

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA MARIA MACZUGA

POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO ISOLADAS DO  
LEITE CRU CONTRA *Staphylococcus aureus* E *Listeria monocytogenes*



CURITIBA

2020

JULIANA MARIA MACZUGA

POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO ISOLADAS DO  
LEITE CRU CONTRA *Staphylococcus aureus* E *Listeria monocytogenes*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Saúde Única, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dr.<sup>a</sup> Julia Arantes Galvão

Coorientador: Professor Dr. Gilberto Vinícius de Melo Pereira.

CURITIBA

2020

Maczuga, Juliana Maria

Potencial antagonista de bactérias do ácido láctico isoladas do leite cru contra *Staphylococcus aureus* E *Listeria monocytogenes*. / Juliana Maria Maczuga. - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Julia Arantes Galvão.

Coorientador: Gilberto Vinícius de Melo Pereira.

1. Leite - Microbiologia. 2. Bactérias patogênicas. 3. Ácido láctico. I. Galvão, Julia Arantes. II. Pereira, Gilberto Vinícius de Melo. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de JULIANA MARIA MACZUGA intitulada: **POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO ISOLADAS DO LEITE CRU CONTRA *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes***, sob orientação da Profa. Dra. JULIA ARANTES GALVÃO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 23 de Março de 2020.



JULIA ARANTES GALVÃO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



JULIANA SPEROTTO BRUM

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



DR. PEDRO DE CARVALHO NETO

Avaliador Externo (UFPR (BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA))

Aos que acreditam que o topo da montanha é o objetivo, mas que o verdadeiro aprendizado, a graça e o desafio estão na jornada e na habilidade em subir até lá.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e à Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, aos quais sempre recorri em todas as minhas dificuldades e indecisões.

À minha mãe, Ana, que é meu maior e mais lindo exemplo de pessoa, sabedoria e coragem, e que nunca me deixou desistir de nada; também ao meu pai e irmão, que sempre tiveram muita paciência durante os meus anos de estudo. Aos meus primos, José e Jorge, pelo companheirismo em todos os momentos.

À minha orientadora Prof. Júlia, pela orientação, aprendizados e notável paciência. Ao Prof. Gilberto pela co-orientação e colaboração neste trabalho. Aos demais professores com os quais convivi durante esta jornada. Laura e Carol, pela sincera convivência e amizade. Aos colegas e integrantes do LACQSA, e a todos que fizeram a diferença durante os meus dias acadêmicos.

Aos integrantes dos laboratórios do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, pelo acolhimento, auxílio e ensinamentos durante o desenvolvimento de etapas desta pesquisa.

Ao montanhismo, que me proporcionou vivenciar experiências e desafios que trouxeram aprendizados que se encaixam em outras situações da vida, sobretudo lições sobre paciência e perseverança, e que me devolveu a calma nos momentos difíceis.

À Universidade Federal do Paraná por ser minha segunda casa e proporcionar oportunidades e experiências memoráveis.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos nível mestrado.

## RESUMO

Esta dissertação foi dividida em duas partes, sendo elas: capítulo 1, que é uma breve revisão bibliográfica abordando a microbiologia do leite cru e os microorganismos utilizados neste estudo (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e as bactérias do ácido lático - BAL); e capítulo 2, o qual descreve o estudo realizado com *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e BALs isoladas do leite cru oriundos de propriedades leiteiras da Região Metropolitana de Curitiba, avaliando o potencial antagonista das BALs frente aos patógenos utilizando a metodologia de sobreposição dupla. As espécies lácticas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus brevis* isoladas mostraram capacidade em inibir *L. monocytogenes in vitro* e *L. plantarum* demonstrou o melhor potencial inibitório; na análise envolvendo a habilidade de *Staphylococcus aureus*, cepas testadas de *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* demonstraram capacidade de inibir a multiplicação do patógeno *in vitro*, sendo que *L. paracasei* alcançou os melhores resultados. Os dados encontrados neste estudo podem evidenciar sobre a influência das cepas de BAL nativas do leite cru no desenvolvimento dos patógenos estudados presentes no ambiente de ordenha e em leite e seus derivados.

Palavras-chave: bioproteção, bactérias do ácido lático, derivados lácteos, ordenha, antagonismo.

## ABSTRACT

This dissertation has two parts, the chapter 1 refers to a brief bibliographic review addressing the microorganisms studied (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and the lactic acid bacteria - LAB). The chapter 2 describes the study carried out with *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and LABs isolated from raw milk from dairy farms from the Metropolitan Region of Curitiba, evaluating the potential antagonist of LAB against the pathogen using the plate overlay methodology. Lactic species of *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecalis* and *Lactobacillus brevis* isolated from raw milk showed the ability to inhibit *L. monocytogenes in vitro* and *L. plantarum* demonstrated the best inhibitory potential; in the analysis involving the ability of *Staphylococcus aureus*, tested with strains of *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* demonstrated the ability to inhibit the multiplication of the pathogen *in vitro*, with the best results of *L. paracasei*. The results found in this study may show the influence of LAB strains native to raw milk in the development of the studied pathogens present in the milking environment and in milk and dairy products.

Key-words: bioprotection, lactic acid bacteria, dairy products, milking, antagonism.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - HALO DE INIBIÇÃO FORMADO POR BAL NO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS MARCADORAS UTILIZANDO MÉTODO DE SOBREPOSIÇÃO DUPLA..... 31

FIGURA 2 - DIVERSIDADE DE BAL COM ATIVIDADE ANTAGONISTA IDENTIFICADAS PELOS TESTES MOLECULARES (*PERCENT IDENTITY* >98%)..... 32

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESPÉCIES ÁCIDO LÁTICAS E DIÂMETROS MÉDIOS DOS HALOS PRODUZIDOS EM CO-CULTURA DE <i>L. monocytogenes</i> .....	31
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

APPCC	–	Análise de perigos e pontos críticos de controle
BAL	–	Bactérias do ácido láctico
BHI	–	<i>Brain heart infusion</i>
BLAST	–	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DTA	–	Doenças transmitidas por alimentos
LACQSA Alimentos	–	Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos
LEB	–	<i>Listeria Enrichment Broth</i>
Mm	–	Milímetros
MRS	–	<i>De Man, Rogosa and Sharpe</i>
MRSA	–	<i>S. aureus</i> resistente à meticilina
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
PCR	–	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SEs	–	Enterotoxinas estafilocócicas
TSA-YE	–	Trypticase de soja com extrato de levedura
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná

## SUMÁRIO

### CAPITULO I – REVISÃO DE LITERATURA – MICROBIOLOGIA DO LEITE CRU

1.1. Introdução geral .....	13
1.2. Bactérias patogênicas: <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.3. Bactérias do ácido lático: características gerais, diversidade, funções e produção de substâncias antimicrobianas.....	18

### CAPÍTULO II - ARTIGO I - LEITE CRU: ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO E ANÁLISE DO SEU POTENCIAL ANTAGONISTA FRENTE A *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

2.1. Resumo.....	24
2.2. Abstract.....	24
2.3. Introdução.....	25
2.4. Material e Métodos.....	27
2.4.1. Amostras de Leite cru.....	27
2.4.2. Isolamento e seleção de bactérias do ácido lático (BAL) .....	28
2.4.3. Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	28
2.4.4. Reativação de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
2.4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de sobreposição dupla.....	29
2.4.6. Identificação molecular dos isolados de BAL com atividade antimicrobiana.....	29
2.5. Resultados.....	30
2.5.1. Seleção de BAL.....	30
2.5.2. Atividade antimicrobiana de BAL contra bactérias-alvo.....	30
2.5.3. Diversidade microbiana ácido láctica.....	31
2.6. Discussão.....	32
2.7. Conclusão.....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>

## CAPITULO I – REVISÃO DE LITERATURA – MICROBIOLOGIA DO LEITE CRU

### 1.1. Introdução geral

O leite, pelas suas ricas características nutricionais e físico-químicas, é um alimento considerado propício ao crescimento de micro-organismos. Nele, são encontrados diversos grupos bacterianos, incluindo espécies benéficas, patogênicas ou deteriorantes. Bactérias benéficas, principalmente representadas por bactérias do ácido láctico, podem ser exploradas como probióticos ou bioconservantes, sendo extensivamente utilizados pela indústria (BOOR et al., 2017; NERO, DA CRUZ & BERSOT, 2017; PERIN, L. M. et al., 2019).

Segundo VASCONCELLOS & ITO (2011) e ARTURSSON (2018), o leite pode veicular micro-organismos responsáveis por doenças ou infecções consideradas zoonóticas, que são transmitidas entre os animais e os seres humanos de maneira natural. Dentre as zoonoses transmitidas aos seres humanos por meio do leite e seus derivados, estão a tuberculose zoonótica, brucelose, listeriose de origem alimentar e as gastroenterites por *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* e *Bacillus cereus*.

Desde a descoberta da pasteurização, por Louis Pasteur, no século XIX, são utilizados procedimentos tecnológicos desenvolvidos para assegurar o fornecimento de leite isento de micro-organismos patogênicos para os consumidores (WATT, 2016); no entanto, o índice de patógenos transmitidos pelo leite e seus derivados é ainda significativo (BUYSER, 2001; HAVELAAR, GRACE & WU, 2019). Em contrapartida as populações microbianas benéficas do leite cru podem incluir gêneros de bactérias do ácido láctico (BAL), como *Lactococcus*, *Streptococcus* e, em maior abundância, espécimes de *Lactobacillus*, todos com grande importância para a indústria (QUIGLEY et al. 2011; 2013).

