>dnaJ</i>             | fw<br>rv | ATTGATTTTGCTGCGGGTAG<br>ATCCGCAAAGCTTCAAAAA            | 177              | 55                         | Chansiripornchai et al. (2009) |
| <i>docA</i>             | fw<br>rv | ATAAGGTGCGGTTTTGGC<br>GTCTTTGCAGTAGATATG               | 725              | 55                         | Muller et al. (2006)           |
| <i>flaA</i>             | fw<br>rv | GGATGGCGATAGCAGATAGTTT<br>CTCATCCATAGCCTTATCAGCA       | 113              | 50                         | Chaisowwong et al. (2012)      |
| <i>flaB</i>             | fw<br>rv | ACACCAACATCGGTGCATTA<br>CATCCCTGAAGCATCATCTG           | 128              | 50                         | Chaisowwong et al. (2012)      |
| <i>katA</i>             | fw<br>rv | CTGAACGCGATGTGAGAGGT<br>TCACTTCGCTTTTTGCACGA           | 774              | 50                         | Koolman et al. (2015)          |
| <i>kpsM</i>             | fw<br>rv | AGCAAAGGACGAGGAGTTAGC<br>TATGGGTAGTTGGGGAGCCT          | 517              | 45                         | Koolman et al. (2015)          |
| <i>luxS</i>             | fw<br>rv | AAAATGCCAGCTCCTGCTGT<br>GTGCGACAACCCATAGGTGA           | 218              | 45                         | Koolman et al. (2016)          |
| <i>racR</i>             | fw<br>rv | GATGATCCTGACTTTG<br>TCTCCTATTTTACCC                    | 584              | 45                         | Datta et al. (2003)            |
| <i>sodB</i>             | fw<br>rv | AAGTACAGGCTGTGGCTGTG<br>AAATAAGCAGGGCGTGCATTG          | 300              | 45                         | Koolman et al. (2015)          |

\**ahpC<sup>m</sup>*: primer for detect the *ahpC* mutant gene; fw: forward primer; rv: reverse primer

## References

- Chaisowwong, W., Kusumoto, A., Hashimoto, M., Harada, T., Maklon, K., Kawamoto, K., 2012. Physiological characterization of *Campylobacter jejuni* under cold stresses conditions: its potential for public threat. J. Vet. Med. Sci. 74, 43-50.
- Chansiripornchai, N., Sasipreeyajan, J., 2009. PCR detection of four virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilities of adhesion to and invasion of INT-407 cells. J. Vet. Med. Sci. 71, 839-844.
- Datta, S., Niwa, H., Itoh, K., 2003. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. J. Med. Microbiol. 52, 345-348. doi: 10.1099/jmm.0.05056-0.
- Gunhaim, H., Behnke, J. M., Aigha, I., Sharma, A., Doiphode, S. H., Deshmukh, A., Abu-Madi, M. M., 2015. Analysis of resistance to antimicrobials and presence of virulence/stress response genes in *Campylobacter* isolates from patients with severe diarrhoea. Plos One. 10, 3, 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0119268
- Konkel, M. E., Gray, S. A., Kim, B. J., Garvis, S. G., Yoon, J., 1999. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. J. Clin. Microbiol. 37, 510-517.
- Koolman, L., Whyte, P., Burgess, C., Bolton, D., 2015. Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. Foodb. Pathog. Diseas.. 12, 9. doi: 10.1089/fpd.2014.1883.
- Koolman, L., Whyte, P., Burgess, C., Bolton, D., 2016. Virulence gene expression, adhesion and invasion of *Campylobacter jejuni* exposed to oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Int. J. Food Microbiol. 2, 33-38. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.002.
- Müller, J., Schulze, F., Müller, W., Hänel, I., 2006. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. Vet. Microbiol. 113, 123-129. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.029.
- Oh, E., Jeon, B., 2014. Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. Plos One, 9, 7. doi: 10.1371/journal.pone.0087312.

#### 4 Considerações finais

*Campylobacter jejuni* isolados de abatedouro de frangos são capazes de formar biofilme sob diferentes condições de temperatura e atmosfera, bem como formar biofilme duo-espécie com *P. aeruginosa*.

Os sete isolados de *C. jejuni* avaliados possuem 10 genes relacionados à formação de biofilme, quatro isolados possuem o gene *katA* e seis isolados possuem o gene *kpsM*. Estudos futuros são necessários para avaliar a expressão desses genes no processo de formação de biofilme, e também se há outras proteínas envolvidas.

O extrato metanólico de *Butia odorata* possui atividade antibacteriana contra *C. jejuni*, podendo ser uma alternativa promissora ao uso de sanitizantes sintéticos na indústria de alimentos, como o cloreto de benzalcônio.

## Referências

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412p.

ATAK, J. M.; KELLY, D. J. Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: responses, resistance and regulation. **Future Microbiology**, v. 4, p. 677-690, 2009.

ATHAIDE, A. **Sistemas GMP e HACCP garantem produção de alimentos inócuos**. Engenharia de Alimentos, v. 5, n. 23, 1999.

