



Bactérias ácido lácticas para inibir a produção de biofilme de *Salmonella* Heidelberg em superfícies de poliestireno

Lactic acid bacteria to inhibit *Salmonella* Heidelberg biofilms in polystyrene surfaces

Luciane Manto¹ , Bruna Webber¹ , Enzo Mistura¹ , Karen Apellanis Borges² , Thales Quedi Furian² ,
Jucilene Sena dos Santos¹ , Luciana Ruschel dos Santos¹ 

1 Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil

2 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

*autor correspondente: luruschel@upf.br

Resumo: *Salmonella* spp. é uma das principais causas de gastroenterite em todo o mundo. *Salmonella* Heidelberg é um patógeno emergente associado com surtos com multirresistência antimicrobiana vinculados aos produtos avícolas. A sua alta persistência no ambiente pode estar associada com sua habilidade de aderir a diferentes superfícies e formar biofilmes. Devido ao aumento da resistência antimicrobiana em todo o mundo, os pesquisadores têm investigado o uso de bactérias ácido lácticas (BAL) como um controle biológico e de microrganismos patogênicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a habilidade de BAL no controle de biofilmes produzidos por *S. Heidelberg* em placas de poliestireno. Foi avaliada a atividade antimicrobiana *in vitro* de nove BAL, todas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, na inibição e na remoção de biofilmes produzidos por *S. Heidelberg*. A formação de biofilme só ocorreu quando a BAL1 (*Lactobacillus salivaris*) foi utilizada. Todos os outros tratamentos demonstraram atividade antimicrobiana. Entretanto, a BAL não foi capaz de reduzir a contagem bacteriana. Os resultados obtidos demonstram que BAL são capazes de prevenir ou retardar a formação de biofilme por *S. Heidelberg* em superfícies de poliestireno e podem ser utilizadas em estudos *in vivo* para determinar o seu potencial alternativo no controle deste patógeno na indústria de alimentos.

Palavras-chave: prevenção de biofilmes, adesão, bactérias ácido lácticas, *Salmonella* Heidelberg.

Abstract: *Salmonella* spp. are one of the leading causes of gastroenteritis worldwide. *Salmonella* Heidelberg is an emergent pathogen associated with multidrug resistant outbreaks linked to poultry products. Its high persistence in the environment may be associated with its ability to adhere to different surfaces and to form biofilms. Owing to the increased antimicrobial resistance worldwide, researches have investigated the use of lactic acid bacteria (LAB) as biological control of pathogenic microorganisms. The aim of this study was to evaluate the ability of LABs for the control of *S. Heidelberg* biofilms on polystyrene surfaces. The antibiofilm activity of nine LAB, all belonging to *Lactobacillus* genera, in the inhibition of biofilm produced by *S. Heidelberg* was evaluated *in vitro*. Biofilm formation occurred only when LAB1 (*Lactobacillus salivaris*) was used. All other treatments have demonstrated antibiofilm activity. However, LAB were not capable to reduce bacterial count. Our results show that LAB is capable to avoid or to delay biofilm formation by *S. Heidelberg* on polystyrene surface and may

Recebido: 06 de junho, 2023. Aceito: 17 de abril, 2024. Publicado: 04 de julho, 2024.

be used for *in vivo* studies as a potential alternative to help in the control of this pathogen in the food industry.

Keywords: biofilm prevention, adhesion, lactic acid bacteria, *Salmonella* Heidelberg.