Há muito tempo, as BAL são utilizadas nos processos fermentativos dos alimentos (NERO, DA CRUZ & BERSOT, 2017), como a fermentação do leite e sua transformação em produtos específicos com características ácidas (WIDYASTUTI, ROHMATUSSOLIHAT & FEBRISANTOSA, 2014). Além disso, essas espécies bacterianas são reconhecidas por sua ação probiótica,

trazendo benefícios para a saúde do homem e animais (O'SULLIVAN, J-H LEE & DOMINGUEZ, 2011).

## 1.2. Bactérias patogênicas

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm sido descritas há muito tempo, desde os primórdios das civilizações. A natureza, gravidade e consequências dessas enfermidades vem apresentando alterações ao longo do tempo e entre regiões, continentes e populações. Assim, a segurança alimentar é um desafio a ser enfrentado, considerando o ônus social e econômico que causam nas sociedades (WHO, 2015).

Tanto países industrializados quanto em desenvolvimento são vítimas dessas doenças, com grande número de indivíduos enfermos e altos custos envolvidos. A maior parte da sintomatologia em decorrência de DTA é caracterizada por sinais gastrintestinais, podendo gerar complicações severas (BLACKBURN & MCCLUR, 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), doenças alimentares podem ser causadas por diversos agentes, como vírus, bactérias, parasitas, toxinas formadas por micro-organismos ou agentes químicos, sendo que as bactérias são os principais agentes causadores (WHO, 2015).

### *Listeria monocytogenes*

Um dos micro-organismos reconhecido por causar doença com sintomatologia invasiva em grupos de risco é a *Listeria monocytogenes* (MCLAUHLIN et al., 2004; BUCHANAN, 2017; ARTURSSON, 2018). O principal veículo de transmissão dessa bactéria é a alimentação, incluindo carnes, vegetais e produtos lácteos. *Listeria* sp. são micro-organismos ubíquos e têm sido encontrados em diversos ambientes, alimentos, animais e também na água (BHUNIA, 2008; MAGALHÃES, 2014).

Na população em geral, a incidência da doença é baixa se considerarmos a ampla distribuição deste micro-organismo no meio ambiente e

a sua alta frequência em alimentos. No entanto, há alta incidência em populações de risco, como idosos, grávidas e pessoas com o sistema imune comprometido (MCLAUHLIN & REES, 2009; BUCHANAN et al., 2017). Pessoas dos grupos de risco podem ser acometidas por formas severas e invasivas da infecção, nos quais a taxa de mortalidade pode chegar a 40% (MAGALHÃES, 2014), gerando desfechos como septicemia ou infecção do sistema nervoso central com possibilidade de sequelas neurológicas e morte (WHO, 2007). Além disso, manifestações mais raras podem ocorrer, como meningoencefalite e encefalite associadas a endocardites, pneumonia, peritonite e abscessos, bem como lesões cutâneas e oculares (MCLAUHLIN et al., 2004). Nos indivíduos saudáveis, *Listeria monocytogenes* pode causar gastroenterites e sinais febris, geralmente autolimitantes (SWAMIATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; BHUNIA, 2008), ou mesmo ser assintomática (JAY, 2005).

Reconhecida em 1924, *Listeria monocytogenes* pertence ao gênero *Listeria*, possui a conformação de um bacilo, com metabolismo anaeróbico facultativo e não formador de esporos. Possui motilidade por meio de estruturas chamadas flagelos peritríquios, a temperaturas de 20 a 25°C, sendo imóvel a 37°C. *L. monocytogenes* é a mais relatada e importante para a saúde pública (MAGALHÃES, 2014).

*Listeria monocytogenes* possui 13 sorotipos, dos quais 1/2a, 1/2b e 4b são os mais prevalentes em DTA (MAGALHÃES, 2014; SINGH, 2017). A classificação desses sorogrupos se dá de acordo com proteínas de superfície dos antígenos específicos, como o (O) somático e (H) flagelar (SINGH, 2017).

*Listeria monocytogenes* é bastante versátil e consegue se desenvolver em ambientes desfavoráveis, contribuindo para a grande importância como patógeno alimentar (MAGALHÃES, 2014). Esta espécie se diferencia em sobrevivência de outros patógenos por possuir a capacidade de tolerar quantidades razoáveis de sal e crescer mesmo em temperaturas de refrigeração (SINGH, 2017). Não apresenta grande resistência a baixa atividade de água e ao calor, sendo facilmente destruída por método de pasteurização, desde que realizado adequadamente (MAGALHÃES, 2014).

Além disso, *L. monocytogenes* possui a capacidade de persistir no ambiente por meio da formação de biofilmes e, desta forma, causar

recontaminação do alimento durante seu processamento (BUCHANAN et al., 2017). Os biofilmes são agregados bacterianos envoltos de uma matriz extracelular, que confere às bactérias proteção aos intemperes do ambiente e auxiliam na resistência aos antibióticos (REICHHARDT et al., 2014).

A forma mais eficiente de eliminação dessas estruturas é baseada em técnicas específicas de higiene com práticas constantes durante e após as operações (BUCHANAN et al., 2017). Algumas cepas podem desenvolver maior resistência aos produtos utilizados na limpeza e sanitização, com maior capacidade de aderência permanecendo no ambiente (MAGALHÃES, 2014). A resistência de *L. monocytogenes* a produtos de sanitização e aos antibióticos está relacionada à aquisição de materiais genéticos móveis, como os plasmídeos, e ao desenvolvimento de bombas de efluxo. Além disso, grandes estresses ambientais, uso extensivo de produtos de limpeza e a formação de biofilme, carregam grande influência no desenvolvimento da resistência a antibióticos (OLAIMAT et al., 2018).

A partir da década de 90, a aplicação de medidas de controle tem diminuído gradativamente o número de detecções de *L. monocytogenes* em diversas categorias de alimentos. No entanto, a taxa da doença tem se mantido estável, ocorrendo maior necessidade de entendimentos a respeito das características do patógeno, bem como de métodos de controle utilizados para se reduzir a incidência de listeriose (BUCHANAN et al., 2017).

O meio mais eficaz para a prevenção e controle da bactéria utilizado pelas indústrias e ambientes de processamento de alimentos têm sido a implementação de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), com efetivo programa de limpeza e desinfecção, temperaturas e tempo controlados durante o processamento dos alimentos e também o início da introdução de bioprotetores, a exemplo do uso de bactérias ácido lácticas produtoras de bacteriocinas no processamento de alimentos (MAGALHÃES, 2014).

### *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus*, atualmente, alberga mais de 50 espécies, que são reconhecidas como comensais da pele e membranas mucosas de



animais e seres humanos (FETSCH & JOHLE, 2018). Espécies do gênero denominadas coagulase-positivas, que incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* e espécies coagulase variáveis de *Staphylococcus hyicus*, possuem um potencial importante de patogenicidade (SCHLEIFER & BELL, 2009).

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, com conformação de cocos, que podem estar agrupados ou não, não móvel e que possui alta tolerância ao sal (BHUNIA, 2008). A bactéria possui uma série de fatores de virulência, dentre elas a produção de toxinas, responsáveis pela síndrome do choque tóxico e pela intoxicação alimentar por estafilococos (LAKHUNDI & ZHANG, 2018). A intoxicação se dá em decorrência da ingestão de uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas (SEs) em alimentos contaminados, geralmente quando deixados em temperatura ambiente por longos períodos (BHUNIA, 2008). Segundo relatos, a primeira descrição da doença de origem alimentar associada a estafilococos foi investigada em 1884, na cidade de Michigan (EUA), ocasionada pelo consumo de queijo contaminado pela bactéria (HENNEKINNE, DE BUYSER & DRAGACCI, 2011).

A intoxicação alimentar por estafilococos é comum dentre as causas de doenças alimentares ao redor do mundo. Em geral, os casos diminuíram nas últimas décadas, mas, apesar disso, continua sendo importante causa de intoxicação alimentar, sobretudo em países em desenvolvimento (BHUNIA, 2008), embora sejam frequentemente subnotificados devido aos sintomas inespecíficos e a rápida melhora clínica quando o quadro clínico não envolve complicações (FDA, 2012).

Além de intoxicações alimentares *S. aureus* é reconhecido por causar uma variedade de infecções em animais, tais como mastites, infecções urinárias, dermatite, artrite, endocardite, abscessos e septicemia (PETON & LOIR, 2014), sendo a mastite considerada de impacto importante em pecuária leiteira (MOTA et al, 2012). Há uma estreita ligação entre a ocorrência de mastite, principalmente subclínica, causada por *Staphylococcus aureus*, e a transmissão deste patógeno via leite e derivados (FAGUNDES et al., 2010; ARTURSSON, 2018).

Clinicamente, *S. aureus* vem sendo notável, em decorrência do desenvolvimento de resistência a múltiplas classes de antibióticos, dificultando o tratamento (KHOSHKHARAM-ROODMAJANI, 2014). O uso da metilina levou ao aparecimento do *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), em meados de 1961, e as infecções causadas por estas cepas resistentes vêm aumentando, associadas a taxas de mortalidade mais altas do que em infecções causadas por cepas suscetíveis à metilina (LAKHUNDI & ZHANG, 2018). A resistência à metilina ocorreu em *S. aureus* por mutação de uma proteína de ligação à penicilina, uma proteína codificada no cromossomo. Este tipo de resistência é transferido entre as cepas por bacteriófagos (SIDDIQUI & KOIRALA, 2018).