BACON, D. J.; SZYMANSKI, C. M.; BURR, D. H.; SILVER, R. P.; ALM, R. A.; GUERRY, P. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 769-777, 2001.

BARRERO-TOBON, A. M.; HENDRIXSON, D. R. Flagellar biosynthesis exerts temporal regulation of secretion of specific *Campylobacter jejuni* colonization and virulence determinants. **Molecular Microbiology**, v. 93, n. 5, p. 957-974, 2014.

BATZ, M. B.; HOFFMANN, S.; MORRIS, J. G. Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 1278-1291, 2012.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardizing single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 1-20, 2004.

BERTASI, B.; LOSIO, M. N.; DAMINELLI, P.; FINAZZI, G.; SERRAINO, A.; PIVA, S.; GIACOMETTI, F.; MASSELLA, E.; OSTANELLO, F. Seasonal variability of thermophilic *Campylobacter* spp. in raw milk sold by automatic vending machines in Lombardy region. **Italian Journal of Food Safety**, v. 5, n. 3, p. 131-133, 2016.

BEZEK, K.; KURINCIC, M.; KNAUDER, E.; KLANCNIK, A.; RASPOR, P.; BUCAR, F.; MOZINA, S. S. Attenuation of adhesion, biofilm formation and quorum sensing of *Campylobacter jejuni* by *Euodia ruticarpa*. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 1527–1532, 2016.

BOLTON, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v. 48, p. 99-108, 2015.

BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; DA SILVA, P. B.; BAUAB, T. M. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. **Annals of Clinical Microbiology**, v. 13, pág. 54, 2014.

BRAS, A. M.; CHATTERJEE, S.; WREN, B. W.; NEWELL, D. G.; KETLEY, J. M. A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 3298-3302, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001: **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. 37 pág. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC n. 14, de 28 de fevereiro de 2007: **Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana**. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>. Acesso em 13 de março de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento e Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017: **Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. 108 pág., 2017.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSENET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, p. 1017-1032, 2011.

BRONNEC, V.; TURONOVA, H.; BOUJU, A.; CRUVEILLER, S.; RODRIGUES, R.; DEMNEROVA, K.; TRESSE, O.; HADDAD, N.; ZAGOREC, M. Adhesion, biofilm formation, and genomic features of *Campylobacter jejuni* Bf, an atypical strain able to grow under aerobic conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1002, 2016.

BUFFET-BATAILLON, S.; TATTEVIN, P.; BONNAURE-MALLET, M.; JOLIVET-GOUGEON, A. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds - a critical review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 381-389, 2012.

BROWN, H. L.; REUTER, M.; HANMAN, K.; BETTS, R. P.; VAN VLIET, A. H. M. Prevention of biofilm formation and removal of existing biofilms by extracellular DNases of *Campylobacter jejuni*. **Plos One**, v. 10, n. 3, 2015.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 10, p. 868-876, 2004.

BUSWELL, C. M.; HERLIHY, Y. M.; LAWRENCE, L. M.; MCGUIGGAN, J. T.; MARSH, P. D.; KEEVIL, C. W. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent- antibody and -rRNA staining. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 733-741, 1998.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). *Campylobacter*. 2017. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html>>. Acesso em: 12 de março de 2018.

CHAI SOWWONG, W.; KUSUMOTO, A.; HASHIMOTO, M.; HARADA, T.; MAKLON, K.; KAWAMOTO, K. Physiological characterization of *Campylobacter jejuni* under cold stresses conditions: its potential for public threat. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 74, p. 43-50, 2012.

CHANSIRIPORNCHAI, N.; SASIPREEYAJAN, J. PCR detection of four virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilities of adhesion to and invasion of INT-407 cells. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 71, p. 839-844, 2009.

CULOTTI, A.; PACKMAN, A. I. *Pseudomonas aeruginosa* facilitates *Campylobacter jejuni* growth in biofilms under oxic flow conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n° 12, 2015.

DAMIANI, D.; LAUDANNA, N.; DAMIANI, D. Síndrome de Miller Fisher: considerações diagnósticas e diagnósticos diferenciais. **Revista Brasileira de Clínica e Medicina**, v. 9, n. 6, p. 423-427, 2011.

DATTA, S.; NIWA, H., ITOH, K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 345-348, 2003.

DYNES, J. J.; LAWRENCE, J. R.; KORBER, D. R.; SWERHONE, G. D.; LEPPARD, G. G. Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 163-178, 2009.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DUFFY, L. L.; DYKES, G. A. The ability of *Campylobacter jejuni* cells to attach to stainless steel does not change as they become nonculturable. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 5, p. 631-634, 2009.

EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. **EFSA Journal**, v. 13, 2015.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Campylobacter*. 2016.

FENG, J.; LAMOUR, G.; XUE, R.; MIRVAKLIKI, M. N.; HATZIKIRIAKOS, S. G.; XU, J.; LI, H.; WANG, S.; LU, X. Chemical, physical and morphological properties of bacterial biofilms affect survival of encased *Campylobacter jejuni* F38011 under aerobic stress. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 172-182, 2016.

