

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS

Carolina Schettino Kegele

Caracterização de linhagens de enterococci e lactobacilli potencialmente bioprotetoras visando ao desenvolvimento de bioprocessos e produtos para a cadeia produtiva do leite

Juiz de Fora

2024

Carolina Schettino Kegele

Caracterização de linhagens de enterococci e lactobacilli potencialmente bioprotetoras visando ao desenvolvimento de bioprocessos e produtos para a cadeia produtiva do leite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Ribeiro

Coorientadora: Profa. Dra. Laura Maria Bruno

Juiz de Fora

2024

Carolina Schettino Kegele

Caracterização de linhagens de enterococci e lactobacilli potencialmente bioprotetoras visando ao desenvolvimento de bioprocessos e produtos para a cadeia produtiva do leite

**Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciência e Tecnologia
do Leite e Derivados
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre
em Ciência e
Tecnologia do Leite e
Derivados. Área de
concentração:
Ciência e Tecnologia
do Leite e Derivados.**

Aprovada em 29 de janeiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. João Batista Ribeiro - Orientador
Embrapa Gado de Leite**

**Profa. Dra. Laura Maria Bruno - Coorientadora
Embrapa Agroindústria Tropical**

**Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro
Universidade Federal de Juiz de Fora**

**Profa. Karina Neoob de Carvalho
Castro**

Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, 15/01/2024.



Documento assinado eletronicamente por João Batista Ribeiro, Usuário Externo, em 07/02/2024, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Humberto Moreira Hungaro, Professor(a), em 16/02/2024, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Laura Maria Bruno, Usuário Externo, em 16/02/2024, às 13:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Karina Neoob de Carvalho Castro, Usuário Externo, em 26/02/2024, às 08:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1665258 e o código CRC 2F73F3D4.

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Schettino Kegele, Carolina.

Caracterização de linhagens de enterococci e lactobacilli potencialmente bioprotetoras visando ao desenvolvimento de bioprocessos e produtos para a cadeia produtiva do leite / Carolina Schettino Kegele. -- 2024.

71 p.

Orientador: João Batista Ribeiro
Coorientadora: Laura Maria Bruno

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2024.

1. Bacteriocina. 2. Bioproteção. 3. Bactéria Láctica. 4. Inocuidade. 5. Enterococcus. I. Ribeiro, João Batista, orient. II. Bruno, Laura Maria, coorient. III. Título.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar linhagens autóctones de enterococci e lactobacilli com potencial bioprotetor contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Para tal, 98 linhagens de BAL geneticamente não redundantes, previamente isoladas de produtos lácteos foram identificadas como lactobacilli (n=48) e enterococci (n=50) por PCR. Após confirmação da diversidade genética por REP-PCR, as linhagens foram identificadas por MALDI-TOF como *Lactiplantibacillus plantarum* (N=14), *Lacticaseibacillus paracasei* (N=12), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (N=12), *Lactiplantibacillus pentosus* (N=4), *Limosilactobacillus fermentum* (N=2), *Lactobacillus johnsonii* (N=1), *Lentilactobacillus hilgardii* (N=1), *Lentilactobacillus parabuchneri* (N=1), *Levilactobacillus brevis* (N=1), *Enterococcus faecium* (N=31), *Enterococcus faecalis* (N=17) e *Enterococcus durans* (N=4). A identificação foi confirmada por PCR para *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. brevis*. Nos ensaios de bioproteção *in vitro*, as linhagens de enterococci foram mais efetivas contra *S. agalactiae*, enquanto as de lactobacilli inibiram *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis* ($p \leq 5\%$). Maior potencial bioprotetor foi observado em linhagens de *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lentilactobacillus hilgardii*, *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. Índícios de inibição por atividade de bacteriocinas foram observados em linhagens de *L. plantarum* (972), *L. plantarum* (794), uma de *E. faecalis* (681) e duas de *E. faecium* [7(23) e 15(74)], nas quais se observou a perda de atividade inibitória na presença de enzimas proteolíticas. Todas as linhagens foram analisadas quanto ao perfil de resistência aos antibióticos penicilina G, ampicilina, vancomicina, gentamicina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e clotrimoxazol e apresentaram suscetibilidade a pelo menos quatro antibióticos. Linhagens de lactobacilli apresentaram alto índice de resistência à Vancomicina (n=44, 91,6%) e

Cotrimoxazol (N=22, 45,83%) apresentando suscetibilidade principalmente aos antimicrobianos Cloranfenicol (N=43, 89,58%) e Eritromicina (N=43, 89,58%). Linhagens de enterococci exibiram maior taxa de resistência à Eritromicina (N=23, 44,23%) e Penicilina G (N=21, 40,38%) com elevada suscetibilidade ao Cloranfenicol (N=49, 94,23%) e à Vancomicina (N=47, 90,38%). Duas linhagens de *L. plantarum* (82 e 88), uma de *E. faecalis* (18) e duas de *E. faecium* (41 e 46) foram escolhidas para continuidade da pesquisa em projetos futuros por apresentarem maior potencial bioprotetor e indícios de inocuidade. Mais estudos são necessários para caracterizar os mecanismos de bioproteção, bem como, para garantir a segurança destes microrganismos antes da sua utilização no desenvolvimento de bioprocessos e/ou bioprodutos industriais.

Palavras-chave: Bactéria láctica, *Enterococcus*, inocuidade, bioproteção, bacteriocina.

ABSTRACT

This work aimed to characterize autochthonous strains of enterococci and lactobacilli with bioprotective potential against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. To this end, 98 genetically non-redundant LAB strains, previously isolated from dairy products, were identified as lactobacilli (n=48) and enterococci (n=50) by PCR. After confirmation of genetic diversity by REP-PCR, the strains were identified by MALDI-TOF as *Lactiplantibacillus plantarum* (N=14), *Lacticaseibacillus paracasei* (N=12), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (N=12), *Lactiplantibacillus pentosus* (N=4), *Limosilactobacillus fermentum* (N=2), *Lactobacillus johnsonii* (N=1), *Lentilactobacillus hilgardii* (N=1), *Lentilactobacillus parabuchneri* (N=1), *Levilactobacillus brevis* (N=1), *Enterococcus faecium* (N=31), *Enterococcus faecalis* (N=17) and *Enterococcus durans* (N=4). Identification was confirmed by PCR for *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* and *L. brevis*. In in vitro bioprotection assays, enterococci strains were more effective against *S. agalactiae*, while lactobacilli strains inhibited *S. aureus*, *E. coli* and *E. faecalis* ($p \leq 5\%$). Greater bioprotective potential was observed in strains of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lentilactobacillus hilgardii*, *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Evidence of inhibition by bacteriocin activity was observed in strains of *L. plantarum* (972), *L. plantarum* (794), one of *E. faecalis* (681) and two of *E. faecium* [7(23) and 15(74)], in which the loss of inhibitory activity was observed in the presence of proteolytic enzymes. All strains were analyzed for their resistance profile to the antibiotics

penicillin G, ampicillin, vancomycin, gentamicin, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol, erythromycin and clotrimoxazole and showed susceptibility to at least four antibiotics. Lactobacilli strains showed a high rate of resistance to Vancomycin (n=44, 91.6%) and Cotrimoxazole (N=22, 45.83%) presenting susceptibility mainly to the antimicrobials Chloramphenicol (N=43, 89.58%) and Erythromycin (N=43, 89.58%). Enterococci strains exhibited a higher rate of resistance to Erythromycin (N=23, 44.23%) and Penicillin G (N=21, 40.38%) with high susceptibility to Chloramphenicol (N=49, 94.23%) and Vancomycin (N=47, 90.38%). Two strains of *L. plantarum* (82 and 88), one of *E. faecalis* (18) and two of *E. faecium* (41 and 46) were chosen to continue research in future projects as they present greater bioprotective potential and evidence of harmlessness. More studies are needed to characterize the bioprotection mechanisms, as well as to guarantee the safety of these microorganisms before their use in the development of bioprocesses and/or industrial bioproducts.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Enterococcus*, safe, bioprotection, bacteriocin.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS	19
2.2 ESTABELECIMENTO DA COLEÇÃO DE TRABALHO E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LINHAGENS DE ENTEROCOCCI E LACTOBACILLI	19
2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DAS BACTÉRIAS LÁTICAS ENTEROCOCCI E LACTOBACILLI	20
2.4 IDENTIFICAÇÃO EM NÍVEL DE GÊNERO POR MEIO DE PCR MONOPLEX	20
2.5 IDENTIFICAÇÃO POR MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION – TIME OF FLIGHT (MALDI-TOF)	22
2.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS LINHAGENS DE ENTEROCOCCI E LACTOBACILLI	24
2.7 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	24
2.8 AVALIAÇÃO DA NATUREZA QUÍMICA DA(S) SUBSTÂNCIA(S) INIBITÓRIA(S)	25
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	26
3 RESULTADOS	26
3.1 ESTABELECIMENTO DA COLEÇÃO DE TRABALHO E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS DE ENTEROCOCCI E LACTOBACILLI	26
3.2 BIOPROTEÇÃO DE LINHAGENS DE ENTEROCOCCI E LACTOBACILLI CONTRA PATÓGENOS INDICADORES	38

3.3 VERIFICAÇÃO DA NATUREZA PROTEICA DA(S) SUBSTÂNCIA(S) INIBITÓRIA(S)	42
3.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	46
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa indicando as regiões das 100 amostras de queijos e leite utilizadas para isolar todas as cepas de enterococci e lactobacilli investigadas no presente estudo.	29
Figura 2 - Análise de agrupamento dos perfis moleculares obtidos de 48 <i>Lactobacillus</i> e 50 <i>Enterococcus</i> isolados de queijo artesanal, leite e massa de queijo.....	32
Figura 3 - Sensibilidade à amilase, pepsina e proteinase K dos compostos antagonistas produzidos pelos isolados 972, 794, 681, 7(23) e 15(74). a) Zona de inibição ao redor da colônia bacteriana. b) Alterações na zona de inibição após aplicação de amilase, pepsina e proteinase K. <i>E. faecalis</i> foi utilizado como microrganismo indicador no método spot-on-lawn. A figura é representativa de três placas replicadas.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados no estudo	22
Tabela 2 – Linhagens de <i>Enterococcus sp.</i> e lactobacilli utilizados no presente estudo	33
Tabela 3 – Efeito inibitório das linhagens de enterococci. e lactobacilli frente aos patógenos <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i> , a partir da medição do	

tamanho dos halos produzidos e das colônias formadas pelos spots das linhagens de enterococci e lactobacilli.....	39
Tabela 4 – Capacidade antimicrobiana medida em halos (mm) contra <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E.coli</i> e <i>E. faecalis</i> por lactobacilli	41
Tabela 5 – Capacidade antimicrobiana medida em halos (mm) <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E.coli</i> e <i>E. faecalis</i> por enterococci	41
Tabela 6 – Capacidade antimicrobiana medida em halos (mm) <i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. fecalis</i> por enterococci e lactobacilli de acordo com cada patógeno testado.	42
Tabela 7 – Relação halo/colônia da atividade antagonista produzidos por <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> e <i>E. faecium</i> frente aos patógenos <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> e <i>E. Faecalis</i> e sensibilidade das substâncias inibitórias produzidas por <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> e <i>E. faecium</i> , frente a enzimas proteolíticas contra o patógeno <i>E. faecalis</i>	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico 1 – Perfil de resistência antimicrobiana dos lactobacilli (Figura A) e dos enterococci (Figura B) frente aos antimicrobianos testados, onde cada cor representa uma espécie diferente. Distribuição do perfil de resistência antimicrobiana dos lactobacilli (A) e dos enterococci (B) aos antimicrobianos: penicilina G, ampicilina, vancomicina, gentamicina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e clotrimoxazol.....	48
--	----

1 INTRODUÇÃO

Linhagens de lactobacilli e enterococci desempenham papéis importantes em diversos processos biológicos, sendo amplamente estudadas devido aos seus efeitos benéficos, especialmente no contexto da microbiota intestinal e fermentação de alimentos. Esses microrganismos podem gerar diversos compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos (principalmente ácido láctico), peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, as quais têm a capacidade de inibir microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes (Castro et al., 2016; Kamimura et al., 2019; Margalho et al., 2020), ao fermentar os carboidratos da matriz, ou seja, dos produtos lácteos. . Portanto, estes gêneros apresentam diversas oportunidades de exploração biotecnológica, inclusive por alguns deles já obterem um histórico de uso seguro e serem considerados como potencialmente probióticos, que segundo a RDC 291/2018 é qualquer microrganismo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere algum tipo de benefício ao indivíduo (ANVISA, 2018; Peng et al., 2020).

A bioprospecção de microrganismos benéficos envolve a exploração de diversas fontes, incluindo ambientes naturais como solos e águas, microbiomas de diferentes organismos, coleções de cultura mantidas em laboratórios, e simbioses entre organismos. Esses esforços visam identificar microrganismos com potencial industrial, agrícola e médico, impulsionando descobertas que vão desde a produção de biocombustíveis até o desenvolvimento de novos medicamentos e produtos agrícolas. A prospecção de microrganismos benéficos presentes no leite e seus derivados é conduzida devido ao interesse científico e industrial em potenciais aplicações. O leite é reconhecido como um ambiente propício ao desenvolvimento de uma diversidade de microrganismos, alguns dos quais podem apresentar propriedades vantajosas para a saúde humana. Além disso, esses microrganismos desempenham um papel essencial na fermentação de produtos lácteos, influenciando diretamente suas características organolépticas e sensoriais. A identificação e caracterização desses microrganismos é crucial para otimizar os processos de fermentação e para o desenvolvimento de alimentos funcionais que

possam promover benefícios à saúde, como a inclusão de probióticos. Em suma, a prospecção desses microrganismos visa tanto aprimorar a produção de alimentos quanto contribuir para a oferta de opções alimentares que possam promover a saúde e o bem-estar humano (Mozzi, 2015; Sanlibaba & Çakmak, 2016). O gênero predominante em queijos artesanais e no leite é *Enterococcus* (Arcuri et al., 2013; Bruno et al., 2007; Carvalho, 2007; Castro et al., 2016 Dias et al., 2014; Fialho et al., 2018; Kamimura et al., 2019). No entanto, essa predominância está sujeita a uma série de influências, que abrangem desde a questão dos animais até as condições de temperatura e ambiente, dentre outros fatores. As bactérias do gênero *Enterococcus* spp., demonstram notável capacidade de crescimento e sobrevivência em ambientes adversos. Elas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, na água e em produtos vegetais e animais não processados. O gênero *Enterococcus* desempenha um papel crucial no desenvolvimento das características sensoriais em produtos fermentados, contribuindo por meio de geração de compostos aromáticos voláteis e da sua atividade lipolítica e proteolítica, além de sua habilidade em metabolizar o citrato (Prichula et al., 2013; Tebaldi et al., 2008; Menezes et al., 2014).