Além da resistência à metilina, outro fator importante relacionado aos mecanismos desenvolvidos por *S. aureus* é capacidade de formar biofilmes, que, clinicamente gera dificuldade em eliminar o patógeno em infecções e aumenta a tendência em exibir resistência antimicrobiana (ARCHER et al., 2011; NEOPANE, 2018). Nas indústrias, a formação de biofilmes prejudica a manutenção e limpeza dos equipamentos e estruturas e também podem trazer alterações nas propriedades organolépticas do produto devido à secreção de lipases ou proteases. Além disso, biofilmes aumentam drasticamente a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos pela contaminação dos produtos pelos grupos bacterianos e suas toxinas (GALIÉ *et.al*, 2018).

### 1.3. Bactérias do ácido láctico: características gerais, diversidade, funções e produção de substâncias antimicrobianas

#### Histórico

Há muito tempo, as BAL são utilizadas em processos fermentativos de alimentos (NERO, DA CRUZ & BERSOT, 2017), como na biotransformação do leite em produtos específicos com características ácidas (WIDYASTUTI, ROHMATUSSOLIHAT & FEBRISANTOSA, 2014). Além disso, essas espécies bacterianas são reconhecidas por sua ação probiótica, trazendo benefícios para a saúde de humanos e animais (O'SULLIVAN, J-H LEE & DOMINGUEZ, 2010). Algumas espécies de BALs são capazes de produzir substâncias de

potencial interesse para a saúde humana e para a segurança de alimentos (CINTAS, 2001; DORTU & THONART, 2009; O'SULLIVAN, J-H LEE & DOMINGUEZ, 2010), como proteases, peptidases e bacteriocinas, que podem produzir um efeito antagonista no crescimento de micro-organismos deteriorantes ou patogênicos (O'SULLIVAN, J-H LEE & DOMINGUEZ, 2010). Essa capacidade inibitória vem sendo largamente estudada e as pesquisas indicam que BALs podem contribuir para a evolução da segurança e qualidade dos alimentos (CINTAS, 2001).

Os leites fermentados tiveram sua origem na antiguidade, quando o homem iniciou a arte de domesticar os animais. Com o início da prática da ordenha, a armazenagem do leite cru sob condições de temperaturas elevadas favorecia a multiplicação das bactérias ácido lácticas naturais do leite e a consequente formação de um produto final diferenciado, mais viscoso e com características próprias (NERO, DA CRUZ & BERSOT, 2017). A partir deste conhecimento, as técnicas de produção de leites fermentados foram propagadas ao redor do mundo e diferentes produtos foram desenvolvidos, incluindo *kefir*, leite acidófilo, *kumys*, iogurte, coalhada e leite cultivado (OLIVEIRA, 2009; NERO, DA CRUZ & BERSOT, 2017).

As BALs estão historicamente associadas a esses e outros alimentos fermentados e são reconhecidas por serem em sua maioria micro-organismos benéficos (SALMINEN et al., 2012), sendo o seu uso amplamente difundido e estudado ao longo dos anos. Os alimentos fermentados, além das características únicas de sabor, aroma e textura, têm sua vida de prateleira ampliada em relação à matéria prima utilizada; a digestibilidade e a disponibilidade das vitaminas e de outros componentes também podem ser favorecidos com o emprego do processo fermentativo (JAY, 2005). Apesar disso, alguns gêneros podem ser causadores de doenças em seres humanos ou nos animais (JAY, 2005; SALMINEN et al., 2012), tais como *Streptococcus pyogenes* (LAMAGNI et al. 2008) e *Streptococcus equi* (EROL, 2012).

#### Características gerais

As BALs são Gram-positivas não formadoras de esporos (OLIVEIRA, 2009; SALMINEN et al., 2012), com conformação de cocos, bacilos ou coco-

bacilos (BJORKROTH & KOORT, 2016; DA SILVA, 2017) e um metabolismo anaeróbico facultativo, sendo classificadas também como oxidase e catalase negativas (DA SILVA, 2017). A sua taxonomia foi estabelecida pela primeira vez em 1919 por Orla-Jensen (KANDLER, 1983; SALMINEN et al., 2012), o qual considerou uma divisão de quatro gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*.

Segundo a atual classificação taxonômica baseada no sequenciamento do gene ribossomal, as BALs pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordem *Lactobacillales*, subdivididas em seis famílias (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*) e há em torno de 40 gêneros atualmente reconhecidos (HOLZAPFEL & WOOD, 2014). Além desta classificação, alguns autores ainda consideram o gênero *Bifidobacterium* como pertencente ao grupo das BALs, devido às suas características biológicas e de metabolismo (DORTU & THONART, 2009; GIRAFFA, 2014).

A principal característica destas bactérias é produzir mais que 50% de ácido láctico como produto final da utilização de carboidrato (LIMSOWTIN, 2002; JAY, 2005; DA SILVA, 2017). O metabolismo de glicose pode levar à formação de apenas ácido láctico ou, além de ácido láctico, outros ácidos orgânicos e etanol. Essas variações nos produtos metabólicos geram três categorias de fermentação: homofermentação, metabolismo de ácidos mistos e heterofermentação (KOWALCZYK et al., 2016). Ressalta-se que, com a formação do ácido láctico, o valor do pH é reduzido a cerca de 4,6, alcançando o ponto isoelétrico da caseína do leite e, desta forma, propiciando a precipitação da proteína e a associação de micelas por meio de ligações hidrofóbicas com consequente formação de um gel, uma das características sensoriais dos leites fermentados (NERO, DA CRUZ & BERSOT, 2017).

Além do uso para transformações fermentativas dos alimentos, essas espécies bacterianas são reconhecidas por seu papel importante como probióticos, trazendo benefícios na função gastrointestinal e na saúde em geral de humanos e animais (O'SULLIVAN, J-H LEE & DOMINGUEZ, 2010). Alguns dos mecanismos de ação desenvolvidos pelos micro-organismos com função probiótica são a colonização da microbiota intestinal, promovendo exclusão

competitiva de patógenos, produção de bacteriocinas, de ácidos orgânicos, enzimas, mucina, ácidos graxos e modulação do sistema imunológico pela produção de moléculas moduladoras (LEBEER et al. 2008; PEREIRA et al. 2018; PLAZA-DIAZ, 2019).

#### Produção de substâncias com potencial antimicrobiano

A capacidade de produzir substâncias variadas por meio de seu metabolismo coloca as BALs frequentemente associadas a atividades antimicrobianas, relacionadas principalmente à formação de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos (MOKOENA, 2017).

Sabe-se que a produção de ácidos pelas BALs é um dos mecanismos mais importantes na inibição de outros microrganismos, pois a diminuição do pH é capaz de gerar efeitos no metabolismo celular (GUO et al., 2017), como a destruição do material genético, inibição da síntese proteica e alteração na captação de nutrientes e da estrutura da parede celular (LI et al., 2014). Embora a produção de ácidos orgânicos por essas espécies bacterianas seja um dos métodos de biopreservação em alimentos fermentados, outras substâncias como a reuterina, diacetil, ácidos graxos, peróxido de hidrogênio e propionato também são produzidas e demonstram efeitos na inibição do desenvolvimento de microrganismos (CASTELLANO et al., 2017). O peróxido de hidrogênio é reconhecido por seu potencial citotóxico, com grande potencial de oxidação para células e biomoléculas (JUVEN & PIERSON, 1996). A diversidade de substâncias produzidas pelas BALs e a associação desses fatores demonstram efeito categórico como ferramenta na biopreservação de alimentos e a consequente garantia da sua qualidade (REIS et al., 2012).

As bacteriocinas são moléculas produzidas por grande parte das bactérias já descritas, sendo que uma mesma espécie bacteriana pode produzir diversos tipos delas (RILEY & CHAVAN, 2007). As mesmas podem ser definidas como um produto bacteriano produzidas nos ribossomos, ou do metabolismo secundário, descritas como peptídeos de tamanho pequeno, estáveis ao calor, os quais podem inibir o crescimento de outras bactérias, sendo assim considerado um mecanismo de imunidade inata. As mais

conhecidas e com melhor potencial para serem utilizadas na indústria alimentícia são bacteriocinas produzidas pelas BALs, que já são amplamente utilizadas mesmo sem passarem por nenhum processo de purificação (COTTER et al., 2005).

Existe ampla variação de diversidade e frequência das bacteriocinas produzidas. Isso pode estar relacionado a diferentes fatores, incluindo o genoma, as interações entre as células produtoras de bacteriocinas e o hábitat onde a população bacteriana se estabeleceu (RILEY & CHAVAN, 2007). O tipo de bacteriocina produzida é determinado também pela disponibilidade de fontes de carbono, fosfato e nitrogênio, além de outras substâncias presentes no meio (SAVADOGO et al., 2006).

Devido à grande variedade de bacteriocinas existentes, seus mecanismos de ação podem também ser os mais variados, podendo os alvos, de maneira geral, constituir qualquer das etapas essenciais do funcionamento das células bacterianas, como síntese de proteínas, replicação e síntese da parede celular (OSCÁRIZ; PISABARRO, 2001). No entanto, sabe-se que as bacteriocinas são moléculas com características hidrofóbicas, resultando em mecanismos de ação que envolvem principalmente a membrana das bactérias alvo (SAVADOGO et al., 2006), podendo agir formando poros ou canais de membrana, que interferem no potencial energético das células bacterianas (OSCÁRIZ & PISABARRO, 2001).