FENG, J.; MA, L.; NIE, J.; KONKEL, M. E.; LU, X. Environmental stress-induced bacterial lysis and extracellular DNA release contribute to *Campylobacter jejuni* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 2068-17, 42 pág., 2017.

FORSYTHE, S. J. - **Microbiologia da Segurança Alimentar** – Porto Alegre: ARTMED, 2002.

GIAOURIS, E.; NESSE, L. L. Attachment of *Salmonella* spp. to food contact and product surfaces and biofilm formation on them as stress adaptation and survival strategies. In: HACKETT, C. B. (ed.). **Salmonella**: prevalence, risk factors and treatment options. Nova Iorque: Nova Science Publishers, p. 111-136, 2015.

GIBNEY, K. B.; O'TOOLE, J.; SINCLAIR, M.; LEDER, K. Disease burden of selected gastrointestinal pathogens in Australia, 2010. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 28, p. 176-185, 2014.

GOLZ, G.; SHARBATI, S.; BACKERT, S.; ALTER, T. Quorum sensing dependent phenotypes and their molecular mechanisms in *Campylobacteriales*. **European Journal of Microbiology Immunity**, v. 2, p. 50-60, 2012.

GOMES, H. V.; RODRIGUES, R. K. **Boas Práticas de Fabricação na Indústria de Panificação**. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 26., 2006, Foz do Iguaçu. Anais eletrônicos... Fortaleza: XXVI ENEGEP, 2006. Disponível em: <[http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2006\\_tr470321\\_7479.pdf](http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2006_tr470321_7479.pdf)> Acesso em: 29/12/2017.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press, 4ª edition, 2012.

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 456-461, 2007.

GUNHAIM, H.; BEHNKE, J. M.; AIGHA, I.; SHARMA, A.; DOIPHODE, S. H.; DESHMUKH, A.; ABU-MADI, M. M. Analysis of resistance to antimicrobials and presence of virulence/stress response genes in *Campylobacter* isolates from patients with severe diarrhoea. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-16, 2015.

GUNTHER, N. W.; CHEN, C. Y. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. **Food Microbiology**, v. 26, p. 44–51, 2009.

HEGSTAD, K.; LANGSRUD, S.; LUNESTAD, B. T.; SCHEIE, A. A.; SUNDE, M. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? **Microbial Drug Resistance**, v. 16, p. 91-104, 2010.

HENDRIXSON, D. R.; DIRITA, V. J. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 471-484, 2004.

HILBERT, F.; SCHERWITZEL, M.; PAULSEN, P.; SZOSTAK, M. P. Survival of *Campylobacter jejuni* under conditions of atmospheric oxygen tension with the support of *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5911–5917, 2010.

HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacter* as zoonotic pathogens: a food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117 p. 237–257, 2007.

ICA, T.; CANER, V.; ISTANBULLU, O.; NGUYEN, H. D.; AHMED, B.; CALL, D. R.; BEYENAL, H. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1033-1038, 2012.

JOSHUA, G. W. P.; GUTHRIE-IRONS, C.; KARLISHEV, A. V.; WREN, B. W. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology**, v. 152, p. 387–396, 2006.

KALMOKOFF, M.; LANTHIER, P.; TREMBLAY, T.; FOSS, M.; LAU, P. C.; SANDERS, G. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 4312-4320, 2006.

KEENER, K.; BASHOR, M.; CURTIS, P.; SHELDON, B.; KATHARIOU, S. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 2, p.105-116, 2004.

KEEVIL, C. W. Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy. **Water Science and Technology**, v. 47, p. 105-116, 2003.

KLANCNIC, A.; PAGACAR, M. S.; TROST, K.; ZNIDARIC, M. T.; VODOPIVEC, B. M.; MOZINA, S. S. Anti-*Campylobacter* activity of resveratrol and an extract from waste Pinot noir grape skins and seeds, and resistance of *Campylobacter jejuni* planktonic and biofilm cells mediated via the *CmeABC* efflux pump. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 1, p. 65-77, 2017.

KOGA, M.; GILBERT, M.; LI, J. Antecedent infections in Fisher syndrome: a common pathogenesis of molecular mimicry. **Neurology**, v. 64, p. 1605-1611, 2005.

KONKEL, M. E.; KIM, B. J.; KLENA, J. D.; YOUNG, C. R.; ZIPRIN, R. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3666-3672, 1998.

KONKEL, M. E., GRAY, S. A., KIM, B. J., GARVIS, S. G., YOON, J. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 510-517, 1999.

KONKEL, M. E.; LARSON, C. L.; FLANAGAN, R. C. *Campylobacter jejuni* FlpA binds fibronectin and is required for maximal host cell adherence. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 68-76, 2010.

KOOLMAN, L.; WHYTE, P.; BURGESS, C.; BOLTON, D. Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, 9 pág, 2015.

KOOLMAN, L.; WHYTE, P.; BURGESS, C.; BOLTON, D. Virulence gene expression, adhesion and invasion of *Campylobacter jejuni* exposed to oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **International Journal of Food Microbiology**, v. 2, p. 33-38, 2016.