Os lactobacilli, que são bactérias Gram-positivas com significativo valor biotecnológico que estão naturalmente presentes em ambientes ricos em nutrientes, incluindo alimentos, rações, plantas, animais e o trato intestinal humano (Duar et al., 2017). No contexto humano, as espécies de lactobacilli fazem parte da microbiota intestinal residente, desempenhando um papel crucial em diversos benefícios para a saúde (Ilinskaya et al., 2017).

A produção de ácido láctico por lactobacilli, a partir da fermentação, contribui para a preservação de alimentos, inibindo o crescimento de microrganismos indesejados. Além disso, algumas cepas de lactobacilli também produzem substâncias antimicrobianas que ajudam na inibição de patógenos (Evivie et al., 2017). Portanto, os lactobacilli são amplamente empregados como bioprotetores para preservar alimentos, principalmente os de origem láctea (Gueimonde et al., 2013). Considerando a heterogeneidade do gênero *Lactobacillus* (n=261 espécies), Zheng et al. (2020) sugeriram a redistribuição das espécies em 25 gêneros levando

em consideração a filogenia do genoma central, identidade de bases nitrogenadas, genes de assinatura, critérios fisiológicos e a ecologia dos organismos. Essa reclassificação reflete a posição filogenética dos microrganismos e agrupa lactobacilos em clados robustos com propriedades ecológicas e metabólicas compartilhadas. De acordo com Silva (2016), espécies de lactobacilli desempenham um papel fundamental no desenvolvimento das características sensoriais distintas nos queijos ao longo do processo de maturação. Assim como os lactobacilli, os enterococci também são capazes de acidificar o produto lácteo para bioproteção contra microrganismos deteriorantes ou patogênicos (Evvie et al., 2017).

Bioproteção refere-se ao uso de microrganismos benéficos para proteger produtos alimentícios contra deterioração ou contaminação microbiana indesejada, seja por microrganismos patogênicos ou deteriorantes. Essa abordagem busca substituir ou reduzir a dependência de produtos químicos sintéticos na preservação de alimentos. Os microrganismos indesejados podem ser prejudiciais tanto para o consumidor, podendo causar doenças, quanto para o produto final (Lopes et al., 2023). As espécies mais comumente encontrados contaminando alimentos derivados do leite são *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*. Essas espécies podem causar deterioração no alimento ou adoecer o consumidor final. Estudos tem mostrado que culturas bioprotetoras podem ser utilizadas para controle dessas bactérias, por isso este trabalho teve como objetivo avaliar o poder antagônico de lactobacilli e enterococci frente a patógenos Gram positivos e Gram negativos importantes na cadeia produtiva do leite.

A utilização de lactobacilos e enterococos para a preservação biológica de alimentos pode ocorrer por diferentes meios: i) competindo por nutrientes e espaço com microrganismos indesejados, dificultando o seu desenvolvimento; ii) gerando ácido lático para acidificar o ambiente, criando condições desfavoráveis para muitos microrganismos patogênicos; iii) produzindo substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, que exibem propriedades inibitórias contra outros microrganismos (Lopes et al., 2023).

Bacteriocinas são peptídeos que possuem características como termoestabilidade, alto ponto isoelétrico e facilidade de digestão pelo trato gastrointestinal humano. Geralmente, essas substâncias alteram a permeabilidade da membrana plasmática, formando poros e induzindo a saída de moléculas de baixo peso molecular da bactéria alvo. As bacteriocinas são proteínas antimicrobianas produzidas por bactérias, capazes de inibir o crescimento ou matar outras bactérias, incluindo cepas patogênicas. Elas desempenham um papel importante na competição entre microrganismos em ambientes naturais e têm potencial aplicação como agentes antimicrobianos em diversos setores, incluindo a indústria de alimentos e a medicina (Ljungh e Wadstrom, 2006; Chen e Hoover, 2003).

Enterocinas, por sua vez, são bacteriocinas produzidas por microrganismos do gênero *Enterococcus*, apresentando propriedades antimicrobianas capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos, incluindo os patogênicos. Os enterococos, conhecidos por serem produtores de enterocinas, utilizam essas substâncias como parte de seu sistema de defesa para competir com outros microrganismos no mesmo ambiente. O mecanismo de ação das enterocinas varia, mas muitas delas prejudicam a integridade da membrana celular das bactérias-alvo, e algumas também afetam processos metabólicos específicos nos microrganismos inibidos (Grande Burgos et al., 2014; Abriouel et al., 2010; Huang et al., 2013).

No contexto da indústria alimentícia, as bacteriocinas produzidas pelos lactobacilos despertam interesse devido à sua capacidade de atuarem como conservantes naturais. Diferentes cepas de lactobacilos podem gerar diferentes tipos de bacteriocinas, sendo nisina, acidocina, lactocina e plantaricina algumas das mais comuns. Semelhante às enterocinas, esses peptídeos desempenham papel crucial como agentes antimicrobianos na competição em ambientes desafiadores (Todorov, 2009; Nilsen et al., 2020).

As plantaricinas, predominantemente produzidas por *L. plantarum*, mas também identificadas em *Lactiplantibacillus paraplantarum* e *L. pentosus*, agem causando danos à membrana celular das bactérias-alvo. Além disso, algumas plantaricinas influenciam processos metabólicos específicos nas bactérias inibidas.

Cepas de lactobacilos que produzem plantaricinas são utilizadas como probióticos devido aos potenciais benefícios para a saúde intestinal, contribuindo para a capacidade dessas cepas probióticas de competir e inibir o crescimento de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal (Todorov et al., 2009; Machado, 2023; Londoño et al., 2015).

As enterocinas e plantaricinas podem ser consideradas as melhores bacteriocinas para conservar alimentos em geral, para saúde animal, humana e para a cadeia produtiva do leite, quando comparadas com os antimicrobianos comercialmente disponíveis. De forma diferente destes antimicrobianos, as bacteriocinas não conferem resistência antimicrobiana à microbiota natural do indivíduo, não deixam resíduos nos produtos de origem animal, podem ser úteis no controle de infecções e na redução ou eliminação de patógenos entéricos e são mais seguras (Melo et al., 2005).

Enterococci e lactobacilli se mostram promissores na bioproteção de alimentos e na inibição de microrganismos indesejados. Nesse contexto e considerando a crescente preferência por produtos naturais, a aceitação de linhagens de lactobacilli e enterococci pela indústria e órgãos reguladores, o objetivo desse trabalho foi caracterizar lactobacilli e enterococci isolados da cadeia produtiva de queijos artesanais quanto à identificação taxonomica, atividade antagonista contra deteriorantes e patógenos, sensibilidade a antimicrobianos e natureza das substâncias antimicrobianas produzidas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

No presente estudo, foram utilizadas inicialmente 140 BAL (58 bastonetes e 82 cocos) pertencentes à coleção de trabalho da linha de pesquisa em bactérias do ácido lático da Embrapa, sediada em Juiz de Fora, MG, previamente isoladas de queijo coalho artesanal, leite cru, massa de queijo e de queijo artesanal provenientes de vários estados e regiões brasileiras . Os isolados em forma de bastonete foram previamente identificados como lactobacilli e os isolados em forma de cocos foram triados, para identificação de enterococci, ambos por PCR gênero específica. Os estoques microbianos foram conservados em leite com glicerol 10%, congelados a -20°C. A recuperação das amostras foi feita por estrias de esgotamento a partir de 10 µL do estoque e inoculação em placas de Petri contendo ágar MRS e incubadas por 48h a 35°C em condições de aerobiose. As análises subsequentes foram realizadas apenas com isolados pertencentes aos grupos dos lactobacilli e enterococci, após confirmada a identificação.

2.2 FORMAÇÃO DA COLEÇÃO DE TRABALHO E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LINHAGENS DE ENTEROCOCCI E LACTOBACILLI

A dissimilaridade genética entre os 140 isolados bacterianos foi avaliada por Rep-PCR, assim como proposto por Versalovic et al. (1994), utilizando o kit da Promega (Promega Corporation, USA). Cada reação consistiu em tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de Primer REP-PCR (Tabela 1) e 0,06 U/µL de Taq DNA Polimerase em um volume final de 25 µL. Com o auxílio de uma ponteira P10, uma colônia foi adicionada em cada reações. O seguinte programa foi

utilizado no termociclador GeneAmp PCR Sistem 9700 (Applied Biosystems, USA) para amplificação: 1 ciclo (95°C por 15 minutos), 30 ciclos (95°C por 30 segundos, 40°C por 1 minuto e 65°C por 8 minutos) e um último ciclo (65°C por 10 minutos).

As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Ludwig Biotec, Brasil), utilizando ddp 80v por aproximadamente 120 minutos. Em cada gel, foi utilizado marcador 1Kb DNA Ladder (Promega Corporation, USA) nas primeira e última canaletas. Ao final da corrida, os géis foram corados em brometo de etídeo 0,01% (Sigma-Aldrich, USA) por 8 minutos e em seguida, banhados em água destilada por 2 a 3 horas. A fotodocumentação das imagens dos géis foi realizada no equipamento L'PIX EX (Loccus Biotecnologia, Brasil) para visualização das regiões amplificadas.

Imagens dos géis foram salvas diretamente como arquivos em formato TIFF e os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando o software Bionumerics® v.6.6.11 (Applied Maths, Belgium). A similaridade entre os perfis digitalizados foi calculada usando coeficiente de Jaccard; e a relação entre as cepas avaliadas através da construção de dendrogramas utilizando o algoritmo UPGMA (Gevers, Huys, Swings, 2001).

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DAS BACTÉRIAS LÁTICAS ENTEROCOCCI E LACTOBACILLI

O DNA genômico de todas as BAL geneticamente distintas foi extraído e purificado com o método que utiliza fenol-clorofórmio, descrito por Hesselbarth e Schwarz (1995). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop; a solução contendo o DNA extraído foi diluída e armazenada em microtubos na concentração de 25 ng/uL a – 20°C.

2.4 IDENTIFICAÇÃO EM NÍVEL DE GÊNERO POR MEIO DE PCR MONOPLEX

Inicialmente, todos os isolados foram submetidos à identificação em nível de gênero por PCR (DUBEMET et al., 2002; SENAN et al., 2008; DEYSE et al., 2000). As reações foram realizadas utilizando colônia bacteriana como fonte de DNA molde. Como branco, foi utilizada uma mistura da mesma reação de PCR sem adição de DNA. Após a amplificação, as reações foram congeladas para posterior análise. As reações de PCR monoplex para o antigo gênero *Lactobacillus* spp. e o gênero *Enterococcus* spp. foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Ludwig Biotec, Brasil), utilizando ddp 120v por aproximadamente 120 minutos. Como padrão de tamanho molecular, foi utilizado o marcador 100bp DNA Ladder da Promega (Promega Corporation, USA). Ao final da corrida, os géis foram corados com brometo de etídio 0,01% (Sigma-Aldrich, USA) por 8 minutos e, em seguida, banhados em água destilada. A fotodocumentação foi feita no fotodocumentador LPIXEX (Loccus Biotecnologia, Brasil) para visualização das regiões amplificadas.

Todas as colônias com a forma de bacilos foram submetidas à identificação molecular utilizando oligonucleotídeos específicos para o “antigo” gênero *Lactobacillus*, como proposto por Dubernet et al. (2002) e Senan et al. (2008). Como controle positivo da PCR foram usados 25 ng de DNA genômico de *Lacticaseibacillus casei* previamente extraído e purificado.

Para os isolados com a forma de cocos, foram feitas reações de PCR monoplex para a identificação de isolados pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp., como proposto por Deyse et al. (2000). A modificação foi apenas a substituição de NH_4 16mM por tampão 5x na reação final da PCR. Como controles positivos das PCRs foram realizadas reações a partir de alíquotas de 1 uL de amostras de DNA genômico de *Enterococcus faecalis* na concentração de 25 ng/uL (previamente extraído e purificado).

Tabela 1 - Primers utilizados no estudo afim de identificar os gêneros de BAL isoladas de leite cru, massa de queijo e queijo artesanal

Nome	Locus	Gênero Alvo	Sequência 5' – 3'	Tamanho do Amplicon	Referência
LBLM A1	r16S	<i>Lactobacillus</i> spp.	CTCAAAACTAAACAAAGTT TC	250 pb	Dubemet et al. (2002) e Senan et al. (2008)
	r16S/23S		CTTGTACACACCGCCCGT		
R16-1	ITS		CA		
E1	r16S	<i>Enterococcus</i> spp.	TCAACCGGGGAGGGT	733 pb	Deyse et al. (2000)
E2			ATTACTAGCGATTCCGG		
REP- PCR	r16S	-	GCGTCCCTCCATTGTTCA AACAAAG GTGGTGGTGGTGGTG	-	Almeida (2014)

2.5 IDENTIFICAÇÃO POR MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION – TIME OF FLIGHT (MALDI-TOF)

A identificação taxonômica das linhagens de lactobacilli e enterococci geneticamente não redundantes foi realizada também por MALDI-TOF, seguindo o procedimento proposto por Nacef et al., 2017. Os perfis de proteínas foram adquiridos em triplicata a partir das culturas bacterianas, seguindo o protocolo de

extração com etanol/ácido fórmico. Duzentos microlitros do caldo de cultura foram coletados e passaram por duas lavagens com água Milli-Q estéril por centrifugação a 16.000 g por 1 minuto. Após remover o sobrenadante, o precipitado celular foi ressuspenso em 300µL de água Milli-Q estéril. As bactérias foram então inativadas com a adição de 900µL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich). Após centrifugação a 16.000 g por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco ao ar ambiente por 10 minutos. A extração das proteínas celulares foi realizada pela adição de 10µL de ácido fórmico 70% (Sigma-Aldrich) ao sedimento, seguido por 10µL de acetonitrila pura (Sigma-Aldrich). A mistura foi homogeneizada, novamente centrifugada (16.000g/2 minutos). Então, 1 µL do sobrenadante foi aplicado em um poço da placa de MALDI (Bruker Daltonics) e seco ao ar ambiente. Cada amostra foi recoberta com 1µL da matriz para MALDI, ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich), em uma solução contendo 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoracético (v/v), seguido de secagem ao ar. Os espectros de massas foram adquiridos usando um espectrômetro de massas Autoflex III SmartBeam (Bruker Daltonics) equipado com um laser de 200Hz, operando em modo linear positivo, com uma faixa de massa de 2.000 a 20.000 Daltons. A calibração externa foi realizada usando a mistura de calibrantes padrão Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics). Os parâmetros do equipamento incluíram uma tensão de fonte IS1 de 20kV, tensão de fonte IS2 de 18,55kV, tensão de lente de 8,80kV e um tempo de retardo de extração de íons de 240ns. Foram realizados disparos de laser aleatórios com uma taxa de amostragem de picos de 0,5GS/s, totalizando 2000 espectros, que foram somados e processados usando o algoritmo de detecção de picos tipo centróide do programa FlexControl 3.3 (Bruker Daltonics), resultando no espectro bruto de cada amostra, sendo consideradas identificação de alta confiança quando os valores de pontuação (score value) ficaram entre 3,0 e 2,0; de média confiança quando os scores ficaram entre 1,70 e 1,99; e como não identificável scores menores que 1,69 (Nacef et al., 2017).

