

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO QUALITATIVA DE BIOFILME POR *ESCHERICHIA COLI* PROVENIENTES DE SALADAS PRONTAS PARA

CONSUMO COMERCIALIZADAS NO BAIRRO DA TIJUCA, RIO DE JANEIRO

Ana Vitória de Sousa Dias^a, Julia Gomes Terra Manchon^a, Letícia Cardoso de Castro^a,
Janaína dos Santos Nascimento^a

^aInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

RESUMO

Diversos restaurantes situados no Rio de Janeiro possuem o serviço de *self-service*, onde oferecem uma grande variedade de saladas cruas e cozidas. Sabe-se, no entanto, que a má higienização dos vegetais utilizados nas saladas, das superfícies de preparo ou dos utensílios de cozinha permite com que micro-organismos, muitas vezes patogênicos, fiquem aderidos aos resíduos presentes e desenvolvam biofilmes, perpetuando a contaminação e podendo gerar problemas de saúde ao consumidor. *Escherichia coli* é um patógeno clássico, causador de doenças transmitidas por alimentos e comumente encontrada em folhas verdes e vegetais frescos prontos para consumo. Este estudo teve por objetivo o isolamento de estirpes de *E. coli* a partir de saladas cruas e cozidas prontas para consumo, servidas em diferentes estabelecimentos do bairro da Tijuca, Rio de Janeiro, e a avaliação qualitativa da produção de biofilme pelos isolados. Dez amostras de saladas foram analisadas e sete apresentaram contagens de *E. coli* superiores ao limite máximo permitido pela legislação para alimentos preparados prontos para o consumo contendo exclusivamente produtos de origem vegetal. Apenas 2 amostras não apresentaram contagens. Dos 11 isolados de *E. coli* detectados, dentre aqueles selecionados para as análises, 10 (90,9%) foram produtores de biofilme. Assim como outras bactérias patogênicas, a presença de *E. coli*, em produtos prontos para o consumo têm um papel fundamental no surgimento de surtos de origem alimentar. Devido à produção de biofilme, a permanência nos vegetais e em superfícies de preparo, constitui uma importante etapa no processo de colonização e, consequentemente, transmissão desses micro-organismos para os consumidores.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, biofilme, saladas prontas para consumo.

1. INTRODUÇÃO

Devido à falta de tempo na sociedade moderna atual, principalmente com a extensa jornada de trabalho, aumenta-se a dificuldade de se consumir alimentos em casa, sendo comum que se presencie um cenário onde grande parte dos brasileiros necessita fazer refeições fora de casa. Como cita Castro-Ibáñez e colaboradores (2017), existe um aumento da popularidade do consumo de produtos prontos para o consumo (*ready-to-eat*). Simultaneamente, o número de surtos e casos de doenças transmitidas por alimentos também tende a aumentar.

De acordo com a Instrução normativa nº 161, de 2022 (Brasil, 2022), um alimento preparado pronto para o consumo é "o alimento manipulado e preparado em serviço de alimentação, exposto à venda embalado ou não". É o caso, por exemplo, das saladas prontas.

É cada vez mais comum encontrarmos restaurantes e/ou estabelecimentos que oferecem o serviço de *self-service*, onde é encontrada uma grande variedade de saladas prontas, sendo um dos alimentos mais consumidos. No entanto, é necessário se atentar às boas práticas de preparo desses alimentos.

A má higienização dos utensílios de cozinha e das superfícies de preparo dos alimentos podem fazer com que micro-organismos fiquem aderidos aos resíduos presentes e desenvolvam biofilmes, que são definidos como comunidades microbianas envoltas por uma matriz de polímeros extracelulares, aderidas a superfícies (Carrascosa *et al*, 2021). Os biofilmes permitem o crescimento de bactérias de forma protegida e permitem sua sobrevivência mesmo quando as condições não se mostram favoráveis. A troca de nutrientes é, assim, facilitada e por isso, o crescimento torna-se mais propício.