KOSTAKI, M.; CHORIANOPOULOS, N.; BRAXOU, E.; NYCHAS, G.-J.; GIAOURIS, E. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 2586-2595, 2012.

LAMAS, A; REGAL, P.; VÁSQUEZ, B.; MIRANDA, J. M.; CEPEDA, A.; FRANCO, C. C. *Salmonella* and *Campylobacter* biofilm formation: a comparative assessment from farm to fork. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 53 pág., 2018.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G.; BORGMANN-STRAHSEN, R. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp.. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 874-882, 2003.

LARSON, C. L.; SAMUELSON, D. R.; EUCKER, T. P.; O'LOUGHLIN, J. L.; KONKEL, M. E. The fibronectin-binding motif within FlpA facilitates *Campylobacter jejuni* adherence to host cell and activation of host cell signaling. **Emerging Microbes and Infections**, v. 2, n. 10, 2013.

LEJEUNE, P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 179-184, 2003.

LI, J.; FENG, J.; MA, L.; DE LA FUENTE NUNES, C.; GOLZ, G.; LU, X. Effects of meat juice on biofilm formation of *Campylobacter* and *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 253, p. 20-28, 2017.

LIN, S.; YANG, L.; CHEN, G.; LI, B.; CHEN, D.; LI, L.; XU, Z. Pathogenic features and characteristics of foodborne pathogens biofilm: biomass, viability and matrix. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 285-291, 2017.

LORENZI, H. J.; SOUZA, H. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; COSTA, J. T. M.; FERREIRA, C. Palmeiras brasileiras - exóticas e cultivadas. 1.ed. Nova Odessa: Plantarum, 416 pág., 2004.

MACK, D.; ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCH, J. K.; ELSNER, H. A.; FEUCHT, H. H. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3799–3807, 2000.

MAIA, D. S. V.; ARANHA, B. C.; CHAVES, F. C.; SILVA, W. P. Antibacterial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extracts. **Trends in Phytochemical Research**, v. 1, n. 3, p. 169-174, 2017.

MANGEN, M.-J. J.; BOUWKNEGT, M.; FRIESEMA, I. H. M.; HAAGSMA, J. A.; KORTBEEK, L. M.; TARIQ, L.; WILSON, M.; VAN PELT, W.; HAVELAAR, A. H. Cost-of-illness and disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2011. **International Journal of Food Microbiology**, v. 196, p.84-93, 2015.

MARSHALL, K.C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. **American Society of Microbiology News**, v. 58, p. 202-207, 1992.

MAVRI, A.; MOŽINA, S. S. Involvement of efflux mechanisms in biocide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 800-808, 2012.

MAVRI, A.; MOŽINA, S. S. Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 304-312, 2013.

MBOTO, C. I.; AGBO, B. E.; IKPOH, I.S.; AGBOR, R.B.; UDOH, D.I.; AMBO, E.E. EKIM, M.A. Bacteriological study of raw meat of Calabar Abattoir with public health and veterinary importance. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 4, p. 529-532, 2012.

MCLENNAN, M. K.; RINGOIR, D. D.; FRIRDICH, E.; SVENSSON, S. L.; WELLS, D. H.; JARRELL, H.; SZYMANSKI, C. M.; GAYNOR, E. C. *Campylobacter jejuni* biofilms up-regulated in the absence of the stringent response utilize a calcofluor white-reactive polysaccharide. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 1097-1107, 2008.

MELO, R. T.; MENDONÇA, E. P.; MONTEIRO, G. P.; SIQUEIRA, M. C.; PEREIRA, C. B.; PERES, P. A. B.; FERNANDEZ, H.; ROSSI, D. A. Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 15 pág., 2017.

MONTEVILLE, M. R.; YOON, J. E.; KONKEL, M. E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. **Microbiology**, v. 149, p. 153-165, 2003.

MOONS, P.; VAN HOUTDT, R.; AERTSEN, A.; VANOIRBEEK, K.; ENGELBORGH, Y.; MICHIELS, C. W. Role of quorum sensing and antimicrobial component production by *Serratia plymuthica* in formation of biofilms, including mixed biofilms with *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7294-7300, 2006.

MOONS, P.; MICHIELS, C. W.; AERTSEN, A. Bacterial interactions in biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 157-168, 2009.

MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; MCDOWELL, D. A.; MEGRAUD, F.; MILLAR, B. C.; O'MAHONY, R.; O'ROURKE, M.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SAILS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 351-382, 2005.

MÜLLER, J.; SCHULZE, F.; MÜLLER, W.; HÄNEL, I. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p. 123-129, 2006.

NESPER, J.; LAURIANO, C. M.; KLOSE, K. E.; KAPFHAMMER, D.; KRAISS, A.; REIDL, J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 435-445, 2001.

NGUYEN, V. T.; FEGAN, N.; TURNER, M. S.; DYKES, G. A. Role of attachment to surfaces on the prevalence and survival of *Campylobacter* through food systems. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 1, p. 195-206, 2012.