2.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS LINHAGENS DE ENTEROCOCCI E LACTOBACILLI

A avaliação da atividade antagonista das linhagens de enterococci e lactobacilli foi realizada pelo método *spot on the lawn*, como proposto por Tagg et al. (1976), com modificações. Todas as 98 BAL (52 enterococci e 48 lactobacilli) que não foram consideradas clones, classificadas como bactérias teste, foram testadas contra quatro patógenos indicadores: *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12401) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

Inicialmente, as bactérias teste e as indicadoras foram inoculadas em ágar MRS e BHI, respectivamente, e incubadas a 35°C por 24h. Após o crescimento, 3 colônias isoladas das bactérias teste foram inoculadas em 1.000 µL de caldo MRS e incubadas a 35°C por 24h. Em seguida, 5 µL do caldo contendo a bactérias teste foram adicionados em diferentes *spots* (5 por placa) em uma placa de Petri contendo ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, EUA) e incubada a 35°C por 24 h, em aerobiose. As bactérias indicadoras foram inoculadas em 10 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C por 4 horas. Após o período de incubação, 100 µL do caldo contendo as bactérias indicadoras foram adicionados a 7 mL de ágar BHI semissólido e vertidos na placa de MRS formando uma camada sobre os *spots*. A placa de Petri foi reincubada por 14 a 18 horas a 35°C sem condições de anaerobiose. Os halos de inibição foram medidos (em mm) com o auxílio de uma régua milimetrada desconsiderando o diâmetro da colônia, e sendo a presença de halo considerada evidência favorável à capacidade da bactéria teste de inibir a indicadora.

2.7 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi feito pelo método de difusão de discos proposto por Bauer et al. (1966) com modificações feitas por Santos et al.

(2020). Para tal, as linhagens foram reativadas em ágar MRS a 37°C por 24h com três esgotamentos para obtenção de colônias isoladas. Após o crescimento e confirmação de pureza genética, foram coletadas 3 colônias isoladas para inoculação em caldo MRS (Difco Laboratories, USA) e incubadas por 24h a 37°C. Após o crescimento, 100 µL da cultura foram inoculados em placas de Petri contendo 25 mL de ágar MRS (Difco Laboratories Inc.,USA) e espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalski por toda a placa. Em seguida, 9 discos contendo antimicrobianos (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) foram colocados na placa de Petri. Os antimicrobianos usados foram: penicilina G (10 µg por disco), ampicilina (10 µg por disco), vancomicina (30 µg por disco), gentamicina (10 µg por disco), estreptomicina (10 µg por disco), tetraciclina (30 µg por disco), cloranfenicol (30 µg por disco), eritromicina (15 µg por disco), além de cotrimoxazol (1,25 µg de trimetoprim e 23,75 µg de sulfametoxazol por disco) (Santos et al., 2020). As placas foram incubadas sem condições de anaerobiose por 24h, a 35°C. Para a avaliação dos resultados, os halos de inibição (mm) foram medidos com uma régua milimetrada. As cepas com halos de inibição igual ou inferior a 19 mm para a penicilina G; 14 mm para vancomicina e tetraciclina; 13 mm para cloranfenicol e eritromicina; 12 mm para ampicilina e gentamicina; 11 mm para estreptomicina; e 10 mm para Cotrimoxazol foram considerados resistentes ao respectivo antibiótico, assim como proposto por Charteris et al. (2001). Este ensaio foi realizado em triplicata.

2.8 AVALIAÇÃO DA NATUREZA QUÍMICA DA(S) SUBSTÂNCIA(S) INIBITÓRIA(S)

Foi utilizada a metodologia proposta por Lewus e Montville (1991) e adaptada por Dos Santos (2015) para avaliação da sensibilidade das substâncias inibitórias a proteases. Para a realização, foi repetido o mesmo procedimento descrito no item 2.6, com algumas alterações. Antes de verter o BHI semi-sólido na placa de Petri, foram adicionados 5 µL de uma solução aquosa de Proteinase K (20 mg/mL), Amilase (20 mg/mL) e Pepsina (20 mg/mL) ao lado do inóculo da cultura de BAL e incubada a 35°C por mais duas horas. A placa foi então recoberta com 7 mL de

caldo BHI semi-sólido contendo a cultura indicadora. A ausência de halo de inibição na região onde foi aplicada a protease (formando uma meia lua) foi considerada indicativa da origem proteica da substância inibitória. O teste foi realizado em triplicata tendo como controle negativo uma placa sem acrescentar as enzimas digestivas.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados coletados foram descritos em planilha do programa Microsoft Excel 365. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, também conhecido como teste U de Mann-Whitney, para comparar as medianas dos tamanhos dos halos produzidos pelas BAL contra os patógenos. O $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para o intervalo de confiança (IC) de 95%.

3 RESULTADOS

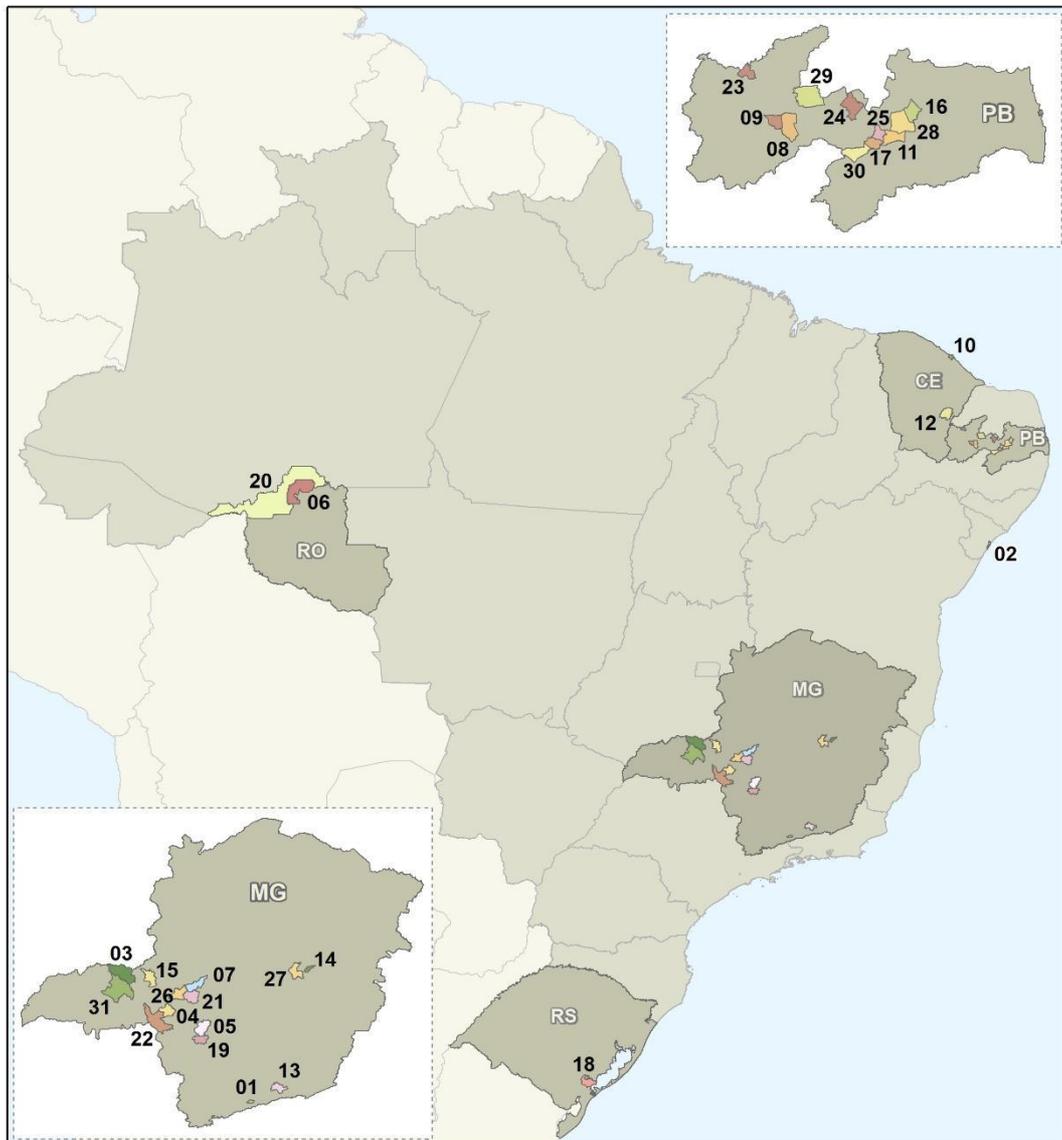
3.1 FORMAÇÃO DA COLEÇÃO DE TRABALHO E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS DE ENTEROCOCCI E LACTOBACILLI

Um total de 140 exemplares de bactérias lácticas em forma de cocos ($n=82$) e de bastonetes ($n=58$), previamente isoladas de amostras de queijo e leite, originárias de vários estados brasileiros (Figura 1) foram caracterizadas por REP-PCR, visando constituir a coleção de microrganismos somente com linhagens geneticamente não redundantes. A comparação dos fingerprints de DNA por inspeção visual e com auxílio do software Bionumerics® v.6.6.11 (Applied Maths, Belgium) evidenciou uma diversidade genética nesta população e permitiu a escolha de 63 cocos e 60 bacilos geneticamente não redundantes.

Sessenta e três linhagens em forma de cocos e as sessenta linhagens em forma de bacilos consideradas geneticamente não redundantes foram avaliadas por PCR

monoplex utilizando primers específicos para a amplificação de fragmentos de DNA de 733 e 250 pb específicos e exclusivos dos genomas de linhagens de enterococci e lactobacilli, respectivamente.

Municípios de origem das amostras lácteas utilizadas no trabalho

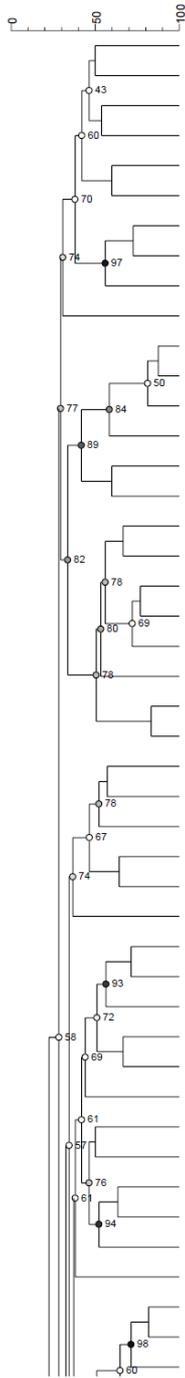


01	Alagoa	09	Emas	17	Parari	25	Santo André
02	Aracaju	10	Fortaleza	18	Pelotas	26	Serra do Salitre
03	Araguari	11	Gurjão	19	Piumhi	27	Serro
04	Araxá	12	Jaguaribe	20	Porto Velho	28	Soledade
05	Bambuí	13	Lima Duarte	21	Rio Paranaíba	29	São José de Espinharas
06	Candeias do Jamari	14	Materlândia	22	Sacramento	30	São José dos Cordeiros
07	Carmo do Paranaíba	15	Monte Carmelo	23	Santa Cruz	31	Uberlândia
08	Catingueira	16	Olivedos	24	Santa Luzia		