Biofilmes podem ser produzidos por quase qualquer micro-organismo em condições adequadas, porém na indústria de alimentos é mais frequente a formação do mesmo por bactérias, o que pode gerar um maior risco para o consumidor, considerando que muitas bactérias podem ser patogênicas, ou seja, causadoras de doenças (Carrascosa *et al*, 2021).

Dentre os inúmeros patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), um deles é a *Escherichia coli*, comumente encontrada em folhas verdes e vegetais frescos prontos para consumo. De acordo com Taban e

colaboradores (2011), existem alguns fatores que influenciam diretamente a contaminação desses alimentos, como por exemplo, a água de irrigação não tratada, fertilizantes orgânicos inadequados ou outras origens de contaminação, que podem ocorrer em qualquer momento do plantio até a chegada no prato, como falhas durante a colheita, manuseio, entre outros, sem contar a contaminação cruzada encontrada dentro das cozinhas. Vale ressaltar que já foram realizados estudos descrevendo a produção de biofilme por estirpes de *E. coli* em diversas matrizes alimentares (Van Houdt *et al.*, 2010; Srey *et al.*, 2013; Nesse *et al.*, 2014; Gallie *et al.*, 2018).

A *E. coli* é utilizada como indicadora de contaminação fecal, por ter como habitat, exclusivamente, o intestino de seres humanos e animais homeotérmicos (Frias *et al.*, 2020). Faz-se necessário que haja, portanto, o cuidado adequado com o saneamento, em especial, com o local de coleta da água usada tanto para a irrigação das plantações, como para a higienização do local de preparo final dos alimentos, de modo a evitar a disseminação das DTAs.

Os sintomas das DTAs causadas por *E. coli* dependem da estirpe envolvida, porém em sua maioria são: náuseas, dores abdominais, fadiga, dores de cabeça ou, em casos mais graves, diarreia profusa ou disenteria (com fezes geralmente mucóides e sanguinolentas), vômito e calafrios. Esses sintomas podem ter uma duração de 3 a 9 dias dependendo do caso. Os grupos de risco desses quadros são crianças, idosos e até mesmo pessoas em viagens para países em desenvolvimento (Souza *et al.*, 2018).

Como citado anteriormente, estirpes de *E. coli* podem produzir biofilme, e sua presença na área de preparo das saladas e outros alimentos pode contribuir para a persistência, disseminação e, conseqüentemente, para a contaminação cruzada de alimentos e utensílios, na ausência de uma higienização adequada (Luna-Guevara *et al.*, 2019; Rebello, 2020).

Este estudo visou o isolamento de estirpes de *E. coli* a partir de saladas cruas e cozidas prontas para consumo e a avaliação qualitativa da produção de biofilme pelos isolados, com o objetivo de verificar se esses alimentos podem representar um risco para o consumidor.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS DE SALADAS

Amostras de saladas cozidas e cruas prontas para consumo, foram obtidas de vários estabelecimentos comerciais do bairro da Tijuca, do Rio de Janeiro. As saladas foram transportadas em embalagens de isopor e alumínio cedidas pelos próprios estabelecimentos e levadas ao laboratório de Microbiologia do IFRJ Campus Maracanã para serem analisadas.

2.2. PESQUISA DE *ESCHERICHIA COLI*

Para a detecção de *E. coli* nas amostras de saladas cruas e cozidas prontas para consumo, foi realizada a pesagem e adição de 25g da amostra em 225mL de água peptonada a 0,1% (p/v). Logo em seguida, foram feitas diluições sucessivas até 10^{-4} em tubos de ensaio contendo o mesmo diluente. Alíquotas das diferentes diluições foram plaqueadas em Ágar TBX, conforme descrito na ISO 16649-2 (ISO, 2001). As placas foram incubadas à 44°C durante 24 horas. As colônias que cresceram no ágar TBX que apresentaram coloração azul foram identificadas diretamente como *E. coli*.