OH, E.; JEON, B. Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. **Plos One**, v. 9, 7 pág., 2014.

OH, E.; JONG-CHUL, K.; JEON, B. Stimulation of biofilm formation by oxidative stress in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. **Virulence**, v. 7, p. 846-851, 2016.

OLIVEIRA, Mauricéia Greici de. ***Campylobacter* termofílicos em linha de abate de frangos: ocorrência, caracterização molecular e perfil de virulência**. 2016. 90f Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 295–304, 1998.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

OVERELL, J. R.; HSIEH, S. T.; ODAKA, M.; YUKI, N.; WILLISON, H. J. Treatment for Fisher syndrome, Bickerstaff's brainstem encephalitis and related disorders. **The Cochrane database of Systematic Reviews**, v. 24, n. 1, 2007.

PAGEDAR, A.; SINGH, J.; BATISH, V. K. Adaptation to benzalkonium chloride and ciprofloxacin affects biofilm formation potential, efflux pump and haemolysin activity of *Escherichia coli* of dairy origin. **The Journal of Dairy Research**, v. 79, n. 4, p. 1-7, 2012.

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

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 177-188, 2002.

PARKHILL, J.; WREN, B. W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J. M.; CHURCHER, C.; BASHAM, D. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature**, v. 403, p. 665–668, 2000.

PLUMMER, P. J. LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 22, 2012.

REESER, R. J.; MEDLER, R. T.; BILLINGTON, S. J.; JOST, B. H.; JOENS, L. A. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1908-1913, 2007.

REID, A. N.; PANDEY, R.; PALYADA, K.; WHITWORTH, L.; DOUKHANINE, E.; STINTZI, A. Identification of *Campylobacter jejuni* genes contributing to acid adaptation by transcriptional profiling and genome-wide mutagenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1598-1612, 2008.

REUTER, M.; MALLETT, A.; PEARSON, B. M.; VAN VLIET, A. H. M. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2122-2128, 2010.

RICE, S. A.; WUERTZ, S.; KJELLEBERG, S. Next-generation studies of microbial biofilm communities. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 677-680, 2016.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 81-85, 2000.

SALLOWAY, S.; MERMEL, L. A.; SEAMANS, M.; ASPINALL, G. O.; NAM SHIN, J. E.; KURJANCZYK, L. A.; PENNER, J. L. Miller-Fisher syndrome associated with *Campylobacter jejuni* bearing lipopolysaccharide molecules that mimic human ganglioside GD3. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 2945–2949, 1996.

SERIO, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; MARTUSCELLI, M.; MAZZARRINO, G.; DI MATTIA, C.; PAPARELLA, A. Application of central composite design to evaluate the antilisterial activity of hydro-alcohol berry extract of *Myrtus communis* L. **LWT-Food Science and Technology**, v. 58, p. 116-123, 2014.

SHERLOCK, O.; VEJBORG, R. M.; KLEMM, P. The TibA adhesin/ invasins from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1954-1963, 2005.

SIDHU, M. S.; SØRUM, H.; HOLCK, A. Resistance to quaternary ammonium compounds in food-related bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 8, p. 393-399, 2002.

SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6673-6679, 2010.

SIRSAT, S. A.; MUTHAIYAN, A.; RICKE, S. C. Antimicrobials for foodborne pathogen reduction in organic and natural poultry production. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, p. 379–388, 2009.

SOLANO, C.; GARCÍA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 793-808, 2002.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, p. 891-899, 2007.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199–210, 2008.

SULAEMAN, S.; HERNOULD, M.; SCHAUMANN, A.; COQUET, L.; BOLLA, J. M.; DÉ, E. Enhanced adhesion of *Campylobacter jejuni* to abiotic surfaces is mediated by membrane proteins in oxygen-enriched conditions. **Plos One**, v. 7, n. 9, 2012.

SVENSSON, S. L.; PRYJMA, M.; GAYNOR, E. C. Flagella-mediated adhesion and extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of *Campylobacter jejuni*. **Plos One**, v. 9, n. 8, 2014.

TAM, C. C.; O'BRIEN, S. J.; ADAK, G. K.; MEAKINS, S. M.; FROST, J. A. *Campylobacter coli* - an important foodborne pathogen. **The Journal of Infection**, v. 47, n. 1, p. 28–32, 2003.

TEH, K. H.; FLINT, S.; FRENCH, N. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 118-124, 2010.

TEH, A. H. T.; LEE, S. M.; DYKES, G. A. Does *Campylobacter jejuni* form biofilms in food-related environments? **Applied Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5154-5160, 2014.

TEH, A. H. T.; LEE, S. M.; DYKES, G. A. The influence of dissolved oxygen level and medium on biofilm formation by *Campylobacter jejuni*. **Food Microbiology**, v. 61, p. 120-125, 2017a.

TEH, A. H. T.; LEE, S. M.; DYKES, G. A. Identification of potential *Campylobacter jejuni* genes involved in biofilm formation by EZ-Tn5 transposome mutagenesis. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 182, 2017b.