Segundo a classificação estabelecida por HENG et al. (2007) e COTTER et al. (2005), as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas podem ser inseridas em umas das categorias: Classe I, os peptídeos lantibióticos dos tipo linear A, tipo globular B e tipo multicomponentes C; Classe II, que compõem os peptídeos não modificados, de tamanho menor que 10 kDa, subdivididos em tipo IIa semelhante a pediocina, tipo multicomponente IIb, e tipo misto IIc; classe III, composta por proteínas grande maiores que 10 kDa, subdivididas em tipo IIIa (Lisinas) e tipo IIIb; e classe IV, que são peptídeos cíclicos.

Além da inibição promovida pela produção de substâncias, a própria competição por nutrientes e espaço de adesão gera desaceleração do

desenvolvimento dos microrganismos no mesmo microambiente que as BALs (CORNU, 2001; GIUFFRIDA et al., 2009; VIECO-SAIZ et al., 2019). A capacidade de adesão de determinadas cepas de bactérias probióticas está intimamente relacionada à redução da possibilidade de adesão de patógenos em células intestinais, tornando-se um mecanismo importante de competição no ambiente intestinal (MYLLYLUOMA et al., 2008; INTURRI et al., 2016). Da mesma forma, a necessidade de captação de nutrientes por bactérias probióticas e a melhor adaptabilidade ao meio determinam uma natural competição por essas moléculas e geram a exclusão competitiva dos eventuais patógenos intestinais (LEBEER et al., 2008).

A combinação dos fatores citados, proporcionam a formação de um ambiente complexo, no qual microrganismos patogênicos e indesejáveis encontram uma situação de sobrevivência desfavorável (MEAD, 2000). Sabendo da capacidade dessas moléculas em inibir o crescimento de bactérias (ZACHAROF & LOVITT, 2012; MAGALHÃES, 2014; TRABULSI & ALTERTHUM, 2015), estudos para comprovar seus efeitos na inibição de outras bactérias vem sendo realizados como, por exemplo, na inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes*, considerado um importante patógeno alimentar (ZACHAROF & LOVITT, 2012; MAGALHÃES, 2014). Autores já realizaram pesquisas envolvendo diversas cepas de BALs com outras categorias bacterianas a fim de avaliar os efeitos antimicrobianos, demonstrando que os metabólitos produzidos pelas BALs estudadas foram capazes de reduzir significativamente a presença e o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas (AL-MALKEY et al. 2017; MARIAM et al. 2017; COSTA et al. 2018; TOUALBIA et al. 2018).

Outras perspectivas apontam ainda o uso de micro-organismos produtores de substâncias antimicrobianas como alternativas ao uso de antibióticos tradicionais, inclusive contra cepas resistentes em infecções humanas (COTTER et al. 2012; ZAHID et al., 2015; BISWAS et al., 2017; OŁDAK AND ZIELIŃSKA, 2017), além do uso como promotores de crescimento, substituindo os antibióticos na produção animal (VIECO-SAIZ et al., 2019).



## CAPÍTULO II - ARTIGO - LEITE CRU: ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO E ANÁLISE DO SEU POTENCIAL ANTAGONISTA FRENTE A *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

### 2.1. Resumo

Bactérias do ácido láctico (BAL) têm sido reconhecidas por seu papel probiótico e aplicação em processos tecnológicos na fabricação de alimentos fermentados. Adicionalmente, essas espécies bacterianas produzem uma diversidade de substâncias, como bacteriocinas, ácidos orgânicos, enzimas, mucina, ácidos graxos e outras moléculas, as quais possuem variável capacidade de inibir outras espécies microbianas, sobretudo isolados potencialmente patogênicos, como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* tornando-se potenciais aliados na bioproteção de alimentos. O objetivo deste estudo foi isolar BALs do leite cru, avaliar a influência destas no desenvolvimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes in vitro* e identificar as cepas que demonstraram potencial antagonista. Foram obtidos 60 isolados sugestivos de BAL a partir de sete amostras de leite e, um isolado de *L. monocytogenes* a partir de 12 amostras de leite. *S. aureus* foi proveniente do estoque de cepas do Laboratório de controle de qualidade e segurança de alimentos. Pelo método de sobreposição em placa, 21 BALs foram testadas para *L. monocytogenes* e 28 isolados para *S. aureus*. Os resultados foram obtidos pela leitura dos halos de inibição produzidos e 95,2% e 92,8% das BALs produziram algum nível de inibição contra os patógenos, respectivamente. Testes moleculares foram utilizados para identificação das espécies de BAL com potencial antagonista, sendo elas *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus brevis*. *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei* demonstraram as maiores capacidades de inibição a *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente. Os dados relatados neste estudo podem fornecer informações sobre a influência das cepas de BALs nativas do leite cru contra patógenos presentes em ambiente de ordenha e em leite e derivados, sendo considerada uma forma de bioproteção.

Palavras-chave: bacteriocina, inibição, bactérias lácticas, doenças transmitidas por alimentos, ambiente de ordenha.

### 2.2. Abstract

Lactic acid bacteria (BAL) have been recognized for their probiotic role and application in technological processes in the manufacture of fermented foods. Additionally, these bacterial species produce a diversity of substances, such as bacteriocins, organic acids, enzymes, mucin, fatty acids and other molecules, which have a variable capacity to inhibit other microbial species, especially potentially pathogenic isolates, such as *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, making potential allies in food bioprotection. The aim of this



study was to isolate LAB from raw milk, to evaluate their influence on the development of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus in vitro* and to identify potential antagonist strains. Sixty presumptive isolates of LAB were obtained from seven milk samples and one isolate of *L. monocytogenes* from twelve milk samples. *S. aureus* came from the strains stock of the Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos (LACQSA) – UFPR. By the plate overlay method, 21 BALs were tested for *L. monocytogenes* and 28 isolates for *S. aureus*. The results were obtained by reading the inhibition halos produced and 95.2% and 92.8% of the BALs produced some level of inhibition against the pathogens, respectively. Molecular tests were used to identify potential antagonist LAB species, namely *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus brevis*. *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* demonstrated the best inhibitory capacities to *L. monocytogenes* and *S. aureus*, respectively. The data reported in this study may provide information on the influence of native LAB strains of raw milk against the pathogen present in milking environment and in milk and dairy products, as a means of bioprotection.

Key-words: bacteriocins, inhibition, lactic bacteria, foodborne diseases, milking environment.

### 2.3. Introdução

O leite cru possui uma microbiota versátil, contendo espécies benéficas e patogênicas. As espécies benéficas podem promover ações probióticas e bioconservantes, ganhando espaço na indústria e na pesquisa por seu papel tecnológico e na saúde (BOOR et al., 2017; NERO, DA CRUZ & BERSOT, 2017; PERIN, L. M. et al., 2019). Por outro lado, os microrganismos patogênicos estão associados à ocorrência das doenças transmitidas por alimentos (DTA), as quais vem sendo relatadas com significativas morbidade e mortalidade pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ao redor do mundo (WHO, 2007).

Dentre as espécies benéficas de ocorrência natural no leite e outros alimentos, as bactérias do ácido láctico (BALs) são conhecidas por seu papel como probióticos, promovendo benefícios na saúde geral de humanos e animais (O'SULLIVAN, J-H LEE & DOMINGUEZ, 2010). Diversos são os mecanismos de ação desenvolvidos com função probiótica como a colonização da microbiota intestinal, promovendo exclusão competitiva de patógenos, além de produção de substâncias como bacteriocinas, ácidos orgânicos, enzimas,

mucina, ácidos graxos e ainda modularem o sistema imunológico pela produção de moléculas moduladoras (LEBEER et al., 2008; REIS et al., 2012; PLAZA-DIAZ, 2019).

Já como causadores de DTA, os maiores índices de ocorrência são bacterianos, sendo *Listeria monocytogenes* frequentemente citada e de grande importância na saúde pública (SCALLAN, 2011; WHO, 2015). A listeriose pode causar quadros de gastroenterites em indivíduos saudáveis, podendo neste grupo ser assintomática (BHUNIA, 2008; JAY, 2005). Em grupos de risco (gestantes, recém-nascidos, idosos, HIV-positivos) a listeriose pode gerar complicações severas e invasivas como aborto e meningite (SWAMINATHAN & SMIDT, 2007; MEHMOOD, MARWAT & KHAN, 2017; MAGALHÃES, 2014).

Embora seja comensal à pele e fossas nasais dos humanos e de animais, cepas de *Staphylococcus aureus* podem causar infecções e intoxicações (OLIVER et al. 2005; PETON & LOIR, 2014). *S. aureus* apresenta diversos fatores de virulência, incluindo a formação de enterotoxinas, responsáveis pelas intoxicações alimentares (BHUNIA, 2008). A intoxicação por estafilococos é uma das mais frequentes causas de enfermidade de origem alimentar ao redor do mundo (KADARIYA et al., 2014) e os números são frequentemente subnotificados em decorrência de sintomas inespecíficos e de rápida duração clínica quando não envolvem complicações (FDA, 2012). Sabe-se que há correlação entre a ocorrência de mastite, principalmente subclínica, causada por *S. aureus*, e a transmissão deste patógeno via contaminação do leite e seus derivados (FAGUNDES et al., 2010; ARTURSSON, 2018).