1. Introdução

Doenças transmitidas por alimentos permanecem como uma ameaça à saúde pública, e *Salmonella* spp. é uma das principais causas de gastroenterite em todo o mundo⁽¹⁾. Surtos de salmonelose estão frequentemente associados ao consumo de produtos avícolas⁽²⁾. Apesar da ampla variedade de sorovares de *Salmonella* existentes, *Salmonella* Heidelberg tem se destacado devido a sua alta frequência de isolamento. A emergência de *S. Heidelberg*, um importante patógeno associado com multirresistência antimicrobiana, tem sido observado com frequência em surtos envolvendo o consumo de produtos avícolas na América do Norte e na América do Sul, especialmente no Canadá, Estados Unidos e Brasil^(3, 4, 5). Além da multirresistência antimicrobiana, isolados de *S. Heidelberg* têm a capacidade de aderir a diferentes superfícies e formar biofilmes, tornando mais difícil o seu controle^(6, 7, 8). A sua alta persistência no ambiente da indústria produtora de carnes tem sido associada com a ocorrência de surtos e tem aumentado a preocupação entre as companhias produtoras desta proteína^(9,10).

Biofilmes são definidos como populações microbianas que se aderem umas às outras e também a uma superfície biótica ou abiótica, sendo protegidas pela substância polimérica extracelular (EPS)^(11, 12). Estas estruturas tornam as bactérias mais resistentes aos desinfetantes e aos processos de desinfecção, desempenhando um papel crucial na sobrevivência de *Salmonella* em condições ambientais desfavoráveis, inclusive em abatedouros-frigoríficos^(12, 13). Devido ao aumento da resistência de biofilmes de *Salmonella* aos desinfetantes e aos antimicrobianos, é importante desenvolver estratégias eficazes e alternativas para prevenir a formação destas estruturas em ambientes relacionado à produção de alimentos⁽¹²⁾. Desta forma, alguns pesquisadores têm investigado o uso de bactérias ácido lácticas (BAL) e bactérias probióticas como controles biológicos de microrganismos patogênicos^(14, 15, 16). BAL são caracterizadas pela produção de ácido láctico como o principal catabólito final da glicose. Estas bactérias estão incluídas no grupo de probióticos, microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administradas em quantidades adequadas^(12, 17).

A aplicação de BAL tem um efeito inibitório ou redutor em comunidades microbianas de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. A competição entre bactérias patogênicas e BAL pela adesão aos sítios e pelos nutrientes reduzem a produção de biofilmes por patógenos^(15, 18, 19). Desta forma, a aplicação de BAL como uma ferramenta de controle biológico é uma estratégia promissora para prevenir a contaminação das instalações de indústrias produtoras de alimentos por bactérias patogênicas.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a habilidade de BAL em controlar biofilmes produzidos por *S. Heidelberg* em superfícies de poliestireno.

2. Materiais e Métodos

Bactérias ácido lácticas

Um total de nove BAL foram selecionadas para este estudo: *Lactobacillus salivaris* (BAL1), *Lactobacillus plantarum* (BAL2), *Lactobacillus curvatus* (BAL3), *Lactobacillus reuteri* (BAL4), *Lactobacillus paracasei* (BAL5), *Lactobacillus fermentum* (BAL6), *Lactobacillus bulgaricus* (BAL7), *Lactobacillus acidophilus* (BAL8), *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* (BAL9). Cepas comerciais liofilizadas foram adquiridas de quatro laboratórios: Lemma Supply Solutions (São Paulo, Brasil) – BAL1, BAL2, BAL6 e BAL9; Pharma Nostra (Rio de Janeiro, Brasil) – BAL4, BAL7 e BAL8; Fagron (São Paulo, Brasil) – BAL5; e T.H.T. SA. (Gembloux, Bélgica) – BAL3.

As cepas foram reativas em caldo De Man, Rogosa & Sharpe (MRS – Merck; Darmstadt, Alemanha) a 37°C por 24 h. Após, foi feito o plaqueamento em ágar MRS a 37°C por 24 h. As cepas foram identificadas e selecionadas com base nas suas características bioquímicas e morfológicas⁽²⁰⁾ e mantidas a -80°C em caldo MRS suplementado com 30% (v/v) com glicerol estéril (Sigma-Aldrich; St. Louis, Estados Unidos).