TRACHOO, N.; FRANK, J.; STERN, N. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1110-1116, 2002.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 421-431, 2011.

WEERAKKODY, N. S.; CAFFIN, N.; TURNER, M. S.; DYKES, G. A. *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. **Food Control**, v. 21, p. 1408–1414, 2010.

WHITELEY, M.; OTT, J. R.; WEAVER, E. A.; MCLEAN, R. J. Effects of community composition and growth rate on aquifer biofilm bacteria and their susceptibility to betadine disinfection. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 43–52, 2001.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2016. *Campylobacter*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>>. Acesso em: 28 dez. 2017.

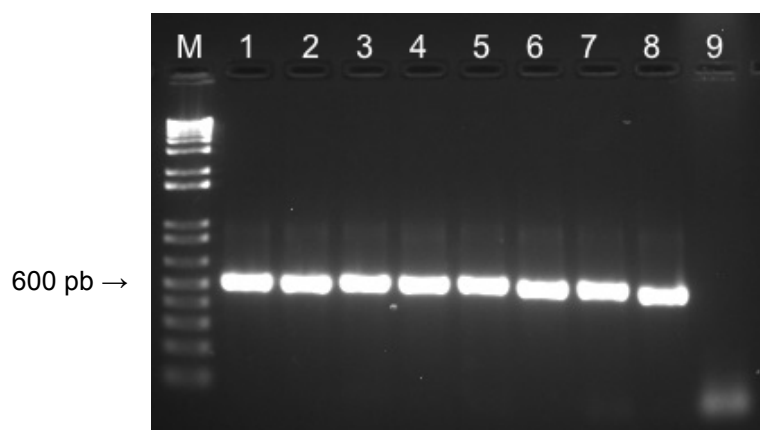
WHO. Estimates of the global burden of foodborne diseases. Geneva, Switzerland. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/ferg/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/), Acesso em: 30 jan. 2018.

ZIMMER, M.; BARHART, H.; IDRIS, U.; LEE, M. Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the waterlines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. **Avian Diseases**, v. 47, p.101–107, 2003.

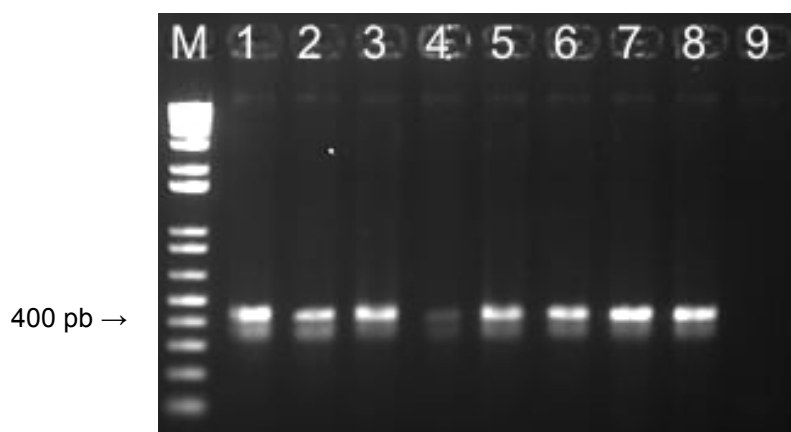
ZIPPRIN, R. L.; YOUNG, C. R.; BYRD, J. A.; STANKER, L. H.; HUME, M. E.; GRAY, S. A.; KIM, B. J.; KONKEL, M. E. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. **Avian Diseases**, v. 45, n. 3, p. 549-557, 2001.

## **Apêndices**

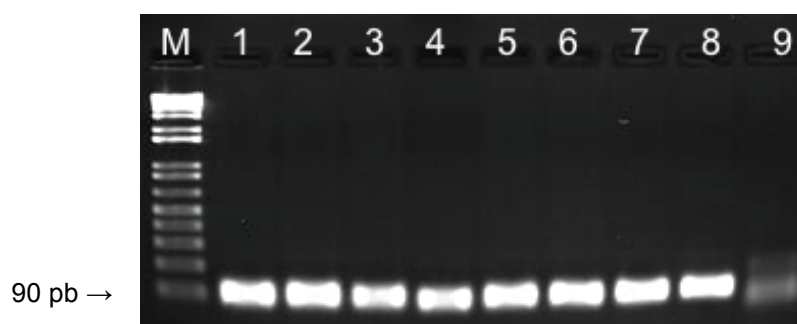
**Apêndice A** – Fotos dos géis de agarose dos produtos de PCR dos genes avaliados no estudo.