Devido à ocorrência de fatores de virulência, *S. aureus* possui susceptibilidade ao desenvolvimento de resistência a múltiplas classes de antibióticos (KHOSHKHARAM-ROODMAJANI, 2014). Desde 1961, com o aparecimento da resistência à meticilina, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), vem trazendo preocupação e grandes taxas de mortalidade em comparado às cepas suscetíveis (LAKHUNDI & ZHANG, 2018). MRSA foi estabelecido por mutação de uma proteína de ligação à penicilina, uma proteína codificada no cromossomo, sendo transferido entre as cepas por bacteriófagos (SIDDIQUI & KOIRALA, 2018).

É inegável que, desde a descoberta da penicilina em 1929, por Alexander Fleming (TAN & TATSUMURA, 2015), a luta contra doenças infecciosas tem sido bem-sucedida e encarada com maior otimismo. Apesar disso, há problemas importantes relacionados, como a grande mortalidade por infecções em países em desenvolvimento e o surgimento de resistência antimicrobiana a nível global (KAPOOR et al. 2017). Resistência antimicrobiana é um assunto complexo que exige esforços conjuntos de microbiologistas, ecologistas, especialistas em saúde, educadores, políticos, indústria e outros setores, bem como da própria sociedade (AMINOV, 2010).

Alternativas ao uso de antibióticos vem sendo desenvolvidas a fim de contornar as habilidades desenvolvidas pelas bactérias frente aos antibióticos tradicionais ao longo dos últimos 70 anos. Terapias antimicrobianas alternativas podem, atualmente, ser divididas em três grandes grupos: alternativas de ocorrência natural, estratégias sintéticas e as baseadas na biotecnologia. Dentre as alternativas de ocorrência natural podem ser empregadas lisinas, peptídeos antimicrobianos, terapias com fago, bacteriocinas, anticorpos e probióticos (GHOSH et al. 2019).

O uso de bacteriocinas e outras moléculas produzidas pelas BAL contra patógenos vem sendo relatado (DABÉS, SANTOS & PEREIRA, 2001; SOLEIMANI et al., 2010; DJADOUNI & KIHAL, 2012; CASTILLO, CABALLERO & LENGUA, 2015; KARAMI et al., 2017; COSTA et al. 2018) e estudos buscando avaliar essa capacidade de inibição vêm sendo feitos, propondo que esses microrganismos possam ser utilizados em alimentos como medida de bioproteção (COELHO et al., 2014; MACALUSO et al., 2016).

O objetivo deste estudo foi isolar BALs do leite cru e verificar, *in vitro*, a capacidade de inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, espécies frequentemente encontradas em ambiente de ordenha e em leite e derivados.

## 2.4. Material e Métodos

### 2.4.1. Amostras de leite cru

Sete amostras de leite cru foram coletadas para o isolamento de bactérias do ácido láctico (BALs) e 12 para pesquisa de *Listeria monocytogenes*.

As amostras foram provenientes de diferentes propriedades de produção leiteira localizadas na Região Metropolitana de Curitiba e foram coletadas em recipientes estéreis e mantidas em temperatura de refrigeração até o momento do processamento.

#### 2.4.2. Isolamento e seleção de bactérias do ácido láctico (BAL)

As amostras foram distribuídas em solução salina (0,85%) peptonada (0,1%) na proporção 1/9. Em seguida, as diluições foram plaqueadas pelo método de profundidade em placas contendo ágar *De Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) (Kasvi®) e incubadas a 32°C ±2°C por 72h, de acordo com a ISO 15214:1998.

Após a incubação, de três a cinco colônias foram purificadas em placas contendo ágar MRS (Kasvi®). Todas as placas foram incubadas a 32°C ±2°C por 48h em jarras de anaerobiose. Os isolados resultantes foram submetidos ao teste da catalase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 volumes), coloração de Gram e observação da conformação morfológica. Isolados catalase negativos e Gram-positivos resultantes foram transferidos para *ependoffs* contendo caldo *Brain heart infusion* (BHI) (Himedia®) incubados por 48h a 32°C ±2°C, seguido da adição de aproximadamente 200µl de glicerol 20% e estocados a temperatura de -4°C.

#### 2.4.3. Isolamento de *Listeria monocytogenes*

As amostras foram submetidas a ensaios microbiológicos de triagem contendo meios seletivos para *Listeria* sp. pelo método FDA/BAM.10:2016 modificado (HITCHINS et al., 2016). Inicialmente, 10 ml das amostras de leite foram colocadas em 90ml de *Listeria Enrichment Broth* (LEB) (Merck®) e incubadas a 37°C por 24h. Em seguida, foram transferidas para 10 ml de caldo *Fraser* (Oxoid®) suplementado (*Oxoid Fraser Supplement*®) e incubadas novamente por 24h a 37°C.

As amostras positivas a hidrólise de esculina tiveram 0,1ml transferidos para ágar Palcam (Oxoid®) e Oxford (Oxoid®), incubados a 37°C por 24h (HITCHINS et al., 2016). Três a cinco colônias típicas nesses meios foram selecionadas e estriadas em ágar Trypticase de soja (Oxoid®) com 0,6% de extrato de levedura (Oxoid®) - TSA-YE 0,6% e incubadas a 37°C de 24 a 48h (HITCHINS et al., 2016).

As colônias típicas foram isoladas e submetidas às provas bioquímicas, de acordo com FDA/BAM. 10:2016 (HITCHINS et al., 2016). Ao confirmar a presença da cepa de *Listeria monocytogenes*, a mesma foi transferida para caldo BHI (Himedia®) (48h a 30°C), e em seguida, foi acrescida de glicerol 20% e armazenada a -4°C, para preservação e manutenção da cepa.

#### 2.4.4. Reativação de *Staphylococcus aureus*

A cepa de *S. aureus* utilizada pertence ao estoque de cepas do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos (LACQSA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), a qual foi isolada de amostras de leite cru da mesma região do estudo. As cepas foram reativadas em caldo BHI (Himedia®) a 35°C por 24h em estufa sob condições de aerobiose. E, em seguida, foram estriadas em placas de ágar Nutriente (Himedia®) incubadas a 35°C por 24-48h.

#### 2.4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de sobreposição dupla

Para avaliar o potencial antagonista dos isolados de BAL foi utilizada a metodologia descrita por AWEEN et al. (2012) modificada, que envolve a sobreposição dupla. Cada isolado de BAL foi inoculado pontualmente em placas contendo ágar MRS (Kasvi®), formando *spots*. Após o período de incubação, a 30°C por 24h em jarras de anaerobiose, as placas contendo os *spots* foram vertidas com 15ml de ágar BHI (Himedia®) semi-sólido contendo  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml das bactérias marcadoras, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Após 24h de incubação, a 30°C  $\pm$  2°C sob condições de aerobiose, o diâmetro da zona de inibição foi mensurado, em milímetros (mm), com a utilização de uma régua.

#### 2.4.6. Identificação molecular dos isolados de BAL com atividade antimicrobiana

A identificação das espécies com resultados positivos aos testes de inibição foi realizada por meio de testes moleculares. Os isolados de BAL foram submetidos à extração de DNA, *Polymerase Chain Reaction* – PCR e posterior sequenciamento. Para a extração do DNA, os isolados foram cultivados em caldo MRS (Kasvi®) e o protocolo utilizado foi o descrito por Cheng & Jiang (2006) modificado. Em seguida, as reações de PCR foram realizadas utilizando-se um volume final de 50µl, sendo 2 µl de DNA. Os fragmentos do gene universal 16S rRNA foram amplificadas utilizando-se os *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3') (Lane, 1991; Wang et al. 2006) e 1512r (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') (Wang et al. 2006) sob condição de 95 ° C por 5 min (um ciclo), 93° C por 5 min 50° C por um minuto, 72° C por 1 min e 30 s (30 ciclos) e 72 ° C por 5 min (um ciclo), seguido de resfriamento a 4° C e armazenamento a -20° C. Os produtos de PCR foram sequenciados por GoGenetic (Curitiba, Brasil). As sequências resultantes foram submetidas e comparadas no banco de dados GenBank usando o algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (National Center for Biotechnology Information, Maryland, EUA).

## 2.5. Resultados

### 2.5.1. Seleção de BAL

Foram isoladas 60 cepas sugestivas de BAL a partir das amostras de leite, 41 delas eram catalase negativas e Gram-positivas. Três foram eliminados do experimento pela observação de contaminação durante a estocagem.

### 2.5.2. Atividade antimicrobiana de BAL contra bactérias-alvo

Dos 41 isolados de BALs, e considerando a formação homogênea de *spot* de bactéria láctica e do crescimento do patógeno na placa, 28 e 21 placas proporcionaram leitura adequada dos resultados na exposição de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente (Tabela 1). Da leitura do diâmetro dos halos de inibição (Figura 1), foi possível observar que 26 (92,8%) dos isolados de BALs tiveram algum nível de resposta inibitória ao *S. aureus*, sendo o maior

halo de inibição 30 mm  $\pm$ 2 e o menor 15 mm  $\pm$ 2. A observação mais frequente (34,6%) foi 20 mm  $\pm$ 2. Para *L. monocytogenes*, 95,2% dos testados produziram algum nível de inibição (15 a 40 $\pm$ 2 mm). O maior halo de inibição (40mm) observado na exposição a *L. monocytogenes* foi por um isolado de *Lactobacillus plantarum*.