2.3. PESQUISA DE ISOLADOS ATÍPICOS DE *E. COLI*

Colônias brancas, atípicas, crescidas no meio TBX, foram selecionadas e inoculadas em ágar EMB, uma vez que alguns sorotipos de *E. coli* podem apresentar colônias brancas, como o O157:H7. As placas foram incubadas a 37°C por 12h e isolados que apresentaram colônias escuras com brilho metálico foram submetidos aos testes bioquímicos de vermelho de metila, produção de indol, Voges-Proskauer e utilização do citrato.

2.4. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE PRODUÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS DE *E. COLI*

Para avaliação quantitativa dos biofilmes, os isolados foram inoculados em ágar vermelho congo, conforme descrito por Freeman e colaboradores (1989). O meio foi elaborado com 15 g/L de ágar nutriente, 37 g/L de sacarose e 0,8 g/L de vermelho Congo. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A produção de biofilme foi detectada a partir da formação de colônias com coloração preta, podendo inclusive manchar dessa cor o ágar circundante. Na ausência da produção de biofilme, os isolados permanecerão incolores ou avermelhados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns trabalhos têm alertado para a presença de *E. coli* em amostras de saladas tanto no Brasil como em outros países e destacam os potenciais riscos deste micro-organismo para a saúde do consumidor (Beltrão, 2019; Bezerra *et al.*, 2020; Waturangi *et al.*, 2020; Özdemir & Arslan, 2021).

Após a análise de 10 amostras de saladas cruas e cozidas de diferentes estabelecimentos que fornecem serviço *self-service* no Bairro da Tijuca, foi constatado que as mesmas apresentaram contagens variando entre $<1,0 \times 10^1$ e $3,0 \times 10^5$ UFC/g. Os dados estão apresentados na **Tabela 1**. Pôde-se detectar a presença de crescimento de colônias típicas (azuis) e atípicas (brancas e rosas) no ágar TBX em 8 (80%) das 10 amostras.

Os meios de cultura cromogênicos possuem enzimas cromogênicas ou substratos fluorogênicos. O meio TBX contém o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicuronídeo, que é um importante marcador para a enzima β -glucuronidase e é amplamente utilizado para a detecção de *E. coli* produtoras dessa enzima. No entanto, o sorotipo de *E. coli* O157:H7, um dos mais patogênicos, é negativo para a produção β -glucuronidase e pode não ser detectado com este método se apenas colônias típicas (azuis) forem selecionadas (Wei *et al.*, 2019).

Tabela 1. Quantificação de *Escherichia coli* nas amostras de saladas prontas para consumo analisadas neste estudo.

Amostra	Tipo de salada	UFC/g
1	cozida	$2,5 \times 10^5$
2	cozida	$1,1 \times 10^5$
3	cozida	$3,0 \times 10^4$
4	crua	$1,0 \times 10^3$
5	crua	$1,0 \times 10^2$
6	crua	$1,4 \times 10^3$
7	crua	$3,0 \times 10^5$
8	crua	$1,6 \times 10^4$
9	crua	$< 1,0 \times 10^1$
10	crua	$< 1,0 \times 10^1$

Por isso, vinte e três isolados das diferentes amostras crescidos em TBX foram selecionados para os experimentos posteriores, sendo oito que apresentaram colônias típicas sugestivas de *E. coli* (azuis) e 15 com colônias atípicas (brancas ou rosas) (**Tabela 2**).

Os isolados atípicos foram inoculados em ágar EMB para confirmação da identificação. A maioria apresentou colônias teve coloração escura, expressando brilho metálico, que foram então inoculadas em testes bioquímicos para confirmação. Três (20%) desses 15 isolados foram confirmados como *E. coli*, corroborando com o que é descrito por outros artigos em relação ao isolamento de sorotipos não-produtores de β -glucuronidase, que não apresentam colônia azuis no ágar TBX (Mäde et al., 2017; Wei *et al.*, 2020). Os resultados estão apresentados na **Tabela 2**. Como controle positivo, os isolados que apresentaram colônias típicas no ágar TBX também foram inoculados em EMB (**Figura 1**) e submetidos aos testes bioquímicos, com resultados que confirmaram a identificação, como esperado. Do total de 23 isolados, 11 (47,8%) foram confirmados como *E. coli*.