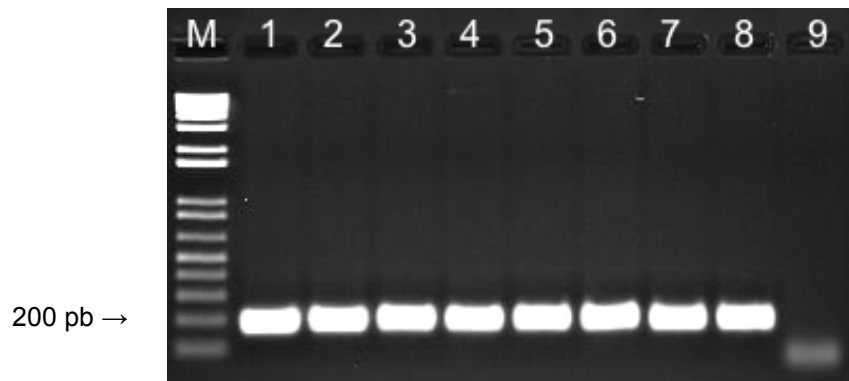
Deteção do produto de 599pb do gene *ahpC<sup>m</sup>* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



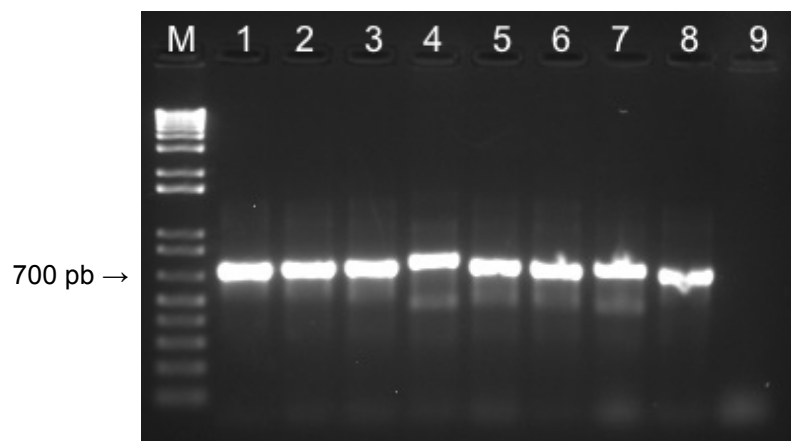
Deteção do produto de 400pb do gene *cadF* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



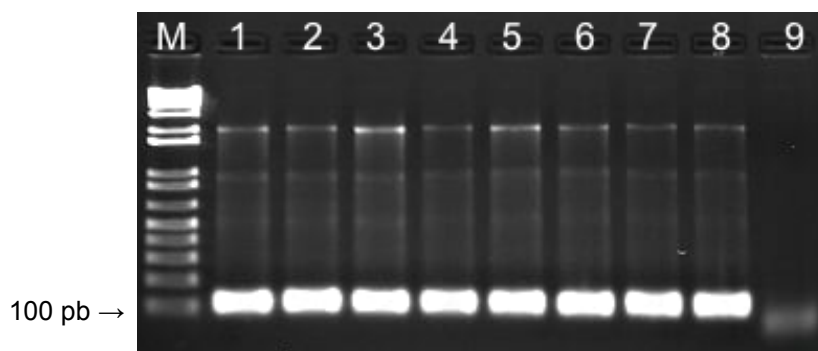
Deteção do produto de 90pb do gene *clpP* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



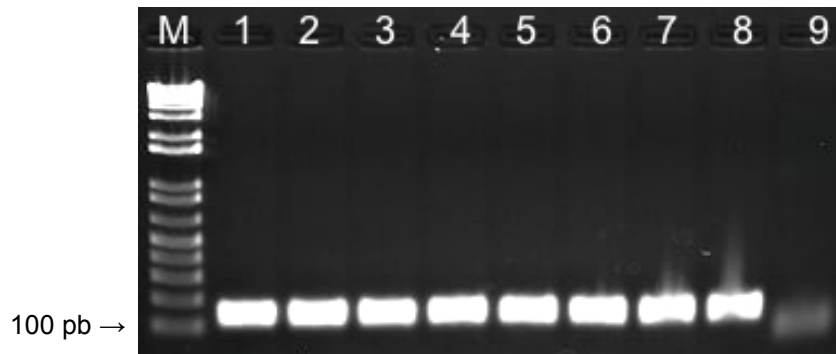
Detecção do produto de 177pb do gene *dnaJ* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



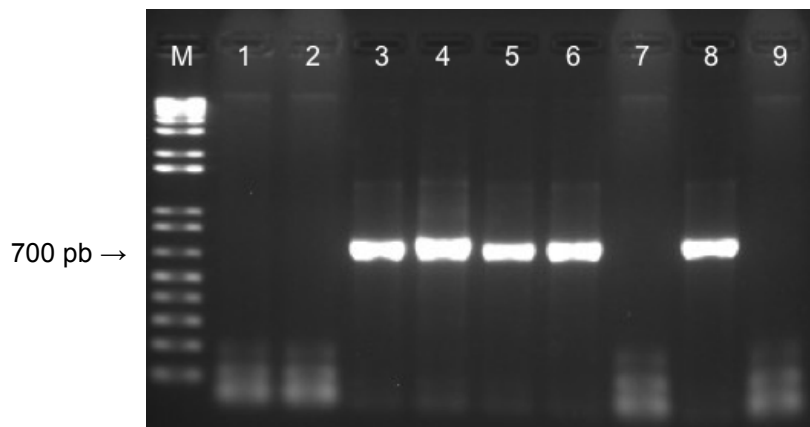
Detecção do produto de 725pb do gene *docA* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