Salmonella Heidelberg

Uma cepa de *Salmonella* Heidelberg (SH212), isolada de produto final de um abatedouro-frigorífico de frangos, foi gentilmente cedida pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para este estudo. A cepa foi previamente sorotipificada pelo Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), e foi selecionada com base no seu perfil de multirresistência e na sua capacidade de formar biofilme⁽⁷⁾. Além disto, esta cepa apresenta diversos genes associados à virulência⁽⁸⁾. A cepa estava estocada a -20°C em caldo cérebro-coração (BHI; Oxoid, Basigstoke, Reino Unido) suplementada com 20% (v/v) de glicerol. Para reativar a cepa, uma alíquota do estoque foi inoculada em caldo BHI e incubada a 37°C por 24 h, sendo posteriormente plaqueada em ágar xilose lisina-deoxicolato (XLD – Merck; Darmstadt, Germany).

Preparação do inóculo

As cepas de BAL e de *S. Heidelberg* foram reativadas dos estoques e cultivadas *overnight* em caldo MRS e caldo triptona de soja sem glicose (TSB – Oxoid), respectivamente, a 37°C por 24 h. Para o preparo do inóculo, a escala de McFarland No. 1 (Probac do Brasil; São Paulo, Brasil) foi utilizada como referência para ajustar a turbidez da suspensão bacteriana para uma concentração de 3×10^8 CFU/mL.

Competição e inibição da adesão de *Salmonella* Heidelberg por bactérias ácido lácticas

A técnica foi adaptada a partir da metodologia proposta por Gong & Jiang⁽²¹⁾. Um total de onze tratamentos foram avaliados: avaliação individual de cada BAL (T1–T9) e dois *pools* de

proporções iguais de cada uma das nove BAL (T10 e T11). Placas de poliestireno estéreis de 96 poços e fundo chato (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil) foram utilizadas para os ensaios de avaliação de competição e de inibição. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

Para o teste de competição, 150 µL do inóculo de *S. Heidelberg* foram inoculados em cada poço. Alíquotas de 150 µL de cada BAL ou de cada *pool* foram inoculadas em cada poço. Cada tratamento foi repetido em nove poços. Para o controle positivo, foram utilizados 300 µL do inóculo de *S. Heidelberg* sem adição de BAL. Para o controle negativo, foram utilizados 300 µL de caldo MRS estéril. As microplacas foram incubadas a 37°C por 48 h.

Para o teste de adesão, as microplacas foram pré-tratadas com 150 µL de cada BAL ou de cada *pool* por poço, com nove poços para cada tratamento. As microplacas foram incubadas a 37°C por 48 h. Após a incubação, 150 µL do inóculo de *S. Heidelberg* foram inoculados em cada poço. As placas foram novamente incubadas a 37°C por 24 h. Os controles positivos e negativos foram os mesmos do teste de competição.

Após a incubação, o conteúdo das microplacas foi removido e os poços foram lavados três vezes com 300 µL de solução salina estéril 0,9% (Synth; Diadema, Brasil). As bactérias aderidas foram fixadas com 300 µL de metanol (Neon; Suzano, Brazil) por poço por 15 min. Após, as placas foram esvaziadas e secas em temperatura ambiente. As placas foram então coradas com 300 µL por poço de cristal violeta de Hucker a 2% por 5 min. O corante foi removido e as placas foram gentilmente lavadas em água corrente. As placas foram secas com secador. Foi feita a ressuspensão do biofilme com 300 µL de ácido acético glacial 33% (Nuclear; Diadema, Brasil) por poço. A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida em um leitor de absorbância Biochrom (Anthos 2010; Cambridge, Reino Unido) em um comprimento de onda de 550 nm. A DO de cada tratamento (DOT) foi obtida através da média aritmética dos respectivos poços. O ponto de corte (DOC) de cada microplaca testada foi definido como três desvios-padrão acima da DO média do controle negativo (MRS estéril). As cepas foram classificadas como produtoras ($DOT \leq DOC$) ou não produtoras de biofilme ($DOC > DOT$)⁽²²⁾.