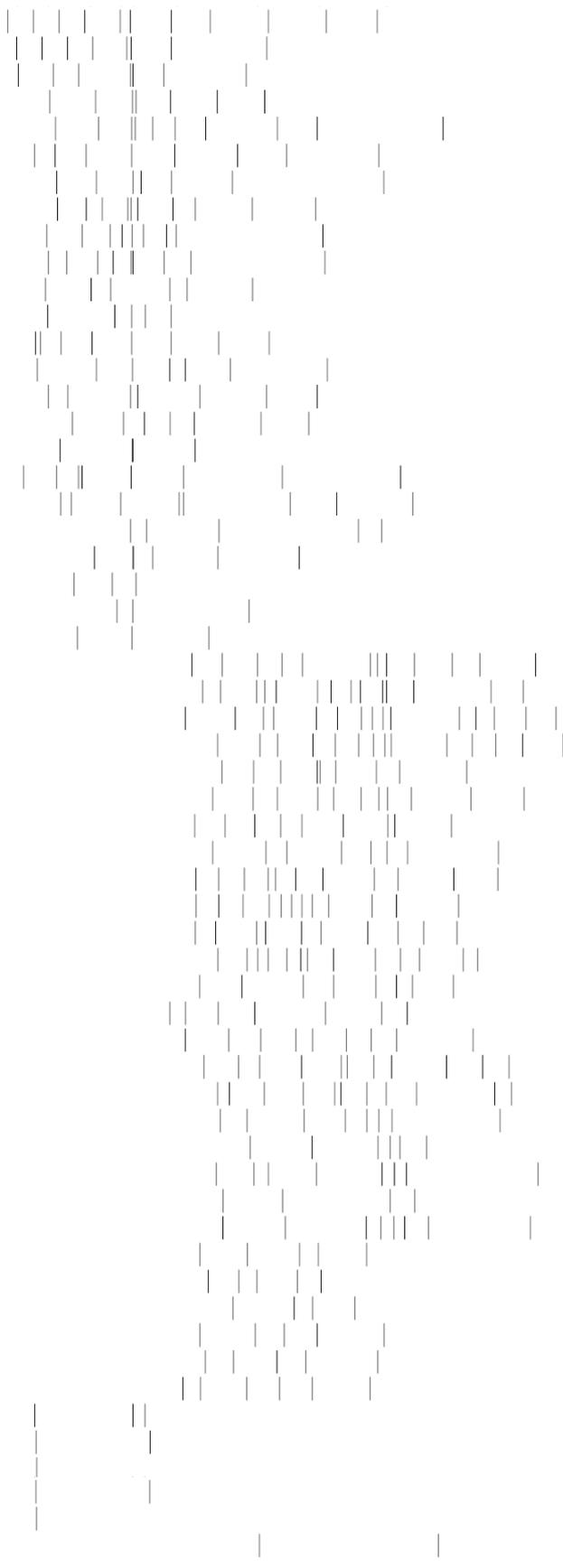
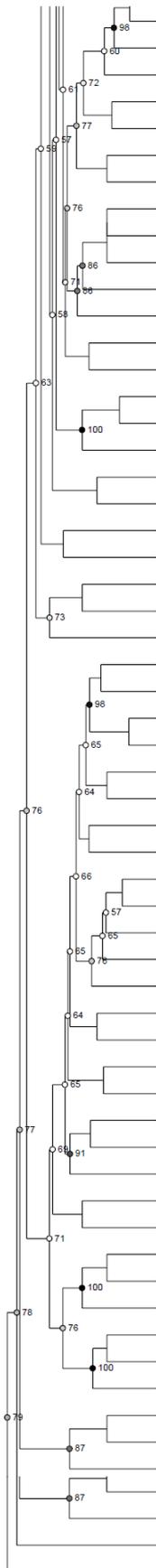
Figura 1 - Mapa indicando as regiões das 98 amostras de queijos e leite utilizadas para isolar todas as cepas de enterococci e lactobacilli investigadas no presente estudo.

Cinquenta e duas linhagens apresentaram o fragmento 733 pb, sendo consideradas pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. e 48 linhagens apresentaram o fragmento 250 pb sendo consideradas lactobacilli. Deste modo, a prospecção de linhagens bioprotetoras foi realizada a partir de 98 linhagens no total. As linhagens a partir das quais os fragmentos de DNA de 733 e 250 pb não foram amplificados, foram consideradas não pertencentes ao escopo do presente trabalho e, portanto, não foram incluídas nas etapas subsequentes.

A análise de agrupamento de impressões genéticas de lactobacilli e enterococci realizada demonstrou uma grande variabilidade genética dentre as cepas isoladas de cada região estudada no presente estudo, assim como mostra a Figura 2.



- 2(8)
- 3(9)
- 3(14)
- RO1
- 5(15)
- RO12
- 14(68)
- 16(40)#
- 15(73)
- 932
- 794
- 797
- RS5
- 750
- RO17
- RO8
- RS14
- RS16
- RS4
- RS7
- RS10
- 19(53)
- 933
- 972
- 18(49)
- 717
- 657
- 733
- 831
- 13(37)
- 18(47)M
- 582
- 15(74)
- 16(39)
- 757
- 2(P) (Tabuleiros)
- 687
- 765
- 17(46)
- 746
- RO16
- 739
- 15(71)
- 16(42)
- 17(45)M



- 16(42)
- 17(45)M
- 19(51)B
- 8(28)
- RO21
- 16(40)
- 18(48)
- 20(57)
- 523
- 788
- RO4
- 7(25)
- 16(41)
- 763
- 2(G) (Tabuleiros)
- 5(17)P
- 720
- 617
- RO10
- 7 (Tabuleiros)
- RS6
- 13(35)
- 844
- 681
- 1022
- 373
- 1115
- 253
- 1057
- 249
- 1020
- 696
- 1170
- 271
- 1054
- 690
- 378
- 1(2)P
- 690a
- 274
- 690b
- 463
- 566
- 473
- 1023
- 477
- 457
- 624
- 730
- 1083
- 468
- 718
- 7(23)
- 815
- 6(22)P
- 815
- 6(22)P
- 1(1)
- 3(10)

Figura 2 - Análise de agrupamento dos perfis moleculares obtidos de 48 *Lactobacillus* spp. e 50 *Enterococcus* spp. isolados de queijo artesanal, leite e massa de queijo.

Todas as linhagens de enterococci e lactobacilli foram identificadas pela técnica de MALDI-TOF em nível de espécie com scores de identificação variando de 1,72 a 2,8 sendo encontradas três espécies do gênero *Enterococcus* e nove espécies de lactobacilli. As espécies encontradas foram: *Enterococcus faecium* (N=31), *Enterococcus faecalis* (N=17), *Enterococcus durans* (N=4) *Lactiplantibacillus plantarum* (N=14), *Lacticaseibacillus paracasei* (N=12), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (N=12), *Lactiplantibacillus pentosus* (N=4), *Limosilactobacillus fermentum* (N=2), *Lactobacillus johnsonii* (N=1), *Lentilactobacillus hilgardii* (N=1), *Lentilactobacillus parabuchneri* (N=1) e *Levilactobacillus brevis* (N=1). A Tabela 2 apresenta um resumo com a identificação de cada uma das linhagens geneticamente não redundantes identificadas no nível de espécie.

Tabela 2 – Linhagens de *Enterococcus* sp. e lactobacilli utilizados no presente estudo

		Matriz/Local de Coleta	PCR ID	Maldi-tof ID
1023	1	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus durans</i>
18(49)	2	Leite cru (tanque comunitário)/Ema-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus durans</i>
750	3	Queijo artesanal, Araxá/Sacramento-MG	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus durans</i>
15(71)	4	Leite cru (tanque individual)/São José de Espinhares-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus durans</i>
RS06	5	Silagem de colostro/Pelotas-RS	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
2G	6	Leite cru/Aracaju-SE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
696	7	Leite/Jaguaribe – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
463	8	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
RO17	9	Leite cru/Candeias do Jamari-RO	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
3(9)	10	Leite cru (tanque comunitário)/(Soledade-PB)	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
7(25)	11	Leite cru (tanque comunitário)/Parari-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
566	12	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
477	13	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
3(10)	14	Leite cru (tanque comunitário)/Soledade-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
3(14)	15	Leite cru (tanque comunitário)/Soledade-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
RO1	16	Leite cru/Porto Velho-RO	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>

RO8	17	Leite cru/Candeias do Jamari-RO	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
681	18	Queijo artesanal, Araxá/Araxá-MG	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
19(53)	19	Leite cru (tanque comunitário)/Santa Cruz-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
624	20	Leite/Jaguaribe – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
473	21	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
1(1)	22	Leite cru (tanque)/Soledade-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
14(68)	23	Leite cru (tanque individual)/São José de Espinhares-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
1(2)P	24	Leite cru (tanque)/Soledade-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
16(42)	25	Leite cru (tanque comunitário)/São José de Espinhares-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
18(47)M	26	Leite cru (tanque comunitário)/Ema-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
18(48)	27	Leite cru (tanque comunitário)/Ema-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
16(41)	28	Leite cru (tanque comunitário)/São José de Espinhares-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
468	29	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
457	30	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
657	31	Queijo artesanal, Canastra/Piumhi-MG	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
17(45)M	32	Leite cru (tanque comunitário)/Catingueira-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
16(40)	33	Leite cru (tanque comunitário)/São José de Espinhares-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
16(40)≠	34	Leite cru (tanque comunitário)/São José de Espinhares-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
13(37)	35	Leite cru (tanque comunitário)/Santa Luzia-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
5(17)P	36	Leite cru (tanque comunitário)/Gurjão-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
13(35)	37	Leite cru (tanque comunitário)/Santa Luzia-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>

5(15)	38	Leite cru (tanque comunitário)/Gurjão-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
1083	39	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
730	40	Massa de queijo/Jaguaribe – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
15(74)	41	Leite cru (tanque individual)/São José de Espinhares-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
15(73)	42	Leite cru (tanque individual)/São José de Espinhares-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
19(51)B	43	Leite cru (tanque comunitário)/Santa Cruz-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
6(22)P	44	Leite cru (tanque comunitário)/Santo André-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
16(39)	45	Leite cru/São José de Espinhares-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
7(23)	46	Leite cru/Pariri-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
718	47	Massa de Queijo/Jaguaribe – CE	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
RO4	48	Leite cru/Candeias do Jamari-RO	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
20(57)	49	Leite cru/Olivedos-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
523	50	Queijo artesanal, Canastra/BambuÍ-MG	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
8(28)	51	Leite cru (tanque comunitário)/São José dos Cordeiros-PB	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
720	52	Queijo artesanal, Triângulo/Araguari-MG	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecium</i>
933	53	Queijo artesanal, Serra do Salitre/Serra do Salitre-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
1020	54	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
2(8)	55	Leite cru (tanque/Soledade-PB	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
RS05	56	Silagem de colostro/Pelotas-RS	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
739	57	Queijo artesanal, Triângulo/Monte Carmelo-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
RS04	58	Silagem de colostro/Pelotas-RS	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>

17(46)	59	Leite cru/Catingueira-PB	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
RS10	60	Silagem de colostro/Pelotas-RS	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
RS14	61	Colostro/Pelotas-RS	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
RO10	62	Leite cru/Candeias do Jamari-RO	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
RO21	63	Leite cru/Porto Velho-RO	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
2P	64	Leite cru/Aracaju-SE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
7	65	Leite cru/Aracaju-SE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
815	66	Queijo artesanal, Serra do Salitre/Serra do Salitre-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
844	67	Queijo artesanal, Cerrado/Rio Parnaíba-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
757	68	Queijo artesanal, Araxá/Sacramento-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
617	69	Queijo artesanal, Alagoa/Alagoa-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
RS16	70	Colostro/Pelotas-RS	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
253	71	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
1115	72	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
717	73	Queijo artesanal, Serra do Salitre/Serra do Salitre-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
RO12	74	Leite cru/Candeias do Jamari-RO	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
797	75	Queijo artesanal, Serro/Materlândia-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
249G	76	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
274	77	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
690b	78	Leite/Jaguaribe – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
1022	79	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>

746	80	Queijo artesanal, Araxá/Araxá-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
932	81	Queijo artesanal, Serra do Salitre/Serra do Salitre-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
794	82	Queijo artesanal, Serro/Materlândia-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
788	83	Queijo artesanal, Serro/ Materlândia-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
582	84	Queijo artesanal, Serro/ Serro-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
765	85	Queijo artesanal, Araxá/Sacramento-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
763	86	Queijo artesanal, Araxá/Araxá-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
687	87	Queijo artesanal, Canastra/Piumhi-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
972	88	Queijo artesanal, Serras de Ibitipoca/Ibitipoca-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
271	89	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
373	90	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
690	91	Leite/Jaguaribe – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
690 ^a	92	Leite/Jaguaribe – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
1057 ^a	93	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
RO16	94	Leite cru/Candeias do Jamari-RO	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
831	95	Queijo artesanal, Cerrado/Carmo de Carnaíba-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus jonhsonii</i>
733	96	Queijo artesanal, Triângulo/Uberlândia-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>
RS07	97	Silagem de colostro/Pelotas-RS	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>
1054	98	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Levilactobacillus brevis</i>
1170 ^a	99	Queijo coalho artesanal/Fortaleza – CE	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
278	100	Queijo artesanal, Serro/Serro-MG	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>

3.2 BIOPROTEÇÃO DE LINHAGENS DE ENTEROCOCCI E LACTOBACILLI CONTRA PATÓGENOS INDICADORES

Um total de 91 linhagens de lactobacilli e enterococci apresentaram formação de halo, demonstrando alguma atividade antagonista contra os patógenos *S. aureus* e *S. agalactiae*. Apenas nove linhagens não apresentaram formação de halo, sendo sete delas lactobacilli e dois enterococci para *S. aureus* e nove lactobacilli para *S. agalactiae*. Oitenta e nove linhagens de lactobacilli e enterococci apresentaram formação de halo, evidenciando atividade antagonista contra o patógeno *E. coli*, indicando que onze linhagens não apresentaram nenhuma atividade contra *E. coli*, sendo elas oito lactobacilli e três enterococci. Finalmente, oitenta e duas linhagens de lactobacilli e enterococci apresentaram formação de halo demonstrando atividade antagonista para o patógeno *E. faecalis*. Onze linhagens não apresentaram formação de halo, sendo sete delas lactobacilli e onze delas enterococci. Trinta e uma linhagens testadas apresentaram alta capacidade inibitória contra os patógenos *E. coli* e *E. faecalis*, enquanto treze apresentaram alta capacidade inibitória contra *S. agalactiae*, sendo 11 delas enterococci, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Efeito inibitório das linhagens de enterococci. e lactobacilli frente aos patógenos *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. coli* e *E. faecalis*, a partir da medição do tamanho dos halos produzidos e das colônias formadas pelos spots das linhagens de enterococci e lactobacilli.