Tabela 2. Isolados estudados neste trabalho.

Amostra	Isolados	Coloração da colônia no ágar TBX	Produção de biofilme	Confirmação como <i>E. coli</i> após crescimento em EMB e testes bioquímicos
1	A1.1	Rosa	Sim	Sim
	A1.2	Rosa	Sim	Sim
2	A2.1	Rosa	Sim	Não
	A2.2	Rosa	Sim	Não
3	A3.1	Rosa	Sim	Não
4	A4.1	Azul	Sim	Sim
	A4.2	Azul	Não	Sim
	A4.3	Azul	Sim	Sim
	A4.4	Azul	Sim	Sim
5	A5.1	Azul	Sim	Sim
	A5.3	Rosa	Sim	Não
	A5.4	Branco	Sim	Não
6	A6.1	Rosa	Sim	Não
	A6.2	Branco	Sim	Não
	A6.3	Rosa	Sim	Não
	A6.4	Azul	Sim	Sim
7	A7.1	Branco	Sim	Não
	A7.2	Rosa	Sim	Não
	A7.3	Azul	Sim	Sim
	A7.4	Azul	Sim	Sim
8	A8.1	Branco	Sim	Sim
	A8.2	Rosa	Sim	Não
	A8.3	Rosa	Não	Não



Figura 1: Isolado de *E. coli* em ágar EMB

Quando outros métodos mais específicos para detecção de sorotipos como o O157:H7 não estão disponíveis, a pesquisa de colônias negativas para a produção de β -glucuronidase torna-se importante, uma vez que já foram relataram surtos causados por este sorotipo em diferentes alimentos, incluindo, vegetais e saladas prontas para o consumo (CDC, 2022).

De acordo com a Instrução Normativa nº 161 de 2022 (Brasil, 2022) que estabelece padrões para alimentos preparados prontos para o consumo contendo exclusivamente produtos de origem vegetal, elaborados sem emprego de calor, o limite máximo permitido para *E. coli* é de 10^2 UFC/g, enquanto que naquelas elaborados com o emprego de calor, esse valor cai para 20 UFC/g.

Dessa forma, é possível verificar que os valores encontrados para 7 das 10 amostras estão muito acima dos limites máximos permitidos pela IN161 de 2019 para a presença de *E. coli*. Apenas as amostras 5, 9 e 10 estariam próprias para consumo. Resultados similares, com valores elevados de *E. coli* em saladas e vegetais já foram descritos em outros estudos brasileiros (Beltrão, 2019; Bezerra *et al.*, 2020).

Vale ressaltar, ainda, que as amostras 9 e 10, apesar de serem cruas, apresentaram contagens inferiores ao limite da técnica e ao valor máximo permitido pela legislação, sugerindo que os estabelecimentos que a comercializam seguiram padrões de higiene e sanitização dos vegetais e superfícies de preparo antes de disponibilizar estes alimentos para o consumo. É interessante destacar que no caso das saladas 1, 2 e 3 (saladas cozidas), ou o emprego de calor no preparo das amostras não foi suficiente para diminuir a contaminação microbiana desses alimentos ou os mesmos sofreram algum tipo de contaminação pós-preparo, uma vez que apresentaram contagens extremamente elevadas.

O biofilme produzido por patógenos de origem alimentar, incluindo *E. coli*, durante o processamento de alimentos, está geralmente envolvido no desenvolvimento de surtos de origem alimentar. De acordo com Özdemir & Arslan, (2021), os vegetais folhosos e alimentos derivados, como as saladas, têm sido frequentemente implicados em surtos de *E. coli*.