Para avaliar o número de microrganismos viáveis, os procedimentos de formação de biofilme foram repetidos e, após a incubação, os poços das placas foram lavados duas vezes com água peptonada tamponada 0,1% (APT; Kasvi) e o fundo dos poços foi raspado com auxílio de uma alça de platina. A suspensão obtida foi homogeneizada por 30 s em vórtex. O conteúdo foi transferido para tubos estéreis e foram feitas diluições em APT 0,1%. A contagem bacteriana foi feita através do método drop plate⁽²³⁾ em XLD e em ágar para contagem (PCA; Kasvi) para SH212 e BAL, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e a contagem bacteriana foi expressa em unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, posteriormente transformadas em \log_{10} UFC/mL.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se análise estatística descritiva e foram agrupados de acordo com a frequência relativa e absoluta. As contagens bacterianas foram analisadas utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste *post hoc* de Tukey. A significância foi determinada em 5% e foi utilizado o programa PASW Statistics.

3. Resultados e discussão

Bactérias patogênicas e deteriorantes podem se aderir à maioria das superfícies encontradas nas plantas de produção de alimentos e muitas delas podem formar biofilmes. Estas estruturas aumentam a resistência bacteriana às condições ambientais adversas e aos compostos antimicrobianos^(24, 25). *S. Heidelberg*, um sorovar emergente, é altamente persistente nas instalações de abatedouros-frigoríficos, e sua crescente resistência antimicrobiana é uma ameaça global^(3, 10). Por estas razões, é importante encontrar métodos alternativos para remover ou prevenir os biofilmes bacterianos. Bactérias ácido lácticas possuem a habilidade de formar biofilmes em superfícies que são utilizadas em plantas de processamento de alimentos, e o seu uso como uma alternativa natural aos desinfetantes tradicionais para o controle da colonização de microrganismos patogênicos tem sido estudado^(26, 27).

Estudos *in vitro* realizados anteriormente demonstraram a ação bioprotetiva de BAL e bactérias probióticas em diversas superfícies contra diferentes patógenos^(12, 18, 19, 26, 28). Por esta razão, o uso de BAL como uma forma de controle dos biofilmes de *S. Heidelberg* em superfícies de poliestireno, muito utilizadas em ambientes de produção de alimentos, tem aumentado o interesse dos pesquisadores. As BAL mais comumente utilizadas incluem diferentes espécies de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Pediococcus*⁽²⁵⁾. Para este estudo, foram selecionadas espécies de *Lactobacillus*, um dos mais importantes gêneros de BAL. *Lactobacillus* são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos e não são móveis⁽²⁹⁾.

Os resultados da contagem bacteriana de SH212 nos ensaios de inibição e competição pela adesão de BAL estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Contagem bacteriana de *Salmonella Heidelberg* (SH212) para os testes de inibição da adesão e competição utilizando-se bactérias ácido lácticas (BAL), individualmente e em *pools*.

Tratamento	Contagem bacteriana (log ₁₀ UFC/mL) - média ± desvio-padrão	
	Inibição	Competição
Controle positivo (SH212)	12,03 ± 0,18 ^a	12,32 ± 0,24 ^a
BAL1 + SH212	11,68 ± 0,62 ^a	12,11 ± 0,28 ^a
BAL2 + SH212	11,88 ± 0,24 ^a	12,08 ± 0,18 ^a
BAL3 + SH212	12,00 ± 0,24 ^a	12,29 ± 0,35 ^a
BAL4 + SH212	11,92 ± 0,30 ^a	12,08 ± 0,25 ^a
BAL5 + SH212	11,84 ± 0,28 ^a	12,03 ± 0,56 ^a
BAL6 + SH212	11,91 ± 0,24 ^a	12,18 ± 0,33 ^a
BAL7 + SH212	12,03 ± 0,11 ^a	12,08 ± 0,35 ^a
BAL8 + SH212	11,85 ± 0,50 ^a	12,13 ± 0,44 ^a
BAL9 + SH212	12,08 ± 0,45 ^a	12,31 ± 0,24 ^a
<i>pool</i> BALs 1	11,86 ± 0,47 ^a	12,12 ± 0,22 ^a
<i>pool</i> BALs 2	11,99 ± 0,35 ^a	12,11 ± 0,28 ^a