FIGURA 1. Halo de inibição formado por BAL no crescimento das bactérias marcadoras utilizando método de sobreposição dupla.

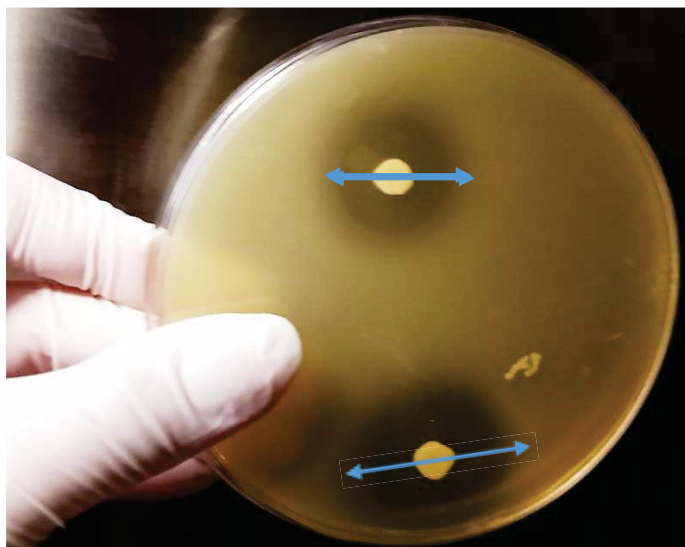


TABELA 1. Médias dos halos de inibição formado por BAL no crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* pelo método de sobreposição dupla.

	Média do halo de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	15,5 $\pm$ 2	17,7 $\pm$ 2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	22,1 $\pm$ 2	30 $\pm$ 2
<i>Lactobacillus fermentum</i>	19,9 $\pm$ 2	20,7 $\pm$ 2
<i>Enterococcus faecalis</i>	16 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2
<i>Lactobacillus paracasei</i>	26 $\pm$ 2	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	20 $\pm$ 2	20 $\pm$ 2

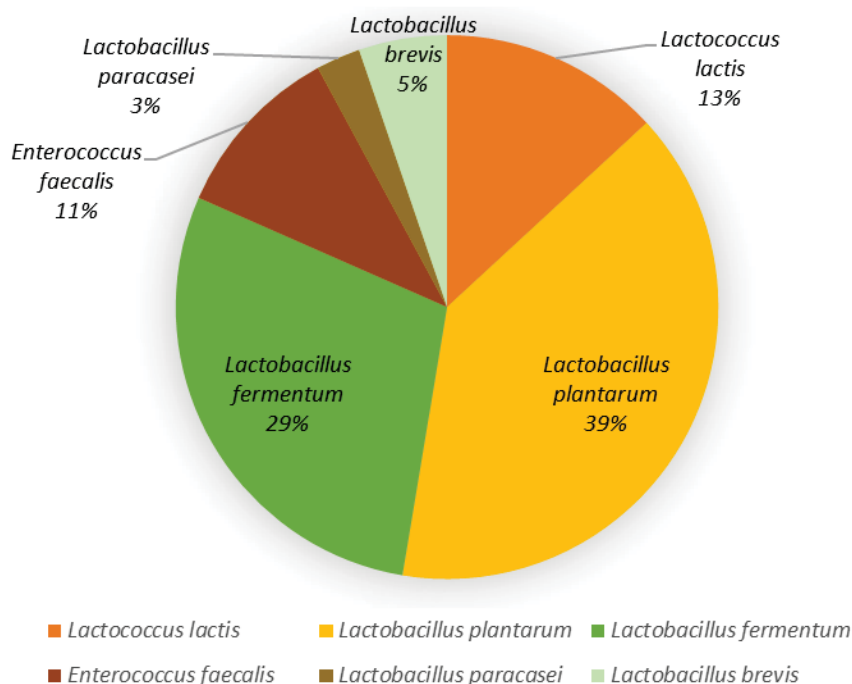
### 2.5.3. Diversidade microbiana ácido láctica

Foi possível identificar geneticamente 38 isolados, utilizando-se *Percent Identity* >98%. Ao todo, três gêneros e seis diferentes espécies bacterianas foram reconhecidas: *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus*



*plantarum*, *Lactobacillus Fermentum*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus brevis*. As espécies predominantes observadas foram *Lactobacillus plantarum* (39%) e *Lactobacillus fermentum* (29%) (Figura 2).

FIGURA 2. Diversidade de BAL com atividade antagonista identificadas pelos testes moleculares (*Percent Identity* >98%).



## 2.6. Discussão

Sabe-se que o leite cru alberga variados grupos microbianos benéficos, incluindo bactérias do ácido láctico (BAL), sendo os espécimes mais abundantes do gênero *Lactobacillus* (QUIGLEY et al. 2011; 2013). O gênero de BAL mais prevalente no estudo foi *Lactobacillus* (76%). Esse gênero é frequentemente relatado, abundante e reconhecido da microbiota natural do leite cru (MASOUD et al., 2012; GAO et al., 2017). Estudos relatam também a ocorrência frequente de *Enterococcus* e *Lactococcus* (AZIZ et al., 2009; ALNAKIP et al. 2016; GAO et al. 2017). Os gêneros com capacidade de inibição frente aos patógenos são descritos como promotores de saúde e com importância tecnológica (QUIGLEY et al. 2013). Diversos estudos buscando avaliar a capacidade de inibição do crescimento de patógenos utilizando BAL vêm sendo feitos, propondo que



esses microrganismos possam ser utilizados em alimentos como medida de bioproteção (COELHO et al., 2014; MACALUSO et al., 2016).

Um isolado de *Lactobacillus plantarum* demonstrou o maior valor (30 mm  $\pm$ 2) frente a *S. aureus*. Em um estudo semelhante, foram encontrados halos com diâmetros máximos de 15 $\pm$ 0,3 mm envolvendo *L. plantarum* e *S. aureus* (JABBARI et al., 2017). Bholá & Bhadekar (2019) relataram inibição de cepas droga-resistentes de *S. aureus* por *L. plantarum*, associado ou não a outras espécies de *Lactobacillus* sp. *In vivo*, cepas de *Lactobacillus plantarum* também demonstraram efeito favorável durante a infecção intestinal por *S. aureus* em camundongos (REN et al. 2017). Sabe-se que diversos fatores influenciam no antagonismo verificado, incluindo a produção de variadas substâncias, como proteases, peptidases e bacteriocinas pelas BALs (O'SULLIVAN, J-H LEE & DOMINGUEZ, 2010), bem como peróxido de hidrogênio, ácido láctico (MOKOENA, 2017) e outros ácidos orgânicos (KOWALCZYK et al., 2016) que, com ou sem sinergismo, são capazes de produzir um efeito inibitório no crescimento de micro-organismos deteriorantes ou patogênicos.

Há relatos de resultados promissores envolvendo a capacidade de *L. plantarum* na inibição de *L. monocytogenes*, sendo a produção de ácido láctico e a acidificação ocasionada por ele fatores de grande relevância (WILSON, SIGEE & EPTON, 2005; KAMILOĞLU, KABAN & KAYA 2019). Além disso, algumas bacteriocinas produzidas por *L. plantarum* são caracterizadas por inibirem o desenvolvimento de *L. monocytogenes* (CHEN et al., 2018; ATRIH et al., 2001). Uma aplicação possível para inócuos de *L. plantarum* seria a estratégia de melhoria da qualidade microbiana e segurança em alimentos como o queijo, sobretudo os produzidos a partir de cru, uma vez que a adição da BAL pode eliminar o crescimento de *L. monocytogenes* (SCATASSA et al., 2017).

De acordo com Ramos et al. (2017) algumas BAL (*L. brevis* e *L. plantarum*) isoladas de produtos fermentados brasileiros apresentam boa sobrevivência e aderência ao trato gastrointestinal e poderiam ser empregados como probióticos. Neste estudo, *L. brevis* produziu média de halo de inibição

de 20 mm contra *L. monocytogenes* indicando que a presença da BAL e a eventuais substâncias produzidas por elas foram capazes de antagonizar o desenvolvimento de *L. monocytogenes* nas placas. *In vivo*, Riaz et al. (2019) testaram inócuos de *L. brevis* em camundongos com listeriose com resultados efetivos, propondo que a BAL poderia ser utilizada como probiótico e configurando uma medida profilática contra listerioses. Para *S. aureus*, *Lactobacillus brevis*, embora menos relatado na literatura, apresentou bom resultado antagonista no teste (20 mm  $\pm$ 2), também descrito por (RAHMEH et al., 2019).

*Lactobacillus fermentum*, espécie identificada em 29% dos isolados de BALs, demonstrou capacidade de inibição ao patógeno testado, com média dos halos variando entre 15,5mm e 19,9mm para *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente. Park et al. (2015) testaram cepas de *L. fermentum* contra seis patógenos (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) confirmando a habilidade inibir seus desenvolvimentos. *L. fermentum* demonstrou formação de halos de inibição contra *S. aureus*, de em média, 19,9  $\pm$ 2 mm. Melo et al. (2016) verificaram uma redução da formação de biofilmes de *S. aureus* na presença de *L. fermentum*. Ademais, cepas de *L. fermentum* vêm sendo reconhecidas pelo seu potencial probiótico, devido, por exemplo, à sobrevivência ao trajeto gastrointestinal, aderência à camada epitelial intestinal e habilidade em produzir moléculas com atividade antibacteriana contra patógenos intestinais (RAMOS et al., 2013; FUOCHI, VOLTI & FURNERI, 2017).