Todos os 23 isolados foram submetidos à análise da produção qualitativa de biofilme. Vinte e um (91,3%) isolados mostraram ser produtores de biofilme. Apenas os isolados A4.2 (*E. coli*) e A8.3 (identificação desconhecida) foram não-produtores (**Tabela 3**). Um dos isolados produtos de biofilme está apresentado na **Figura 2**.

Tabela 3. Produção qualitativa de biofilme em ágar vermelho congo pelos isolados estudados neste trabalho.

Isolados	Identificação	Produção de biofilme
A1.1	<i>E. coli</i>	Sim
A1.2	<i>E. coli</i>	Sim
A2.1	desconhecida	Sim
A2.2	desconhecida	Sim
A3.1	desconhecida	Sim
A4.1	<i>E. coli</i>	Sim
A4.2	<i>E. coli</i>	Não
A4.3	<i>E. coli</i>	Sim
A4.4	<i>E. coli</i>	Sim
A5.1	<i>E. coli</i>	Sim
A5.3	desconhecida	Sim
A5.4	desconhecida	Sim
A6.1	desconhecida	Sim
A6.2	desconhecida	Sim
A6.3	desconhecida	Sim
A6.4	<i>E. coli</i>	Sim
A7.1	desconhecida	Sim
A7.2	desconhecida	Sim
A7.3	<i>E. coli</i>	Sim
A7.4	<i>E. coli</i>	Sim
A8.1	<i>E. coli</i>	Sim
A8.2	desconhecida	Sim
A8.3	desconhecida	Não



Figura 2: Isolado produtor de biofilme em ágar vermelho-congo.

Biofilmes são conhecidos por desempenhar papéis importantes na sobrevivência e persistência bacteriana em ambientes de processamento de alimentos. Já foi relatado, inclusive, que isolados produtores de biofilme presentes em superfícies de preparo e/ou corte de alimentos como, poliestireno e aço inoxidável, podem sobreviver nesses ambientes por mais tempo e serem transferidas para folhas de vegetais que ali são manuseadas (Adator *et al.*, 2018).

4. CONCLUSÃO

A presença de bactérias patogênicas, como a *E. coli*, em produtos frescos e prontos para o consumo desempenha um papel importante no surgimento de surtos de origem alimentar. A fixação e a permanência nos vegetais, superfícies de preparo e de corte de alimentos e fômites utilizados nessas atividades devido à produção de biofilme é o primeiro passo no processo de colonização e subsequente transmissão desses micro-organismos para os consumidores, principalmente quando encontrados em altas contagens, como observado em nosso trabalho.

Juntamente com a correta execução das boas práticas de fabricação e higienização, novas estratégias para mitigar a produção de biofilme por *E. coli* devem ser desenvolvidas. Essas medidas ajudarão a prevenir a transmissão bacteriana e a proteger a saúde humana. No que se refere ao consumo de saladas

prontas, cabe também aos consumidores que coloquem em prática seus próprios métodos de controle da contaminação, desde a ingestão de alimentos de procedência confiável ao cozimento, quando possível.