Legenda: *Lactobacillus salivaris* (BAL1), *L. plantarum* (BAL2), *L. curvatus* (BAL3), *L. reuteri* (BAL4), *L. paracasei* (BAL5), *L. fermentum* (BAL6), *L. bulgaricus* (BAL7), *L. acidophilus* (BAL8), *L. delbrueckii subesp. bulgaricus* (BAL9). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Gomaa et al.⁽³⁰⁾ demonstraram que probióticos comerciais de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei* inibiram a multiplicação de *S. Heidelberg* em testes *in vitro*. De acordo com os autores, a inibição do patógeno pode ser atribuída a diferentes fatores, incluindo a diminuição do pH, causada pela fermentação probiótica. Uma vez que valores baixos de pH (4,4–5,2) reduzem a multiplicação de *S. Heidelberg*⁽³¹⁾, era esperado que a adição de BAL reduzisse a contagem de SH212. Entretanto, isto não foi observado neste estudo. Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) na contagem bacteriana entre o controle positivo e os tratamentos, independentemente do teste (inibição ou competição) e da BAL avaliada.

É possível que, mesmo que não tenham eliminado completamente *S. Heidelberg*, as BAL competissem com SH212 pelos sítios de adesão e prevenissem a formação de biofilme. Por esta razão, a capacidade antibiofilme das BAL também foi avaliada. Os resultados obtidos para a formação de biofilme por SH212 nos testes de inibição e adesão estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Avaliação da formação de biofilme por *Salmonella Heidelberg* (SH212) nos testes de inibição e de competição.

Tratamento	Produção de biofilme: positiva (+) ou negativa (-)	
	Inibição	Competição
Controle positivo (SH212)	+	+
BAL1 + SH212	+	+
BAL2 + SH212	-	-
BAL3 + SH212	-	-
BAL4 + SH212	-	-
BAL5 + SH212	-	-
BAL6 + SH212	-	-
BAL7 + SH212	-	-
BAL8 + SH212	-	-
BAL9 + SH212	-	-
pool BALs 1	-	-
pool BALs 2	-	-

Legenda: *Lactobacillus salivaris* (BAL1), *L. plantarum* (BAL2), *L. curvatus* (BAL3), *L. reuteri* (BAL4), *L. paracasei* (BAL5), *L. fermentum* (BAL6), *L. bulgaricus* (BAL7), *L. acidophilus* (BAL8), *L. delbrueckii subesp. bulgaricus* (BAL9).

O controle positivo (SH212 sem tratamento) demonstrou a capacidade deste isolado em produzir biofilmes. Entre os onze tratamentos avaliados, a formação de biofilme só ocorreu no tratamento 1 (BAL1 - *L. salivaris*). Todos os outros tratamentos foram capazes de evitar a formação de biofilme em ambos os testes. Este efeito pode ser explicado devido à habilidade de BAL de se agregar com potenciais patógenos, bloqueando os seus sítios de adesão e produzindo substâncias antimicrobianas, como peróxido de hidrogênio e biosurfactantes que inibem a multiplicação e evitam a adesão destes patógenos^(12, 26, 28).

Estudos anteriores já demonstraram a atividade antibiofilme de BAL contra outros sorovares de *Salmonella*, incluindo *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*^(14, 15, 32, 33). Entretanto, poucos estudos avaliaram *S. Heidelberg*, o que dificulta a comparação dos resultados e reforça a necessidades de novos estudos avaliando a ação de BAL contra este sorovar.