Cepas de *Enterococcus* sp. podem exibir diferentes mecanismos moleculares e fatores de virulência, determinando se o microrganismo se caracteriza por probiótico, patogênico ou comensal. Hwanhlem et al. (2017) demonstraram a habilidade de isolados de *E. faecalis* em produzir bacteriocinas eficientes na inibição de patógenos, sendo consideradas com potencial de aplicação como agente de biocontrole. Além disso, Vimont et al. (2017) isolaram cepas de *E. faecium* com capacidade inibitória contra bactérias gram-positivas, incluindo espécies dos gêneros *Clostridium*, *Listeria* e

*Staphylococcus*, e outros aspectos de sobrevivência ao trato gastrintestinal, indicando que cepas do gênero *Enterococcus* possuem habilidade probiótica e antagonista contra alguns patógenos.

A média dos halos produzidos por *Enterococcus faecalis* frente à cepa de *S. aureus* foi de 16 mm  $\pm$ 2, um dos menores valores observados, indicando que, comparativamente à outras espécies testadas, possui baixa capacidade antagonista à cepa de *S. aureus*. Por outro lado, nos testes envolvendo *L. monocytogenes*, o valor médio dos halos resultantes neste estudo foi de 21 mm, demonstrando que *E. faecalis* possui melhor capacidade em inibir *L. monocytogenes* do que *S. aureus* neste estudo.

Para *Lactococcus lactis*, comparativamente a *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei* e *L. brevis*, a observação a média de halo de 15,5  $\pm$ 2 indica capacidade antagonista inferior frente a *S. aureus*. A aplicação principal de espécies de *Lactococcus lactis* tem sido na fabricação de produtos fermentados como culturas *starter*, devido à habilidade de gerar produtos com características sensoriais desejáveis (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al. 2018), no entanto, estudos demonstram que *L. lactis* é capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* com valores do diâmetro dos halos semelhantes aos observados (AI-LIAN SONG et al. 2017; TETILI et al. 2017; AKBAR et al. 2019), bem como a diminuição da produção de enterotoxinas estafilocócicas (TETILI et al. 2017). A associação das características de *L. lactis*, o recorrente uso industrial e o potencial antagonista razoável contra *S. aureus*, o fazem um excelente candidato como bioprotetor na indústria alimentícia.

Neste estudo, *Lactococcus lactis* resultou na menor média do diâmetro dos halos no teste de inibição de *L. monocytogenes* (17,7  $\pm$ 2mm). Apesar disso, estudos demonstram que *Lactococcus lactis* podem produzir efeitos razoáveis na inibição do crescimento de *L. monocytogenes* (RODRIGUEZ et al., 2005; NERO et al, 2009), bem como é possível a detecção e caracterização de bacteriocinas (DAL BELLO et al., 2012; SAMELIS & KAKOURI, 2018) e produtos voláteis produzidos por isolados dessa espécie, capazes de inibir o patógeno (SIROLI et al., 2019). Há relatos de resultados promissores envolvendo a capacidade de *L. plantarum* na inibição de *L. monocytogenes*, sendo a produção de ácido láctico e a acidificação ocasionada por ele fatores de

grande relevância (WILSON, SIGEE & EPTON, 2005; KAMILOĞLU, KABAN & KAYA 2019). Além disso, algumas bacteriocinas produzidas por *L. plantarum* são caracterizadas por inibirem o desenvolvimento de *L. monocytogenes* (CHEN et al., 2018; ATRIH et al., 2002). Uma aplicação possível para inócuos de *L. plantarum* seria a estratégia de melhoria da qualidade microbiana e segurança em alimentos como o queijo, sobretudo os produzidos a partir de cru, uma vez que a adição da BAL pode eliminar o crescimento de *L. monocytogenes* (SCATASSA et al., 2017).

Pesquisas demonstram que cepas de *L. paracasei* desenvolvem um desejável antagonismo frente a *S. aureus* (BENDALI, MADI, & SADOON, 2011; MADI & BOUSHABA, 2017). Apenas um isolado foi identificado como *L. paracasei*, o qual apresentou média de diâmetro de halo de 26 mm  $\pm$ 2 contra *S. aureus*, demonstrando capacidade antagonista.

## 2.7. Conclusão

A observação de halos de inibição nos testes realizados neste estudo indica que a presença e/ou produção de substâncias pelas cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus brevis* isoladas do leite cru possuem capacidade de inibir a multiplicação de *S. aureus* e *L. monocytogenes in vitro*. Isolados de *Lactobacillus plantarum* tiveram maiores frequências e demonstraram o maior halo de inibição frente a *L. monocytogenes*. A cepa de *Lactobacillus paracasei* promoveu o maior halo de inibição frente a *Staphylococcus aureus*.

Os dados relatados neste estudo podem fornecer informações sobre a influência das cepas de BALs nativas do leite cru na inibição de patógenos de ocorrência em ambiente de ordenha e em leite e derivados. Este estudo pode ainda contribuir para o desenvolvimento de novas pesquisas envolvendo a caracterização e a aplicação das substâncias produzidas pelas BALs no controle do crescimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

## REFERÊNCIAS

- Al- Malkey, M.K.; Ismeeal, C.M., Al-Hur, F.J.A., Mohammed, S.W., Nayyef, H.J. (2017). Antimicrobial effect of probiotic *Lactobacillus* spp. on *Pseudomonas aeruginosa*. J. Contemp. Med. Sci. 3(10): 218-223.
- Alnakip, M. E. A. Mohamed, A. S., Kamal, R. M., Elbadry S. (2016). Diversity of lactic acid bacteria isolated from raw milk in Elsharkia province, Egypt. Jpn. J. Vet. Res. 64. 23-30.
- Aminov, R. I. (2010). A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. Front. Microbiol. 1(134): 1-7. <https://doi:10.3389/fmicb.2010.00134>.
- Archer, N. K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E. (2011). Staphylococcus aureus biofilms Properties, regulation and roles in human disease. Virulence. 2:5, 445-459. <https://doi:10.4161/viru.2.5.17724>
- Artursson, K., Schelin, J., Thisted Lambertz, S., Hansson, I., & Olsson Engvall, E. (2018). Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden. Int. J. Food Microbiol. 1-8. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.015>.
- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A. J. ., Lebrihi, A., Lefebvre, G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. Int. J. Food Microbiol. 68(1-2), 93–104. [https://doi:10.1016/s0168-1605\(01\)00482-2](https://doi:10.1016/s0168-1605(01)00482-2).
- Aween, M. M., Hassan, Z., Muhialdin, B. J., Eljamel, Y. A., Al-Mabrok, A. S. W., Lani, M. N. (2012). Antibacterial Activity of Lactobacillus acidophilus Strains Isolated from Honey Marketed in Malaysia against Selected Multiple Antibiotic Resistant (MAR) Gram-Positive Bacteria. J. Food Sci. 77(7), M364–M371. <https://doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02776.x>.
- Bendali, F., Madi, N., Sadoun, D. (2011). Beneficial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in *Staphylococcus aureus*-induced intestinal and colonic injury. Int. J. Infect. Dis., 15(11), e787–e794. <https://doi:10.1016/j.ijid.2011.07.003>.
- Bhola, J., Bhadekar, R. (2019). *In vitro* synergistic activity of lactic acid bacteria against multi-drug resistant staphylococci. BMC Complement Altern Med. 19:70, 1-8. <https://doi:19.10.1186/s12906-019-2470-3>.
- Bhunja, A. K. (2008). Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. Springer, West Lafayette, IN.
- Biswas, K., Upadhayay, S., Rapsang, G.F., Joshi, S.R. (2017). Antibacterial and synergistic activity against  $\beta$ -Lactamase-producing nosocomial bacteria by bacteriocin of LAB Isolated from lesser known traditionally fermented products of India. HAYATI J. of Biosci., 24(2): 87–95. <https://doi:10.1016/j.hjb.2017.08.008>.

Bjorkroth, J., Koort, J. (2016). Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity. Ref. Mod. Food Sci. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00864-7>.

Blackburn, W., McClure, P.J. (2009). Foodborne pathogens Hazards, risk analysis and control, second ed. Woodhead publishing ltd, Cambridge.

Boor, K.J., Wiedmann, M., Murphy, S., Alcaine, S. (2017). A 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling. J. Dairy Sci. 100(12): 9933 - 9951. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12969>.

Buchanan, R. L., Gorris, L., Hayman, M.M., et al. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food Control. v. 75, p. 1-13.

Castellano, P., Pérez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C., & Vignolo, G. (2017). Strategies for Pathogen Biocontrol Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites: A Focus on Meat Ecosystems and Industrial Environments. Microorganisms. 5(3), 38: 1-25. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030038>.

Castillo, P. M. M., Caballero, A. D., Lengua, M.D. (2015). Antagonistic action of *Lactobacillus* spp. against *Staphylococcus aureus* in cheese from Mompox – Colombia. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín. 68(2) 7721-7727. <http://dx.doi.org/10.15446/rfnam.v68n2.50991>.