	Zona de Inibição (H/C) mm												
	Total	+				++				+++			
		S. <i>aureus</i>	S. <i>agalactiae</i>	E. <i>coli</i>	E. <i>faecalis</i>	S. <i>aureus</i>	S. <i>agalactiae</i>	E. <i>coli</i>	E. <i>faecalis</i>	S. <i>aureus</i>	S. <i>agalactiae</i>	E. <i>coli</i>	E. <i>faecalis</i>
<i>Levilactobacillus brevis</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2	0	2	1	0	2	0	1	0	0	0	0	2
<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Lactobacillus jonhsonii</i>	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	12	3	5	4	6	5	5	6	4	2	0	0	8
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	4	0	1	0	1	2	2	1	3	1	0	2	1
<i>Lactiplantibacillus</i>	14	1	5	1	2	6	6	4	5	5	2	8	7

<i>plantarum</i>													
<i>Lactiseibacillus</i>													
<i>rhamnosus</i>	12	1	2	0	3	4	6	3	6	3	0	5	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	8	4	3	9	5	8	9	5	4	5	5	3
<i>Enterococcus faecium</i>	31	10	8	12	19	15	18	10	10	6	5	9	2
<i>Enterococcus durans</i>	4	1	1	2	1	3	2	1	1	0	1	1	2

+ Baixa capacidade inibitória (0 mm – 1 mm H/C); ++ Média capacidade inibitória (1 mm – 2 mm H/C); +++ Alta capacidade inibitória (2 mm – 3 mm H/C)

Tabela 4 – Capacidade antimicrobiana medida em zona de inibição H/C (mm) contra *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E.coli* e *E. faecalis* por lactobacilli

Patógeno	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	54	2,194	1,239	0,169	2,550	0,000	4,175
<i>Streptococcus agalactiae</i>	52	1,531	1,167	0,162	2,000	0,000	3,176
<i>Escherichia coli</i>	54	2,340	1,174	0,160	2,610	0,000	3,774
<i>Enterococcus faecalis</i>	51	2,153	1,075	0,151	2,400	0,000	3,833
Total	211	2,058	1,199	0,083	2,390	0,000	4,175

Tabela 5 – Capacidade antimicrobiana medida em zona de inibição H/C (mm) contra *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E.coli* e *E. faecalis* por enterococci

Patógeno	N	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	56	2,012	0,477	0,064	2,100	0,000	2,746
<i>Streptococcus agalactiae</i>	56	2,430	0,516	0,069	2,500	0,381	3,484
<i>Escherichia coli</i>	56	2,171	0,712	0,095	2,230	0,000	3,786
<i>Enterococcus faecalis</i>	56	1,514	0,698	0,093	1,730	0,000	2,500
Total	224	2,032	0,692	0,046	2,160	0,000	3,786

Tabela 6 – Capacidade antimicrobiana medida em zona de inibição H/C (mm) contra *S. agalactiae*, *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis* por enterococci e lactobacilli de acordo com cada patógeno testado.

Patógeno	Bactéria Láctica	
	Lactobacilli	Enterococci
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,000 ^{Aa}	2,500 ^{Ba}
<i>Escherichia coli</i>	2,610 ^{Ab}	2,230 ^{Bb}
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,550 ^{Ab}	2,100 ^{Bc}
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,400 ^{Ab}	1,730 ^{Bd}

Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste da Mediana e Teste de Mann-Whitney a 5% de significância

Teste da Mediana e Teste de Mann Whitney.

As linhagens de lactobacilli apresentaram atividade antagonista significativa contra os patógenos *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*. Porém, somente as linhagens de enterococci apresentaram atividade antagonista significativa contra *S. agalactiae* (Tabela 4).

3.3 VERIFICAÇÃO DA NATUREZA PROTEICA DA(S) SUBSTÂNCIA(S) INIBITÓRIA(S)

Todas as linhagens investigadas no presente estudo, independentemente de sua capacidade inibitória, foram avaliadas quanto à possível natureza proteica da substância inibitória, utilizando as enzimas amilase, pepsina e proteinase K. As linhagens foram testadas contra os patógenos *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. coli* e *E. faecalis*. Contudo, a meia lua indicando resultado positivo e possível presença de uma substância proteica por digestão das enzimas, se apresentou em 5 linhagens contra o patógeno *E. faecalis* e com sensibilidade a pepsina e proteinase K, sugerindo ação inibitória por bacteriocina, conforme apresentado na figura 3.

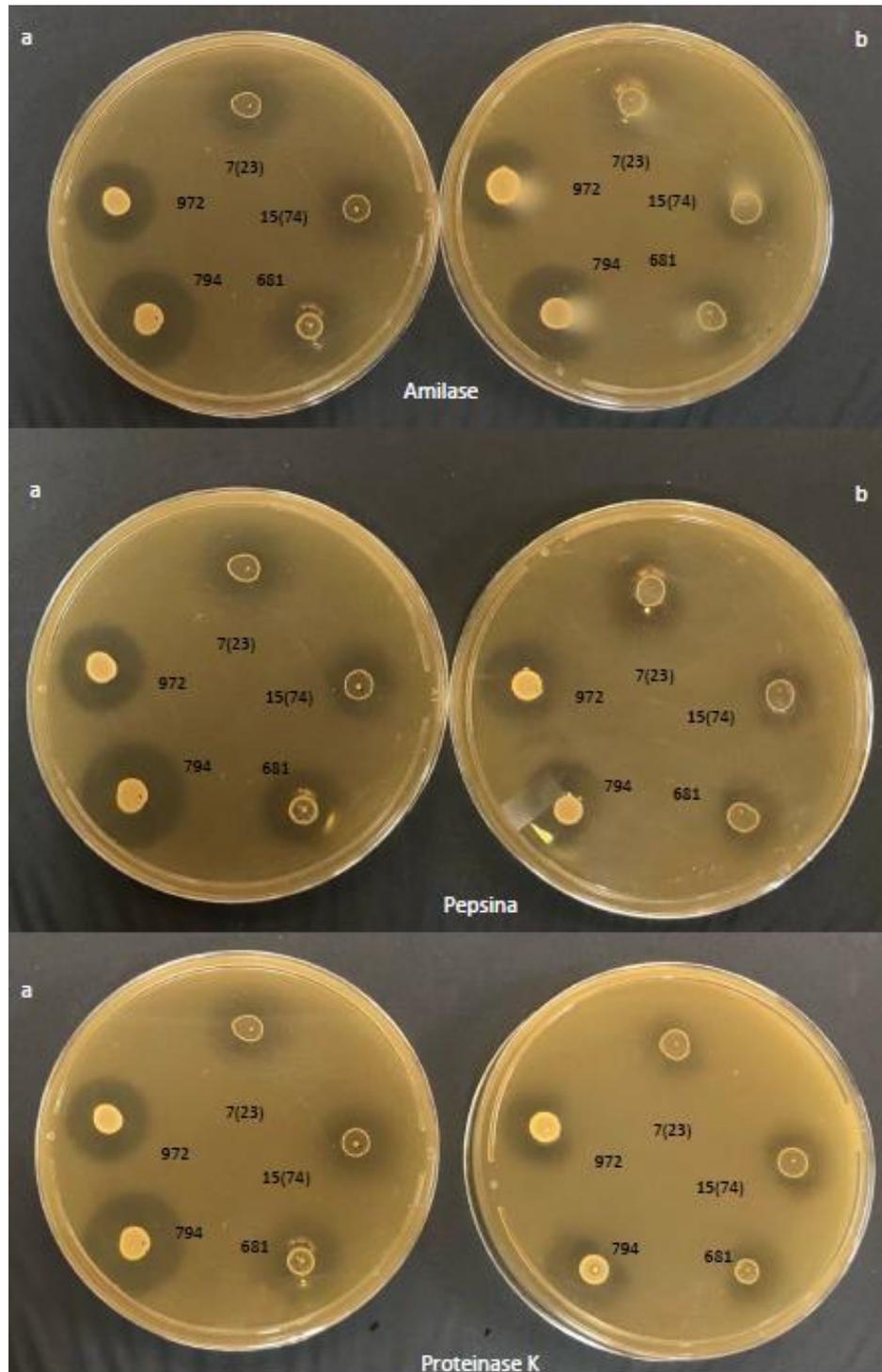


Figura 3 - Sensibilidade à amilase, pepsina e proteinase K dos compostos antagonistas produzidos pelos isolados 972, 794, 681, 7(23) e 15(74). a) Zona de inibição ao redor da colônia bacteriana. b) Alterações na zona de inibição após aplicação de amilase, pepsina e proteinase K. *E. faecalis* foi utilizado como microrganismo indicador no método spot-on-lawn. A figura é representativa de três placas replicadas.

Conforme a Tabela 7, foram encontradas 5 linhagens potencialmente produtoras de bacteriocinas, dentre elas 2 *L. plantarum*, 1 *E. faecalis* e 2 *E. faecium*, que apresentaram substância inibitória sensível às três das enzimas proteolíticas testadas.

Tabela 7 – Relação halo/colônia da atividade antagonista produzidos por *Lactiplantibacillus plantarum* (972), *Lactiplantibacillus plantarum* (794), *E. faecalis* (681), *E. faecium* (7(23) e *E. faecium* (15(74) frente aos patógenos *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. coli* e *E. Faecalis* e sensibilidade das substâncias inibitórias produzidas por *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. faecium*, frente a enzimas proteolíticas contra o patógeno *E. faecalis*.

	Origem	Halo de Inibição (H/C) mm				Amilase				Proteinase K				Pepsina				
		S. aureus	S. agalactiae	E. coli	E. faecalis	S. aureus	S. agalactiae	E. coli	E. faecalis	S. aureus	S. agalactiae	E. coli	E. faecalis	S. aureus	S. agalactiae	E. coli	E. faecalis	
L. plantarum	97	Queijo	2,1															
	2	artesanal	4	0	2,13	2,5	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
L. plantarum	79	Queijo																
	4	artesanal	2	1,82	2,38	3,51	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
E. faecalis	68	Queijo	2,0															
	1	artesanal	4	2,25	1,95	2,03	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
E. faecium	7(
	23) Leite cru	1,6															
E. faecium	15																	
	(7) Leite cru	2,1															
	4)		9	2,9	2,76	2,14	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

3.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Todas as linhagens identificadas como enterococci e lactobacilli, consideradas geneticamente não redundantes, foram avaliadas quanto à resistência aos antibióticos penicilina G, ampicilina, vancomicina, gentamicina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e clotrimoxazol. Quarenta e cinco linhagens de lactobacilli se apresentaram resistentes à vancomicina, com isso apenas três linhagens de lactobacilli, dentre elas um *Lacticaseibacillus paracasei*, um *Lactiplantibacillus pentosus* e um *Lactiplantibacillus plantarum* se apresentaram sensíveis à vancomicina, tornando-o o antimicrobiano com maior índice de resistência dentre os lactobacilli. Dez linhagens de *L. rhamnosus* se apresentam como resistentes ao antimicrobiano clotrimoxazol. Entre os enterococci, dentre eles *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*, o maior índice de resistência foi ao antimicrobiano eritromicina, com 27 linhagens resistentes, seguido por 17 linhagens de *E. faecium* resistentes a penicilina G. O menor índice de resistência dentre as linhagens de *Enterococcus* sp. foi para o antimicrobiano vancomicina, onde apenas uma linhagem de *E. faecium* e duas linhagens de *E. faecalis* se mostraram resistentes, assim como demonstrado no Gráfico 1.