4. Conclusão

Os resultados encontrados demonstram que BAL são capazes de prevenir ou diminuir a formação de biofilme por *S. Heidelberg* em superfícies de poliestireno e podem ser utilizadas para estudos *in vivo* como potenciais alternativas para auxiliar no controle deste patógeno na indústria produtora de alimentos.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não existem conflito de interesses.

Contribuição dos autores

Concepção do projeto: L. Manto, L. R. dos Santos. Curadoria dos dados: L. Manto, L. R. dos Santos. Análise dos dados: L. Manto, K. A. Borges, T. Q. Furian, L. R. dos Santos. Investigação: L. Manto, B. Webber, E. Mistura, J. S. dos Santos. Metodologia: L. Manto, B. Webber, E. Mistura, J. S. dos Santos. Administração do projeto: L. Manto, L. R. dos Santos. Supervisão: L. R. dos Santos. Validação: K. A. Borges, T. Q. Furian, L. R. dos Santos. Redação do artigo (rascunho original): L. Manto, K. A. Borges, T. Q. Furian, LRS. Redação do artigo (revisão e edição): L. Manto, K. A. Borges, T. Q. Furian, L. R. dos Santos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Eduardo Cesar Tondo e ao ICTA/UFRGS por gentilmente cederem a cepa de *Salmonella Heidelberg*.

Referências

1. World Health Organization. Food Safety. [Internet] 2023. [cited 2023, Jan 07]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
2. Centers for Disease Control and Prevention. Making food safer to eat: Reducing contamination from the farm to the table. 2011. [cited 2023, Apr 05]. Available from: www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety/
3. Baptista D. 2022. Palestra: Dados de controle oficial de *Salmonella* no PNSA – MAPA. In: Simpósio FACTA sobre *Salmonella*. Campinas, Brazil.
4. Etter AJ, West AM, Burnett JL, Wu ST, Veenhuizen DR, Ogas RA, Oliver HF. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg food isolates associated with a salmonellosis outbreak have enhanced stress tolerance capabilities. Applied and Environmental Microbiology. 2019;85(16):e01065-19. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/AEM.01065-19>
5. Tiba-Casas MR, Camargo CH, Soares FB, Doi Y, Fernandes SA. Emergence of CMY-2-producing *Salmonella Heidelberg* associated with IncI1 plasmids isolated from poultry in Brazil. Microbial Drug Resistance. 2019;25(2):271-276. Disponível em: <http://doi.org/10.1089/mdr.2018.0044>
6. Borges KA, Furian TQ, Souza SN, Menezes R, Tondo EC, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2018;38(1):71–76. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4928>
7. Borsoi A, Santos LR, Rodrigues LB, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP. Behavior of *Salmonella Heidelberg* and *Salmonella Enteritidis* strains following broiler chick inoculation: evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. Brazilian Journal of Microbiology. 2011;42:266-273. Disponível