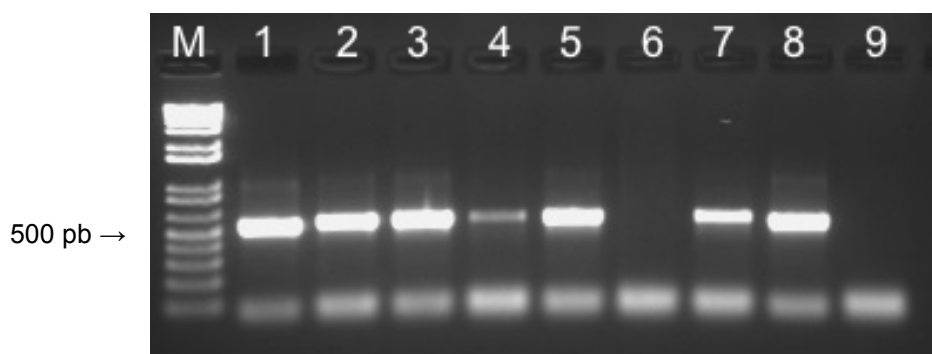
Detecção do produto de 113pb do gene *flaA* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



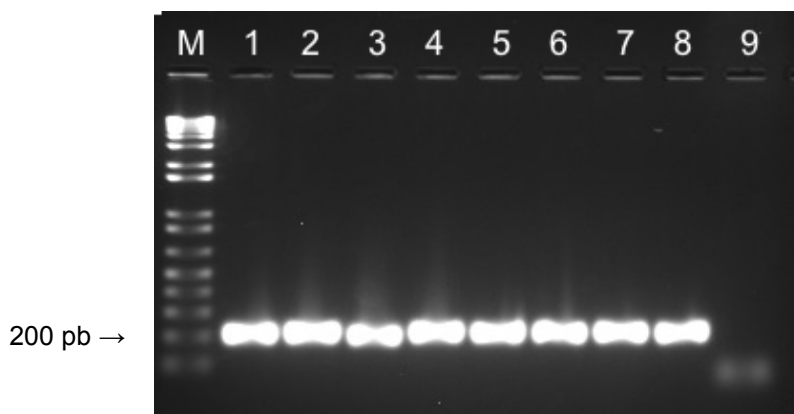
Detecção do produto de 128pb do gene *flaB* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



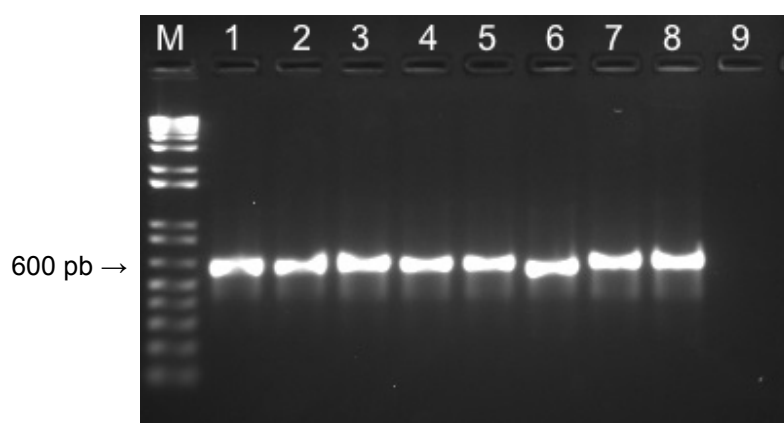
Detecção do produto de 774pb do gene *katA* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



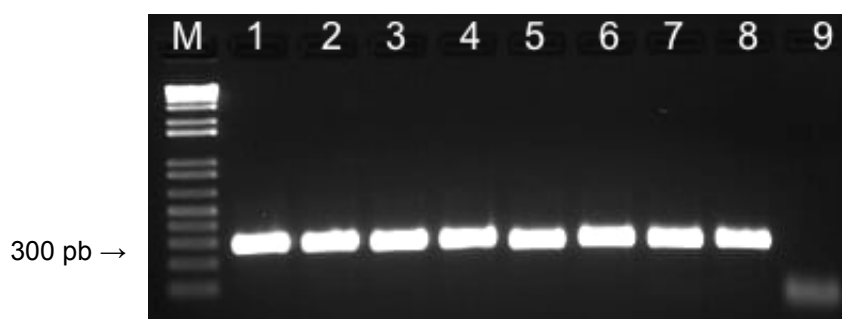
Detecção do produto de 517pb do gene *kpsM* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 104; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



Detecção do produto de 218pb do gene *luxS* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



Detecção do produto de 584pb do gene *racR* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).



Detecção do produto de 300pb do gene *sodB* de *C. jejuni*. 1 ao 7: Isolados de diferentes perfis genéticos; 8: Controle positivo – *C. jejuni* 100; 9: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).