Figura A

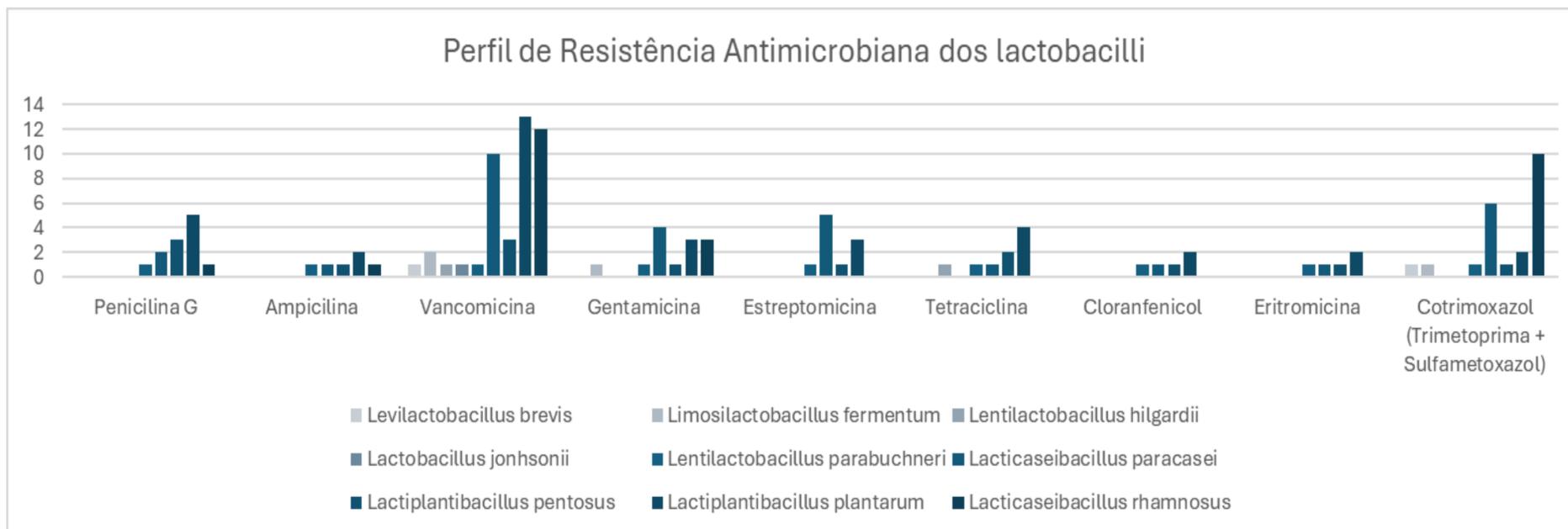


Figura B

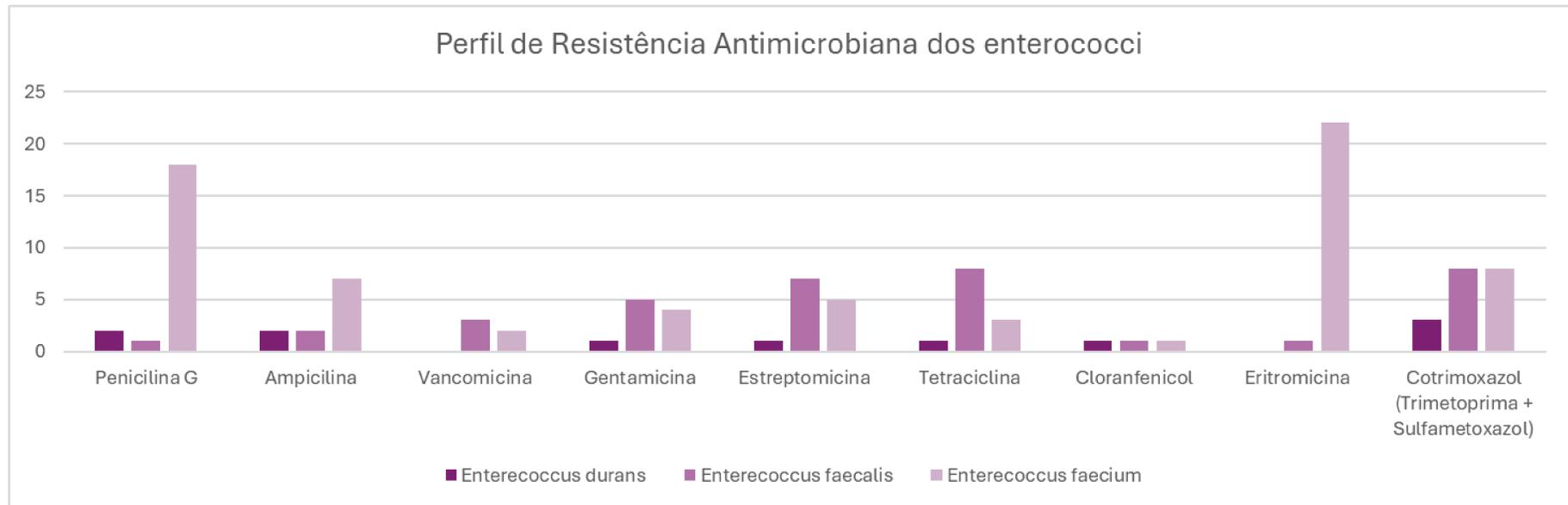


Gráfico 1 –Perfil de resistência antimicrobiana dos lactobacilli (Figura A) e dos enterococci (Figura B) frente aos antimicrobianos testados, onde cada cor representa uma espécie diferente. Distribuição do perfil de resistência antimicrobiana dos lactobacilli (A) e dos enterococci (B) aos antimicrobianos: Penicilina G, Ampicilina, Vancomicina, Gentamicina, Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Eritromicina e Clotrimoxazol.

Neste estudo todas as linhagens de *Enterococcus* sp. e lactobacilli se mostram sensíveis a pelo menos dois dos antibióticos testados. As linhagens que demonstraram menos sensibilidade foram as que se apresentaram sensíveis a 4 antimicrobianos e resistentes a 5.

4. DISCUSSÃO

. A busca por cepas selvagens de bactérias lácticas tem sido crescente, visando a obtenção de linhagens adaptadas às condições de produção de derivados do leite, como altas temperaturas e valores baixos de pH. Produtos lácteos derivados de leite cru apresentam-se como uma fonte abundante de bactérias lácticas com grande diversidade genética e potencial funcional e biotecnológico elevado, incluindo a fabricação de queijos com denominação de origem controlada (Margalho et al., 2020). Neste estudo, foi constituída uma coleção de lactobacilli e enterococci, originalmente provenientes de leite cru, queijo coalho, queijo artesanal e massa de queijo. Essa coleção foi identificada a nível de gênero e servirá como um banco de recursos genéticos para aplicações tecnológicas futuras na cadeia produtiva do leite. A similaridade molecular entre os lactobacilli e enterococci selvagens foi avaliada por meio de Rep-PCR, enquanto seu potencial tecnológico e de biocontrole para utilização posterior na produção de leite foi investigado. Amostras de cinco estados e trinta e uma cidades brasileiras foram incluídas na análise

O emprego de ferramentas moleculares para a diferenciação de bactérias lácticas em níveis de gênero, espécie e cepa intraespecífica tornou-se comum e é essencial para estudos precisos e confiáveis da diversidade genética da microbiota de produtos fermentados. A técnica de Rep-PCR utilizando o primer GTG5 tem sido eficaz para distinguir cepas intraespecíficas, proporcionando perfis genéticos e comparações de similaridade genética de maneira rápida e com custo relativamente baixo (Vasiee et al., 2018; Kuar et al., 2017). A análise de agrupamento revelou que as 98 cepas de lactobacilli e enterococci estudadas estão divididas em 11 clusters, com um índice de similaridade de 45%, destacando a considerável diversidade genotípica dessa população bacteriana.

A espectrometria de massa MALDI-TOF demonstrou êxito na identificação de diversas espécies bacterianas, proporcionando perfis proteômicos únicos, semelhantes a impressões digitais. A análise comparativa desses perfis com uma biblioteca de espectros de referência permitiu a identificação confiável de gêneros e espécies (Nacef et al., 2017). Todos os isolados positivos na PCR gênero-específica para lactobacilli e enterococci foram corroborados como pertencentes aos gêneros

lactobacilli e enterococci, respectivamente, por MALDI-TOF. As amostras foram identificadas a nível de gênero com 100% de correlação, incluindo espécies como *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. hilgardii*, *L. parabuchneri* e *L. brevis*. A diversidade genotípica encontrada pode ser influenciada por condições ambientais específicas de cada local, bem como pelo tempo de maturação dos queijos e condições de armazenamento.

Neste estudo avaliamos o potencial bioprotetor de 98 isolados geneticamente distintos dos gêneros enterococci e lactobacilli. A diversidade genética da microbiota benéfica presente nos produtos lácteos é fundamental para garantir a estabilidade do processo de fermentação e qualidade final do produto. A seleção e combinação adequadas das cepas pode influenciar diretamente características como sabor, textura, aroma e segurança do queijo (Mariano, 2020).

Para a utilização destas linhagens bacterianas como bioprotetoras, é necessário que possuam um histórico de inocuidade, ausência de registros de eventos adversos relevantes, ausência de fatores de virulência e patogenicidade, ausência de produção de substâncias ou metabólitos que representem risco à saúde, ausência de genes de resistência que possam ser potencialmente transferidos e susceptibilidade a, pelo menos dois antimicrobianos (ANVISA, 2018).

Os enterococci e os lactobacilli possuem a capacidade de inibir patógenos por diversos mecanismos. Algumas das formas que eles podem exercer inibição sobre patógenos incluem: produção de ácido láctico; produção de substâncias antimicrobianas; competição por nutrientes; modulação do ambiente intestinal; estímulo ao sistema imunológico; impedimento da adesão.

A síntese de ácido láctico pelos lactobacilli pode gerar efeitos que podem variar entre inibir o crescimento (bacteriostático) ou até mesmo eliminar (bactericida) bactérias sensíveis ao pH mais ácido como os patógenos, por exemplo. O ambiente ácido criado pelo ácido láctico pode afetar a produção de toxinas por bactérias patogênicas, como discutido por GRAJEK et al.(2005). Estudos anteriores que também investigaram a ação inibitória dos lactobacilli isolados de queijos artesanais corroboram essa ideia, sugerindo que o ácido láctico produzido por essas bactérias pode estar associado à capacidade de inibir patógenos, conforme destacado por

COSTA et al., (2013) e por SANT'ANNA (2015). Como foi observado com os resultados deste estudo *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. hilgardii* e *L. parabuchneri*, foram os que apresentaram maior capacidade inibitória contra os patógenos, podendo ser considerado que essa inibição pode ser ocasionada pela produção de ácido, uma vez que não se mostraram potencialmente produtoras de bacteriocinas. A produção de ácido, contudo, pode não ser de tudo benéfica, uma vez que pode influenciar negativamente no processo produtivo de alguns alimentos.

Assim como os resultados encontrados em outros estudos, este trabalho também encontrou linhagens de lactobacilli capazes de inibir o crescimento dos patógenos *E. coli*, *E. faecalis* e *S. aureus* (Mariano 2020; Assis 2016; Verma et al., 2011; Kang et al., 2017; Sikirska & Smoragiewicz 2013; Jiang et al., 2022; Wu et al., 2021; Chioda et al., 2007; Kumar et al., 2016; Pereira & Gómez 2007; Costa et al., 2012; Alves 2010; Alexandre 2002; Camacho et al., 2021; Andrade et al., 2014; Silva et al., 2019; Saba et al., 2021). No presente estudo, 79,16% dos lactobacilli (N=38) apresentaram capacidade antagonista, com formação de halos contra os patógenos *S. aureus*; 64,58% dos lactobacilli (N=31) apresentaram capacidade antagonista com formação de halos contra os patógenos *S. agalactiae* e 81,25% dos lactobacilli (N=39) apresentaram capacidade antagonista com formação de halos contra os patógenos *E. coli*; 93,75% dos lactobacilli (N=45) apresentaram capacidade antagonista com formação de halos contra os patógenos *E. faecalis*. Este resultado indica que os lactobacilli são capazes de inibir o crescimento de patógenos, contudo, estudos adicionais são necessários para que possam ser considerados como potenciais microrganismos de bioproteção na cadeia produtiva do leite. Essa bioproteção não necessariamente virá por meio de produção de bacteriocina, uma vez que apenas duas cepas de *L. plantarum* apresentaram resultado positivo para a produção de um composto proteico e apenas contra o patógeno *E. faecalis*, sendo considerado que mecanismo de inibição de patógenos por estas linhagens advém de uma forma ainda não elucidada.

Trabalhos publicados por Souza et al., (2015), Viçosa et al., (2019) e Karimaei et al., (2016) encontraram cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* capazes de inibir *E. coli* e *S. aureus*. No presente trabalho, 98% dos enterococci (N=49) foram capazes de

inibir *S. aureus*, 94% dos enterococci (N=47) inibir *E. coli* e 74% dos enterococci (N=37) foram capazes de inibir *E. faecalis* com baixa capacidade inibitória, contudo 100% dos enterococci (N=50) foram capazes de inibir *S. agalactiae* com 35% deles sendo considerados com alta capacidade inibitória. Estes resultados demonstram que enterococci possuem a capacidade de inibir patógenos e podem ser utilizados como potenciais bioprotetores, contudo vale ressaltar que testes de segurança devem ser feitos para garantir que eles não trarão malefícios quando utilizados. Trabalhos utilizando enterococci como potenciais microrganismos benéficos são escassos, devido ao seu histórico de virulência e resistência a antimicrobianos (Viçosa et al., 2019).

Não foram encontradas pesquisas que evidenciem a capacidade antagonista dos enterococos em relação ao patógeno *S. agalactiae*. Portanto, este estudo está inovando ao investigar pela primeira vez essa interação antagonista. Este cenário representa um avanço crucial na compreensão da dinâmica entre esses dois gêneros bacterianos, o que pode ter implicações significativas no potencial uso dos enterococos como uma alternativa viável aos antimicrobianos no manejo clínico da mastite bovina.

Como dito anteriormente as bacteriocinas produzidas pelos enterococci e lactobacilli, também podem contribuir para essa atividade inibitória. A literatura apresenta estudos nos quais essas substâncias demonstraram ação antagonista contra micro-organismos específicos, como *E. coli*, *E. faecalis* e *S. aureus*. Tais efeitos foram observados em testes de antagonismo, como o método "*spot on the lawn*", conforme discutido por Jamuna et al. (2005), GARCIA (2006), TODOROV e DICKS (2007), e TODOROV (2009).

No presente estudo foram identificadas duas linhagens de *L. plantarum* produtoras de bacteriocina (substâncias inibitórias de natureza proteica) contra *E. faecalis*. Por ser produzida por *L. plantarum*, pode-se sugerir que esta bacteriocina provavelmente é uma plantaricina. As plantaricinas se encontram entre a bacteriocinas mais estudadas e são conhecidas por suas propriedades antimicrobianas e potencial aplicação na indústria de alimentos como bioconservantes. Elas exibem atividade inibitória contra uma ampla variedade de bactérias gram-positivas, incluindo algumas cepas patogênicas como o *S. aureus*

(LOPES, 2010). Para que seja taxonomicamente comprovado que essa substância inibitória é uma plantaricina, isolamento e caracterização da própria substância inibitória são necessários.

Também foram identificadas 2 linhagens de *E. faecium* e 1 de *E. faecalis* produtoras de uma substância inibitória de natureza proteica, podendo ser inferido que se trata de uma bacteriocina, provavelmente enterocina. As enterocinas compreendem um grupo diversificado de bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de *Enterococcus spp.* podendo variar em tamanho, estrutura e modo de ação. As enterocinas exibem atividade antimicrobiana seletiva, inibindo o crescimento de bactérias Gram positivas relacionadas e, em alguns casos até mesmo bactérias Gram negativas. Sua atividade antimicrobiana é amplamente baseada em mecanismos como a perturbação da membrana celular das bactérias alvo. Contudo, apesar de a maioria das bactérias lácticas (BAL) possuir o status GRAS (Generally Recognized as Safe) e poder ser empregada com segurança em alimentos, existe uma preocupação em relação ao uso das bacteriocinas produzidas por *Enterococcus*. Isso se deve ao fato de que esses microrganismos têm sido associados a diversas infecções em seres humanos (Silva et al., 2018).

Os resultados encontrados nos testes de antibiograma apresentados neste trabalho são condizentes com os achados por Goldstein et al., 2015. Os autores observaram que a maioria das espécies de lactobacilli são intrinsicamente resistentes aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos e à Vancomicina. São vários os genes responsáveis pela resistência aos antimicrobianos nas BAL. Gueimonde et al., 2013 relataram que apesar de muitas vezes lactobacilli serem sensíveis aos antimicrobianos da classe dos macrolídeos, mutações cromossômicas no gênero podem reduzir a afinidade da eritromicina ao ribossomo, tornando-os resistentes. Outra informação importante é que considerando que lactobacilli são geralmente sensíveis às penicilinas, cinco espécies identificadas neste estudo se mostram resistentes, sendo elas *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. pentosus* e *L. rhamnosus*.