5. REFERÊNCIAS

- Adator, E. H.; Cheng, M.; Holley, R.; McAllister, T.; Narvaez-Bravo, C. (2018). Ability of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* to survive within dry-surface biofilms and transfer to fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 269: 52-59.
- Bezerra, A. A.; de Souza, E. N.; de Souza Pereira, H. G.; Sá-Silva, C. (2020). Análise microbiológica de alfaces em saladas cruas comercializadas em restaurantes comerciais da cidade de Petrolina, Pernambuco, Brasil. *Brazilian Journal of Development*, 6 (12): 100252-100265.
- Beltrão, J. C. (2019). *Avaliação da qualidade microbiológica de saladas de hortaliças cruas prontas ao consumo e identificação do perfil de resistência a antibióticos das enterobactérias isoladas*. Dissertação de Mestrado. Programa de Ciências Aplicadas a Produtos Para Saúde, Universidade Federal Fluminense.
- Brasil (2022). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância. Instrução Normativa nº 161, de 1 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. *Diário Oficial da União*, nº 126, de 6 de julho de 2022.
- Carrascosa, C.; Raheem, D.; Ramos, F.; Saraiva, A.; & Raposo, A. (2021). Microbial biofilms in the food industry - A comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (4): 2014.
- Castro-Ibáñez, I.; Gil, M. I.; & Allende, A. (2017). Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *LWT-Food Science and Technology*, 85: 284-292.
- Castro-Rosas, J.; Cerna-Cortés, J. F.; Méndez-Reyes, E.; Lopez-Hernandez, D.; Gómez-Aldapa, C. A.; Estrada-Garcia, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, 156 (2): 176-180.

Center for Disease Control and Prevention - CDC (2022). Reports of selected *E. coli* outbreak investigations. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>.

Acesso em 17 de julho de 2022.

Freeman, D. J.; Falkiner, F. R. & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. *Journal of Clinical Pathology*, 42: 872-847.

Frias, D. F. R.; Pinheiro, R. S. B.; Américo-Pinheiro, J. H. P.; Buosi, A. L. B. (2020). Variação espaço-temporal da concentração de *Escherichia coli* em águas superficiais e a saúde pública. *Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades*, 8 (60): 77-86.

Galie, S.; García-Gutiérrez, C.; Miguélez, E. M.; Villar, C. J.; Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9: 898.

International Organization for Standardization (ISO) - ISO 16649-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the enumeration of b-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide. Geneva: International Organization for Standardization; 2001.

Luna-Guevara, J. J., Arenas-Hernandez, M. M., Martínez de la Peña, C., Silva, J. L., & Luna-Guevara, M. L. (2019). The role of pathogenic *E. coli* in fresh vegetables: Behavior, contamination factors, and preventive measures. *International Journal of Microbiology*, 2019: 2894328.

Mäde, D.; Geuthner, AC.; Imming, R.; Wicke, A, (2017). Detection and isolation of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* in flour in Germany between 2014 and 2017. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 12: 245–253.

Nesse, L. L.; Sekse, C.; Berg, K.; Johannesen, K. C.; Solheim, H.; Vestby, L. K.; Urdahl, A. M. (2014). Potentially pathogenic *Escherichia coli* can form a biofilm under conditions relevant to the food production chain. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (7): 2042-2049.

Özdemir, F.; Arslan, S. (2021). Molecular Characterization and biofilm formation of *Escherichia coli* from vegetables. *Sakarya University Journal of Science*, 25(1): 12-21.

- Rebello, R. C. D. L. (2020). Efeitos da produção de biofilme e da interação com *Acanthamoeba castellanii* na virulência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Tese de Doutorado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- Souza, G. S. F.; Souza, V. K. S.; Silva, E. C. A.; Cordeiro, S. A.; de Oliveira, J. C. S.; da Silva, E. C. A.; ... Martins, A. C. S. (2018). Características gerais de doenças transmitidas por alimentos (DTA). *International Journal of Nutrology*, v. 11(S 01), Trab229.
- Srey, S.; Jahid, I. K.; Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food control*, 31 (2): 572-585.
- Taban, B. M.; Halkman, A. K. (2011). Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 17 (6): 286-287.
- Van Houdt, R.; Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of applied microbiology*, 109 (4): 1117-1131.
- Waturangi, D.E.; Hudiono, F. Aliwarga, E. (2019). Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* from salad vegetable and fruits sold in Jakarta. *BMC Research Notes*, 12: 247.
- Wei, X.; Wu, Q.; Feng, Y.; Chen, M.; Zhang, S.; Chen, M.; ... Li, Y. (2020). Off-on fluorogenic substrate harnessing ES IPT and AIE features for in situ and long-term tracking of β -glucuronidase in *Escherichia coli*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 304: 127242.