em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100034>

8. Webber B, Oliveira AP, Pottker ES, Daroit L, Levandowski R, Santos LR, Nascimento VP, Rodrigues LB. *Salmonella* Enteritidis forms biofilm under low temperatures on different food industry surfaces. *Ciencia Rural*. 2019; 49(7):e20181022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20181022>
9. Gieraltowski L, Higa J, Peralta V, Green A, Schwensohn C, Rosen H, Libby T, Kissler B, Marsden-Haug N, Booth H, Kimura A, Grass J, Bicknese A, Tolar B, Defibaugh-Chávez S, Williams I, Wise M. National outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to a single poultry company. *PLoS ONE*. 2016;11(9):e0162369. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162369>
10. Nisar M, Kassem II, Rajashekara G, Goyal SM, Lauer D, Voss S, Nagaraja KV. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the Midwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2017;29(3):370-375. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1040638717690784>
11. Lucca V, Borges KA, Furian TQ, Borsoi A, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. Influence of the norepinephrine and medium acidification in the growth and adhesion of *Salmonella* Heidelberg isolated from poultry. *Microbial Pathogenesis*. 2020;138:103799. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103799>
12. Merino L, Procura F, Trejo FM, Bueno DJ, Golowcycz MA. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. *Food Research International*. 2019;119:530-540. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.024>
13. Wang H, Ye K, Wei X, Cao, J, Xu X, Zhou G. Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. *Food Control*. 2013;33:378-384. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.030>
14. Gómez NC, Ramiro JMP, Quecan BXV, Franco BDGM. Use of potential probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00863>
15. Monteiro G, Rossi D, Valadares Júnior E, Peres P, Braz R, Notário F, Gomes M, Silva R, Carrijo K, Fonseca B. *Lactic Bacterium* and *Bacillus* sp. biofilms can decrease the viability of *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Heidelberg, *Campylobacter jejuni* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* on different substrates. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2021;23(2). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1408>
16. Sabo SDS, Mendes MA, Araújo EDS, Muradian LBDA, Makiyama EN, Leblanc JG, Borelli P, Fock RA, Knöbl T, Oliveira RPDS. Bioprospecting of probiotics with antimicrobial activities against *Salmonella* Heidelberg and that produce B-complex vitamins as potential supplements in poultry nutrition. *Scientific Reports*. 2020;10(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64038-9>
17. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014;11(8):506-514. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
18. Bogéa JS, Manto L, Santos JS, Santos LF, Gotardo FM, Rodrigues LB, Santos LR. Lactic Acid Bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2021;9. Disponível em: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.118224>
19. Castellano P, Ibarreche MP, Massani MB, Fontana C, Vignolo, GM. Strategies for pathogen biocontrol using Lactic Acid Bacteria and their metabolites: a focus on meat ecosystems and industrial environments. *Microorganisms*. 2017;5(3):38. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030038>
20. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer; 2015. 160p.
21. Gong C, Jiang X. Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces. *Poultry Science*. 2017;96(6):1838-1848. Disponível em: <http://doi.org/10.3382/ps/pew463>
22. Stepanović S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*. 2004;38:428-432. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01513.x>

23. Milles AA, Misra SS. The estimation of the bacterial power of the blood. *The Journal of Hygiene*. 1938;38:732-749.
24. Bridier A, Sanchez-Vizueté P, Guilbaud M, Piard JC, Naïtali M, Briandet R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*. 2015;45(part B):167-178. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
25. Giaouris E. Application of lactic acid bacteria and their metabolites against foodborne pathogenic bacterial biofilms. *Recent Trends in Biofilm Science and Technology*. 2020:205-232. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819497-3.00009-X>
26. Tatsaporn T, Kornkanok K. Using potential lactic acid bacteria biofilms and their compounds to control biofilms of foodborne pathogens. *Biotechnology Reports*. 2020;26. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00477>
27. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5(241):1-10. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>
28. Collado MC, Gueimonde M, Salminen S. Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action. In: Gueimonde M, Salminen S. *Bioactive Foods in Promoting Health*. Academic Press: London, 2010;p.353-370. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374938-3.00023-2>
29. Mirzaei EZ, Lashani E, Davoodabadi A. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt and milk against *Shigella* strains. *GMS Hygiene and Infection Control*. 2018;13:Doc01. Disponível em: <http://doi.org/10.3205/dgkh000307>
30. Goma A, Verghese M, Herring J. Modulation of anti-microbial resistant *Salmonella* Heidelberg using synbiotics (probiotics and prebiotics) in two *in-vitro* assays (cross-streaking and agar wells diffusion). *Open Journal of Applied Sciences*. 2020;10(09):561–575. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ojapps.2020.109040>
31. El-Safey ESM. Behavior of *Salmonella* Heidelberg in fruit juices. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 2013;2(2):38-44. Disponível em: <https://doi.org/10.11648/j.ijfns.20130202.13>
32. Das JK, Mishra D, Ray P, Tripathy P, Beuria TK, Singh N, Suar M. *In vitro* evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Gut Pathogens*. 2013;5(1):1-11. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-11>
33. Woo J, Ahn J. Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 2013;56(4):307-313. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/lam.12051>