Os enterococci são notórios por sua resistência intrínseca a antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e aos β -lactâmicos. O alto percentual de resistência das linhagens à Gentamicina e à Estreptomicina é particularmente relevante devido

ao uso desses antibióticos no tratamento de infecções causadas por enterococci. A MIC da gentamicina para os enterococci varia de 6 a 64 µg/mL e dos β-lactâmicos varia de 1 a 16 µg/mL (Arias et al., 2010; Mathur et al., 2005; Conde-Esteévez et al., 2011; Gama et al., 2008). A resistência a outras classes de antibióticos, incluindo eritromicina e tetraciclina, entre enterococci obtidos de alimentos de origem animal, foi previamente descrita como uma característica comum (Hammad et al., 2015; Jamet et al., 2012; Koluman et al., 2009; Nieto-arribas et al., 2011). Já foram caracterizados e relatados nove tipos de resistência aos glicopeptídeos (vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanI, vanM e vanN) (Yilmaz et al., 2016). Essa resistência é caracterizada pela ausência de zona de crescimento ao redor dos discos impregnados com os antimicrobianos, o que a torna uma preocupação significativa em contextos clínicos, uma vez que os enterococci podem transferir esses genes de resistência para outros microrganismos (CLSI, 2012). Vinte e três linhagens de *Enterococcus* spp. (44,23%) utilizados neste estudo apresentaram resistência à eritromicina, sendo vinte e dois (95,65%) pertencente à espécie *E. faecium*, concordando com os achados de Hammad et al., (2015), Jamet et al., (2012), Koluman et al., (2009) e Nieto-arribas et al., (2011). No presente estudo, oito cepas de *E. faecalis* (47,05%) se mostraram resistentes à tetraciclina, enquanto três *E. durans* (75%) foram resistentes ao cotrimoxazol. Dezesete cepas de *E. faecium*, duas de *E. durans* e uma de *E. faecalis* se mostraram resistentes à penicilina, enquanto sete *E. faecium*, dois *E. durans* e dois *E. faecalis* se apresentaram resistentes à ampicilina, assim como relatado por Arias et al., (2010).

Os dados de susceptibilidade aos antimicrobianos do presente estudo permitem inferir que, por este parâmetro, todas as espécies avaliadas podem ser consideradas para futuros estudos e potencialmente serem usadas como probióticos, pois se enquadram em um dos requisitos da RDC nº 241/2018, de 26 de julho de 2018 da ANVISA, não sendo resistentes a todos os antimicrobianos se apresentando sensíveis a pelo menos quatro.

5. CONCLUSÃO

As espécies de maior ocorrência na população (n=98) usada no presente estudo foram *E. faecium* (31,63%) e *L. plantarum* (14,28%). Linhagens de lactobacilli isolados de leite cru, massa de queijo e queijo artesanal se mostraram capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*, enquanto os enterococci se mostraram mais capazes de inibir *S. agalactiae*. Cinco cepas (5,10%) de *L. plantarum* (N=2), *E. faecalis* (N=1) e *E. faecium* (N=2) apresentaram produção de substância inibitória de natureza proteica contra o patógeno *E. faecalis*, sendo possíveis produtoras de bacteriocinas. Quarenta e cinco linhagens de lactobacilli se apresentaram resistentes à vancomicina, enquanto 27 linhagens de enterococci apresentaram resistência a eritromicina, sendo esses os dois antimicrobianos com maior índice de resistência dentre as cepas contidas no presente trabalho. O resultado positivo para a produção de substância inibitória de natureza proteica em cinco das linhagens estudadas, aliado à sua suscetibilidade fenotípica a pelo menos cinco dos antimicrobianos testados, reitera a importância do presente estudo. Essas constatações evidenciam que tais linhagens têm o potencial de serem empregadas como agentes bioprotetores na cadeia produtiva do leite. Contudo, mais estudos devem ser conduzidos com esses microrganismos para que seja confirmado seu mecanismo de inibição e sua inocuidade.

6. REFERÊNCIAS

1. ALBÁN CAMACHO, EMILY GREIDY, and ANGIE ESTEFFANY OLIVARES SABA. "Efecto in vitro de cuatro cepas probióticas contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212." (2021).
2. ALEXANDRE, D. P. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 424-428, 2002.
3. ALMEIDA, R. A. et al. Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 35, p. 89–101, 2011.
4. ALMEIDA, Renata C. de. **Caracterização bioquímica e genética de bactérias lácticas isoladas de queijo serrano**. Tese de Doutorado – Universidade de Caxias do Sul, 2014.
5. ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 5, p. 403–410, 1990.
6. ALVAREZ-SIEIRO, Patricia et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 2939-2951, 2016.
7. Alves, C. D. C. (2010). Comportamento da *Escherichia coli* em queijo minas Frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta com ácido láctico. Master's Dissertation, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.
8. AMMOR, M. S. et al. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 6–15, 2008.
9. AMMOR, M. S. et al. Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried tet(L) and chromosomally located transposon-associated tet(M), coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1394–1401, 2008.

10. AMMOR, M. S.; FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 24, p. 559-570, 2007.
11. AMORIM, A. L. B. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 73, nº 4, p. 364-367, 2014.
12. ANDRADE, Camila Rodrigues Gontijo de et al. Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus spp.* isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1592-1600, 2014.
13. ANISIMOVA, E.; YARULLINA, D. Characterization of erythromycin and tetracycline resistance in *Lactobacillus fermentum* strains. **International Journal of Microbiology**, 2018.
14. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resistência antimicrobiana é ameaça global, dia OMS. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global-diz-oms>>. Acessado em 04/12/2021.
15. APOLINÁRIO, T. C. C.; DOS SANTOS, G. S.; & LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, nº 6, p. 433-442, 2014.
16. ARIAS, C. A.; CONTRERAS, G. A.; MURRAY, B. E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, p. 555-562, 2010.
17. BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 1-10, 2000.
18. BARROS, D. M.; MACHADO, E. D. C. L.; DE MOURA, D. F.; DA FONTE, R. A. B.; DE OLIVEIRA FERREIRA, S. A.; DE SOUZA BEZERRA, R. Aspectos do queijo de coalho com ênfase na importância das Boas Práticas de Fabricação no sistema de produção. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, nº 1, p. 67-93, 2019.

19. BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 45 (4), p. 493-96, 1966.
20. BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.
21. BERNADEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 278–285, 2008.
22. BEZERRA, D. E. L.; GOMES, D.; JUNIOR, E. Avaliação microbiológica de queijo de coalho comercializado na feira livre de Sousa - Paraíba. **Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, v. 37, 2017.
23. BOAS, A. F. V.; BELPIEDE, E. L. S.; SILVA, N. R. F. da; SILVA, M. F. da; VEIGA, S. M. O. M. Qualidade microbiológica de queijos minas Frescal artesanais e industrializados. **Braz. J. of Develop.** Curitiba, v. 6 (10), p. 83536-83552, out. 2020.
24. BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria No 146, 7 de março de 1996. <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis_consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>. Acessado em 21/12/2021.
25. BRITO, L. P. D. Estudo do potencial tecnológico e molecular de bactérias ácido lácticas de queijos de coalho artesanais do sertão nordestino. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2021.
26. BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G.; CARVALHO, AK. F.; ANDRADE, A. P. C.; QUEIROZ, A. A. M. Caracterização de microbiota láctica isolada de queijos de Coalho comercializados no Rio Grande do Norte. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 15., 2007, Fortaleza. Anais... Fortaleza: VC Eventos, 2007. 1 CD-ROM
27. BRUNO, L. M.; MARCÓ, M. B.; CAPRA, M. L.; CARVALHO, J. D. G.; MEINARDI, C.; QUIBERONI, A. Wild *Lactobacillus* strains: Technological characterisation and design of Coalho cheese lactic culture. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 1-11, 2017.

- 28.CAO, L. T.; WU, J. Q.; XIE, F.; HU, S.; MO, Y. Eficácia da nisina em tratamento da mastite clínica em vacas leiteiras em lactação. **J. Dairy Sci.**, v. 90, p. 3980–3985, 2007.
- 29.CARMEN, S. del; LEBLANC, A. de M. de; LEVIT, R.; AZEVEDO, V.; LANGELLA, P.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; LEBLANC, J. G. Anti-cancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model. **International Immunopharmacology**, nov. 2016.
- 30.CARNEIRO, J. O. et al. Artisan minas cheese of Serro: Proteolysis during ripening. **Heliyon**, v. 6, p. e04446, 2020.
- 31.CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 221-224, 2005.
- 32.CASTRO, R. D. et al. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6086–6096, 2016.
- 33.CAVALCANTE, J. F. M. Queijo Coalho artesanal do Nordeste do Brasil, 2017.
- 34.CAVICCHIOLI, V. Q. et al. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 2526–2535, 2017.
- 35.CHARTERIS, William P. et al. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 12, p. 2007-2014, 2001.
- 36.CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.**, v. 2, p. 81-100, 2003.
- 37.Chioda, T. P., Schocken-Iturrino, R. P., Garcia, G. R., Pigatto, C. P., Ribeiro, C. A. M., & Ragazzani, A. V. F. (2007). Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo " Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, 37, 583-585.
- 38.CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second

- informational supplement. CLSI document, M100-S22, 32, 3. Retrieved September 25, 2023, from <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>, 2012.
39. CONDE-ESTÉVEZ, D. et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* bacteraemia in cancer patients. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 30, n. 1, p. 103-108, 2011.
40. COSTA, Giselle Nobre et al. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “in vitro”. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1839-1846, 2012.
41. COUSIN, F. J.; GUELLEC, R. L.; CHUAT, V.; DALMASSO, M.; LAPLACE, J. M.; CRETENET, M. Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 17–24, 2019.
42. DA SILVA, J. G. Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus spp.* Isolados de queijo minas artesanal de Araxá, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2016.
43. DE ALMEIDA, Jaqueline Milagres et al. Ação antimicrobiana de *Lactobacillus spp.* frente a patógenos Gram-positivos de origem alimentar. In: **1º Congresso de Segurança e Qualidade dos Alimentos**, 2022.
44. DE ASSIS, Bianca Seridan. Identificação de bactérias lácticas isoladas do ecossistema mamário bovino e caracterização de seu potencial inibidor contra patógenos associados à mastite. 2015. Tese de Doutorado. Agrocampus Ovest.
45. DE MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of **Listeria monocytogenes** in pork product by *Lactobacillus sake* strain. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 42, p. 119-126, 1998.
46. DE SOUZA CARNEIRO, C. et al. Antagonistic activity, antimicrobial susceptibility and potential virulence factors of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Life Sciences**, v. 9, p. 318-326, 2015.
47. DEASY, B. M.; REA, M. C.; FITZGERALD, G. F.; COGAN, T. M.; BERESFORD, T. P. A Rapid peR Based Method to Distinguish between

- Lactococcus* and *Enterococcus*. **System. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 510-522, 2000.
- 48.DEVIRGILIIS, C. et al. Characterization of the Tn916 conjugative transposon in a foodborne strain of *Lactobacillus paracasei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 3866–3871, 2009.
- 49.DIAS, M. A. C.; SANT'ANA, A. S.; CRUZ, A. G.; JOSÉ DE ASSIS, F. F.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; BONA, E. On the implementation of good manufacturing practices in a small processing unity of mozzarella cheese in Brazil. **Food control**, v. 24, nº 1-2, p. 199-205, 2012.
- 50.DIEPERS, Ann-Christin et al. In vitro ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 5, p. 84-92, 2017.
- 51.DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 25, p. 392–399, 2008.
- 52.DOMINGOS-LOPES, M. F. P. et al. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 178–190, 2017.
- 53.Dos Santos KMO, Vieira ADS, Salles HO, Oliveira JS, Rocha CRC, Borges MF, Bruno LM, Franco BDGM, Todorov SD (2015) Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. **Braz J Microbiol** 46(1):237–249.
- 54.DUAR, R. M. et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. S27-S48, 2017.
- 55.DUBERNET, S.; DESMASURES, N.; GUÉGUEN, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 271-275, Jul. 2002.
- 56.EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1628–1635, 2001.
- 57.EGERVÄRN, M.; ROOS, S.; LINDMARK, H. Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1658-1668, 2009.

- 58.ENDO, A.; OKANA, S. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2195–2205, 2008.
- 59.FAO, GDP and IFCN. **Dairy's Impact on Reducing Global Hungry**. Chicago, Illinois, USA, 2020.
- 60.FAO/WHO. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, p. 1–11, 2002.
- 61.FERCHICHI, M. et al. *Enterococcus spp.*: Is It a Bad Choice for a Good Use—A Conundrum to Solve? **Microorganisms**, v. 9, n. 10, 2021.
- 62.FERREIRA, A. E. Estudo de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus*. 2005.
- 63.FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; Effect of segregation on prevenção de infecções intramamárias por *Staphylococcus aureus*. **J. Dairy Sci.**, v. 72 (2), p. 540-544, 1989.
- 64.FOX, L. K.; SHOOK, G. E.; TENHAGEN, B. A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; et al. Prevalência de patógenos da mastite e sua resistência contra agentes antimicrobianos em vacas leiteiras em Brandenburg, Alemanha. **J. Dairy Sci.**, v. 89(7), p. 2542-2551, 2006.
- 65.FRANZ, C. M. et al. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 105–122, 2003.
- 66.FRAZZON, A. P. G.; GAMA, B. A.; HERMES, V.; BIERHALS, C. G.; PEREIRA, R. I.; GUEDES, A. G.; D'AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus spp.* isolated from food in Southern Brazil, v. 26, p. 365–370, 2010.
- 67.FUKAO, M. et al. Assessment of antibiotic resistance in probiotic strain *Lactobacillus brevis* KB290. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 9, p. 1923–1929, 2009.
- 68.GAMA, B. A. Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus spp.* 2008.

69. GARCIA PEREIRA, Valéria; JORGE HERNAN CASTRO GÓMEZ, Raul. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against foodborne pathogens. **Semina Ci. agr.**, p. 229-240, 2007.
70. GARCIA-GUTIERREZ, E.; MAYER M. J.; COTTER P. D.; NARBAD, A. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. **Gut Microbes**, v. 10(1), p. 1-21, 2019.
71. GARDINER, G.; ROSS, R. P.; COLLINS, J. K. et al. Development of a probiotic cheddar cheese *Lactobacillus paracasei* strains containing human-derived *Lactobacillus*. **Appl. Env. Microb.**, v. 64 (6), p. 2192-2099, 1998.
72. GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 31-36, 2001.
73. GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 732–738, 1997.
74. GOLD, H. S.; MOELLERING Jr., R. C. Antimicrobial-drug resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 335, p. 1445–1453, 1996.
75. Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, 60(suppl_2), S98-S107.
76. GOPAL, P. K. Bacteria, Beneficial: Probiotic Lactic Acid Bacteria: An Overview, 3rd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2021; Volume 4, ISBN 9780128187661.
77. GRANDE BURGOS, M. J. et al. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22706-22727, 2014.
78. GRANDE BURGOS, M. J. et al. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22706-22727, 2014.
79. GUEIMONDE, M. et al. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 202, 2013.
80. GUEIMONDE, Miguel et al. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 202, 2013.

81. GUIMARÃES, J. L. B.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; SILVA, M. R.; RIBEIRO, J. B.; MENDONÇA, L. C.; et al. Estimativa do impacto econômico da mastite: um estudo de caso em um rebanho leiteiro da raça Holandesa em condições tropicais. **Ant. Veterinario. Med.**, 2007.
82. HAMMAD, A. M.; HASSAN, H. A.; SHIMAMOTO, T. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. **Food Control**, v. 50, p. 815-820, 2015.
83. HESSELBARTH, J.; SCHWARZ, S. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 11-17, 1995.
84. HUANG, E. et al. Characterization and application of enterocin RM6, a bacteriocin from *Enterococcus faecalis*. **BioMed Research International**, 2013.
85. HUMMEL, A. S. et al. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 730-739, 2007.
86. HÜTT, P.; SHCHEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K.; KULLISAAR, T. MIKELSAAR, M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1324-1332. 2006.
87. ILINSKAYA, O. N. et al. Secretome of intestinal bacilli: a natural guard against pathologies. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1666, 2017.
88. JAMET, E. et al. Prevalence and characterization of antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food Microbiology**, v. 31, p. 191-198, 2012.
89. JAY, James Monroe. **Modern Food Microbiology**. 7. ed. New York: Springer, p. 39-790. 2005.
90. JIANG, Yu-Hang et al. A novel bacteriocin against *Staphylococcus aureus* from *Lactobacillus paracasei* isolated from Yunnan traditional fermented yogurt: Purification, antibacterial characterization, and antibiofilm activity. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 3, p. 2094-2107, 2022.
91. KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, p. 40–49, 2019.

- 92.KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, p. 40–49, 2019.
- 93.KANG, Mi-Sun et al. Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 2, p. ftx009, 2017.
- 94.KARIMAEI, S. et al. Antibacterial potential and genetic profile of *Enterococcus faecium* strains isolated from human normal flora. **Microbial Pathogenesis**, v. 96, p. 67-71, 2016.
- 95.KATLA, A. K. et al. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 147-152, 2001.
- 96.KLEIN; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 41 (2), p. 103 – 125, 1998.
- 97.KOLUMAN, A.; AKAN, L. S.; ÇAKIROGLU, F. P. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. **Food Control**, v. 20, p. 281-283, 2009.
- 98.KORHONEN, J. M. et al. Antimicrobial susceptibility and proposed microbiological cut-off values of lactobacilli by phenotypic determination. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 3, p. 257–268, 2008.
- 99.KAUR, J., LEE, S., SHARMA, A., & Park, Y. S. (2017). Perfil de DNA de cepas de *Leuconostoc mesenteroides* isoladas de alimentos fermentados e produtos agrícolas na Coreia por PCR de elementos repetitivos. **Ciência de Alimentos e Biotecnologia**, 26(6), 1667–1673. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0189-9>
- 100.KUMAR, Manesh et al. Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 3, p. 265-270, 2016.
- 101.LAHTINEN, S. J. et al. Safety assessment of probiotics. In: Charalampopoulos, D.; Rastall, R. A. (Eds.). **Prebiotics and Probiotics Science and Technology**. Springer-Verlag, Berlin, 2009. p. 1193–1225.

102. LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G. C.; JUNQUEIRA, N. B.; MENOZZI, B. D.; JOAQUIM, S. F. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, Nov. 2017.
103. LEE, K. W.; PARK, J. Y.; SA H. D.; JEONG, J. H.; JIN D. E.; HEO, H. J.; KIM, J. H. Probiotic properties of *Pediococcus* strains isolated from jeotgals, salted and fermented Korean sea-food. **Anaerobe.**, v. 28, p. 199–206, 2014.
104. LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **J. Microbiol. Methods**, v. 13, p. 145-150, 1991.
105. LIMA, C. P. D.; BRUNO, L. M.; FIGUEIREDO, E. A. T. D.; QUIBERONI, A. D. L.; CARVALHO, J. D. G.; CARVALHO, A. K. F. D. Resistência de bactérias ácido-láticas a bacteriófagos provenientes de unidades de processamento de queijo Coalho. **Ciência Rural**, v. 42, nº 6, p. 1117-1122, 2012.
106. LJUNGH, A.; WADSTROM, T. Lactic acid bacteria as probiotics. **Curr. Issues. Int. Microb.**, v. 7, n.2, p. 73-89, 2006.
107. LONDOÑO, N. A. et al. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. **Alimentos Hoy**, v. 23, n. 36, p. 186-205, 2015.
108. LOPES, José Luiz de Souza. Plantaricina 149 e análogos: atividade antimicrobiana, estudos estruturais e mecanismos de ação. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
109. LUIZ, P.; MARIA, L. Caracterização da biodiversidade de bactérias mesófilas autóctones de fazendas da região do Campo das Vertentes no Estado de Minas Gerais. 2012.
110. MACHADO, T. F. Potencial uso de bacteriocinas na conservação de alimentos. 2023.
111. MANZOOR, A.; TAYYEB, A. Functional probiotic attributes and gene encoding plantaricin among variant *Lactobacillus plantarum* strains. **Microbial Pathogenesis**. Março de 2019.
112. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico Geral para a Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijo. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Diário Oficial da União de 11 de março de 1996.

- 113.MARCINEK, H. et al. *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 626–632, 1998.
- 114.MARGALHO, L. P. et al. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties — Insights through multivariate analysis. **The Lancet**, 2020.
- 115.MARGALHO, L. P. et al. *Enterococcus spp.* in Brazilian artisanal cheeses: Occurrence and assessment of phenotypic and safety properties of a large set of strains through the use of high throughput tools combined with multivariate statistics. **Food Control**, v. 118, p. 107425, 2020.
- 116.MARGALHO, L. P. et al. High throughput screening of technological and biopreservation traits of a large set of wild lactic acid bacteria from Brazilian artisanal cheeses. **Food Microbiology**, v. 100, p. 103872, 2021.
- 117.MARIANO, E. G. A. (2020). Antagonismo de *Lactobacillus rhamnosus* B7 e *Lactobacillus plantarum* A1 na viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI361 produtor de enterotoxina C em queijo tipo Minas frescal durante a estocagem.
- 118.MATHUR, Shalini; SINGH, Rameshwar. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. **International journal of food microbiology**, v. 105, n. 3, p. 281-295, 2005.
- 119.MAYRHOFER, S. et al. Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 81–87, 2010.
- 120.MAYRHOFER, S. et al. Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 81–87, 2010.
- 121.MELO, N. R. de; SOARES, N. de F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52(303), p. 921-938, 2005.
- 122.MENDONÇA, A. A. et al. First identification of Tn916-like element in industrial strains of *Lactobacillus vin* that spread the tet-M resistance gene. **FEMS Microbiology Letters**, 2016.

123. MOZZI, F. Lactic Acid Bacteria. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 501–508, 2015.
124. NACEF, M. et al. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 247, p. 2-8, 2017. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>>. Acesso em: 17 abr. 2017. PMID: 27423415.
125. NICOLOF, H.; BRINGEL, F. ISLpl1 is a functional IS30-related insertion element in *Lactobacillus plantarum* that is also found in other lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6032–6040, 2003.
126. NIETO-ARRIBAS, P. et al. Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. **Food Microbiology**, v. 28, p. 891-899, 2011.
127. NIKOLIC, M.; TERZIC-VIDOJEVIC, A.; JOVCIC, B.; BEGOVIC, J.; GOLIC, N.; TOPISIROVIC, L. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 162–170, 2008.
128. OLIVARES SABA, Angie Esteffany; ALBÁN CAMACHO, Emily Greidy. Efecto in vitro de cuatro cepas probióticas contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
129. OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Cienc. Far.**, v. 38 (1), 2002.
130. PELLEGRINO, Matías S. et al. In vitro characterization of lactic acid bacteria isolated from bovine milk as potential probiotic strains to prevent bovine mastitis. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 11, p. 74-84, 2019.
131. PENG, K. et al. Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**, v. 137, p. 109544, 2020.
132. PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects. **Front Microbiol**, 2018.

133. PORTO, B. C.; FUJIMOTO, G.; BORGES, M. D. F.; BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Determinantes de virulência em *Enterococcus* endógenos de queijo artesanal. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 69-76, 2016.
134. RABE, L. K.; HILLIER, S. L. Optimization of Media for Detection of Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41 (7), p. 3260-3264.
135. SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
136. SANLIBABA, P.; ÇAKMAK, G. A. Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. **Applied Microbiology**, v. 2, n. 2, 2016.
137. SANTOS, K. M. O.; MATOS, C. R.; SALLES, H. O.; FRANCO, B. D. G. M.; ARELLANO, K.; HOLZAPFEL, W. H.; TODOROV, S. D. Exploring Beneficial/Virulence Properties of Two Dairy-Related Strains of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. **Probiotics & Antimicro. Prot.**, 2020.
138. SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; BURITI, F. C. A. et al. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science and Technology**, v. 95, p. 209–230, 2015.
139. SANTOS, N. S.; MORILLA, D. P.; DOS SANTOS SOUSA, J.; DE FREITAS, A. J. D.; DE FREITAS, J. D.; DE LIMA FREITAS, M. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo coalho comercializados em Maceió - AL. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, nº 7, p. 9271-9281, 2019.
140. SENAN, S.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Comparison of Specificity of Different Primer Pairs for The Development of Multiplex PCR Assays for Rapid Identification of Dairy Lactobacilli. **International Journal of Science & Technology**, v. 3 (2), p. 123-137, 2008.
141. SHARMA, P. et al. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Research International**, v. 57, p. 176-195, 2014.
142. SHARMA, P.; TOMAR, S. K.; SANGWAN, V.; GOSWAMI, P.; SINGH, R. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations. **J Food Saf**, v. 36, p. 38–51, 2015.
143. SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 215-224, 2002.

144. SIKORSKA, Hanna; SMORAGIEWICZ, Wanda. Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 6, p. 475-481, 2013.
145. SILVA, B. C.; JUNG, L. R. C.; SANDES, S. H. C.; ALVIM, L. B.; BOMFIM, M. R. Q.; NICOLI, J. R.; NEUMANN, E.; NUNES, A. C. In vitro assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotic. **Beneficial Microbes**, 2013.
146. SILVA, J. G. et al. Avaliação in vitro do potencial probiótico de lactobacilos isolados de queijo minas artesanal produzido na região de Araxá, estado de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 647-657, 2019.
147. SILVA, Marcos Vinícius Mendes; NOGUEIRA, José Luiz. Mastite: controle e profilaxia no rebanho bovino. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 8, n. 15, p. 1-13, 2010.
148. SILVA, R. A.; LIMA, M. S. F.; VIANA, J. B. M.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food. **Food Chemistry**, v. 135, n° 3, p. 1533-1538, 2012.
149. SIQUEIRA, K. B. O Mercado Consumidor de Leite e Derivados. Circular técnica. Juiz de Fora, MG. Julho 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199791/1/CT-120-MercadoConsumidorKenya.pdf>. Acessado em: 09/10/2019.
150. SOUZA, C. de O.; MELO, T. R. B.; MELO, C. S. B.; MENEZES, Ê. M.; CARVALHO, E. C.; MONTEIRO, R. C. L. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreiogênica versátil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 7 (2), p. 79-91, jun. 2016.
151. SUKMARINI, L. et al. Identification of antibiotic-resistance genes from lactic acid bacteria in Indonesian fermented foods. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 21, n. 3, p. 144-150, 2014. E-ISSN: 2086-4094.
152. TAGG, Jonh R.; DAJANI, Adnan S.; WANNAMAKER, Lewis W. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Bacteriological reviews**, v. 40, (3), p. 722-756, 1976.
153. TENHAGEN, B. A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial

- Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 2542–2551, 2006.
154. TITZE, Isabel; KRÖMKER, Volker. Antimicrobial activity of a phage mixture and a lactic acid bacterium against *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 1, p. 31, 2020.
155. TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 209-221, 2009.
156. TULINI, F. L.; GOMES, B. C.; DE MARTINIS, E. C. P. Caracterização parcial da bacteriocina produzida por *Enterococcus faecium* 130, isolado de queijo mussarela. In: **Resumos**, 2008.
157. VAN HOEK, A. H. A. M. et al. Molecular assessment of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria and bifidobacteria and their relation to the phenotypic resistance. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 3, n. 4, p. 271–280, 2008.
158. VARMA, P. et al. Anti-infective properties of *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Physiology**, v. 20, n. 3, p. 137-143, 2011.
159. VASIEE, A. R., MORTAZAVI, A., TABATAEI-YAZDI, F., & EDALATIAN DOVOM, M. R. (2018). Detecção, identificação e análise filogenética de bactérias ácido-láticas isoladas de Tarkhineh, produto de cereais fermentados iranianos, através da amplificação do gene 16s rRNA com primers universais e diferenciação por rep-PCR. **Revista Internacional de Pesquisa de Alimentos**, 25(1), 423–432.
160. VERSALOVIC, J. BRUJIN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based Polymerase Chain Reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
161. VIÇOSA, G. N. et al. Impact of co-cultivation with *Enterococcus faecalis* over growth, enterotoxin production and gene expression of *Staphylococcus aureus* in broth and fresh cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 308, p. 108291, 2019.

162. WALKER, D. K.; GILLILAND, S. E. Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 956-961, 1993.
163. WU, Zhengke et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* on the growth performance, immune response, and intestinal barrier function of broiler chickens challenged with *Escherichia coli* O157. **Poultry Science**, v. 100, n. 9, p. 101323, 2021.
164. YILMAZ, E. S. et al. Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 20-26, 2016.
165. ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M. A. P.; HARRIS, H. M. B.; MATTARELLI, P et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, 2020.
166. ZIMERMANN, Katia Fabiane; ARAUJO, Maria Eugênia Moraes. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Campo Digital**, v. 12, n. 1, 2017.