Chen, L., Gu, Q., Li, P., Li, Y., Song, D., Yang, J. (2018). Purification and Characterization of Plantaricin ZJ316, a Novel Bacteriocin against *Listeria monocytogenes* from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. J. Food Prot. 81(12), 1929–1935. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-jfp-18-306>.

Cheng, H.-R., Jiang, N. (2006). Extremely Rapid Extraction of DNA from Bacteria and Yeasts. Biotechnol. Lett. 28(1), 55–59. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z>.

Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Hernández, P.E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Int. J. Food Sci. Tec. 7: 281–305.

Coelho, M. C., Silva, C. C. G., Ribeiro, S. C., Dapkevicius, M. L. N. E., Rosa, H. J. D. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 191, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029>.

Cornu, M. (2001). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in situ. Acta Hort. 566:151–157.

Costa, A.C.C.C., Pereira, A.N., Silva, A.C.A., Silva, F.A., Ribeiro, K.O., Torres, I.M.S., Martinis, E.C.P., Alves, V.F. (2018). Antilisterial and antistaphylococcal activity of a *Lactococcus lactis* strain isolated from Brazilian fresh Minas cheese. J. Food Saf. 1-8. <https://doi.org/10.1111/jfs.12593>.



Costa, A.C.C.C., Pereira, A.N., Silva, A.C.A., Silva, F.A., Ribeiro, K.O., Torres, I.M.S., Martinis, E.C.P., Alves, V.F. (2018). Antilisterial and antistaphylococcal activity of a *Lactococcus lactis* strain isolated from Brazilian fresh Minas cheese. *J. Food Saf. J* e12593. <https://doi.org/10.1111/jfs.12593>.

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(10): 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>.

Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2012). Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics?. *Nat. Rev. Microbiol.* 11(2): 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>.

Da Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Gomes, R.A.R., Midori, M., Okazaki, M.M. (2017). Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água, 5ª ed. Blucher, São Paulo.

Dabés, A.C., Santos, W.L.M., Pereira, E.M. (2001). Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. *Arq. Bras. Med. Vet.* <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352001000100022>.

De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67 (1-2) 1–17. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00443-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00443-3).

Djadouni, F., Kihal, M. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Braz. Arch. Biol. Technol.* vol.55 no.3. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132012000300015>.

Dortu, C., Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*: 143-154.

Erol, E., Locke, S. J., Donahoe, J. K., Mackin, M. A., Carter, C. N. (2012). Beta-hemolytic *Streptococcus* spp. from horses: a retrospective study (2000–2010). *J. V. Diagn. Invest.* 24(1), 142–147. <https://doi.org/10.1177/1040638711434138>.

Fagundes, H., Barchesi, L., Nader Filho, A., Ferreira, L. M., Oliveira, C. A. F. (2010). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 41(2), 376–380. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822010000200018>.

FDA - Food and Drug Administration. (2012). Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, second ed. US Food and Drug Administration, Silver Spring US.

Fetsch, A., Johler, S. (2018). *Staphylococcus aureus* as a Foodborne Pathogen. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 5(2), 88–96. <https://doi:10.1007/s40588-018-0094-x>.

Fuochi, V., Volti, G.L., Furneri, P.M. (2017). Probiotic Properties of *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Human Oral Samples and Description of their Antibacterial Activity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 18(2):138-149. <https://doi:10.2174/1389201017666161229153530>.

Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front. Microbiol.* 9, 1-18. <https://doi:10.3389/fmicb.2018.00898>.

Gao, M. L., Hou, H. M., Teng, X. X., Zhu, Y. L., Hao, H. S., Zhang, G. L. (2017). Microbial diversity in raw milk and traditional fermented dairy products (Hurood cheese and Jueke) from Inner Mongolia, China. *Genet. Mol. Res.* 16(1). <https://doi:10.4238/gmr16019451>.

Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R., Haldar, J. (2019). Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol.* <https://doi:10.1016/j.tim.2018.12.010>.

Giraffa, G. (2014). Overview of the ecology and biodiversity of the LAB, in: Holzapfel, W. H., Wood, B. J.B. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, first ed., Wiley-Blackwell, pp. 41-54.

Giuffrida, A., D. Valenti, G. Ziino, B. Spagnolo, and A. Panebianco. (2009). A stochastic interspecific competition model to predict the behaviour of *Listeria monocytogenes* in the fermentation process of a traditional Sicilian salami. *Eur. Food Res. Technol.* 228:767–775.

Guo, L., Y. M. He, M. Li, D. W. Chen, X. Chen, Y. J. Huang, and R. X. Gu. (2017). Inhibitory effects of single and mixed lactic acid bacteria on intestinal pathogens. *Food Sci., Technol.* 42:26–30.

Havelaar, A., Grace, D., Wu, F. (2019). Foodborne diseases from dairy products in developing countries: Hazards and health implications. Presentation at the 2019 annual meeting of the American Dairy Science Association, Cincinnati, Ohio, Gainesville, Florida.

Heng, N.C., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W., Tagg, J.R. (2007). The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria, in: RILEY, M. A.; CHAVAN, M., (Eds.), *Bacteriocins: ecology and evolution*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 45-92.

Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L., Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36(4), 815–836. <https://doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>.



Hitchins, A.D., Jinneman, K., Chen, Y. (2016). Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods, in: US Food and Drug Administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-detection-and-enumeration-listeria-monocytogenes> (Acesso em 10 de janeiro de 2020).

Holzapel, W. H., Wood, B. J.B. (2014). Introduction to the LAB. In: Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy, first ed., Wiley-Blackwell, pp. 1-12.

Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y., Haertlé, T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. Food Control. 78, 187–195. <https://doi:10.1016/j.foodcont.2017.02.060>.

Inturri, R., Stivala, A., Furneri, P.M., Blandino, G. (2016). Growth and adhesion to HT-29 cells inhibition of Gram-negatives by *Bifidobacterium longum* BB536 e *Lactobacillus rhamnosus* HN001 alone and in combination. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 20, 4943–4949.

Jabbari, V., Khiabani, M.S., Mokarram, R.R., Hassanzadeh, A.M., Ahmadi, E., Gharenaghadeh, S., Karimi, N., Kafil, H.S. (2017). *Lactobacillus plantarum* as a probiotic potential from kouzeh cheese (traditional iranian cheese) and its antimicrobial activity. Probiotics Antimicrob. Proteins. 9(2), 189–193. <https://doi:10.1007/s12602-017-9255-0>.

JAY, J.M. (2005). Microbiologia de Alimentos. 6<sup>a</sup>.ed. Artmed, Porto Alegre.

Juven, B.J., Pierson, M.D., 1996. Antibacterial Effects of Hydrogen Peroxide and Methods for Its Detection and Quantitation. J. Food Prot., v. 59, n. 11, p. 1233-1241.

Kadariya, J., Smith, T. C., Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed. Res. Int. 827965. <https://doi:10.1155/2014/827965>.

Kamiloğlu, A., Kaban, G., Kaya, M. (2019). Effects of autochthonous *Lactobacillus plantarum* strains on *Listeria monocytogenes* in sucuk during ripening. J. Food Saf. e12618. <https://doi:10.1111/jfs.12618>.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 49(3): 209-224. <https://doi.org/10.1007/BF00399499>.

Kapoor G., Saigal S., Elongavan A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. vol.33, 300-305p. [https://doi:10.4103/joacp.JOACP\\_349\\_15](https://doi:10.4103/joacp.JOACP_349_15).

Karami, S., Roayaei, M., Hamzavi, H., Bahmani, M., Hassanzad-Azar, H., Leila, M., Rafieian-Kopaei, M. (2017). Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on

pathogens. Int. J. Pharm. Investig. 7(3):137-141. [https://doi:10.4103/jphi.JPHI\\_8\\_17](https://doi:10.4103/jphi.JPHI_8_17).

Khoshkharam-Roodmajani, H., Sarvari, J., Bazargani, A., Kandekar-Ghahraman M.R., Nazari-Alam, A., Motamedifar, M. (2014). Molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Shiraz teaching hospitals by PCR-RFLP of coagulase gene. Iran J. Microbiol. 6(4):246-52.

Kowalczyk, M., Mayo, B., Fernandez, M., Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2016). Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of “Omic” Technologies, in: Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., (Eds.), Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications, second ed., Wiley Blackwell, pp. 1-24.

Lakhundi, S., Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clin. Microbiol. Rev. 31(4). <https://doi:10.1128/cmr.00020-18>

Lamagni, T. L., Darenberg, J., Luca-Harari B., et al. (2008). Epidemiology of Severe *Streptococcus pyogenes* Disease in Europe, Strep-EURO Study Group. J. Clin. Microbiol. 46 (7) 2359-2367. <https://doi:10.1128/JCM.00422-08>

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing, in: Stackebrandt, E., Goodfellow, M., (Eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. (2008). Genes and molecules of *Lactobacilli* supporting probiotic action. Microbiol. Mol. Bio. Rev. 72, 728-764. <https://doi:10.1128/MMBR.00017-08>.

Li, S. J., M. X. Gao, C. B. Cui, C. C. Liu, H. Mou, X. Zhao, and Z. D. Wang. (2014). Effects of irradiation on antimicrobial activity of weak organic acid preservatives. Food Sci. 35:58–62.

López-González, M. J., Escobedo, S., Rodríguez, A., Neves, A. R., Janzen, T., Martínez, B. (2018). Adaptive Evolution of industrial *Lactococcus lactis* under cell envelope stress provides phenotypic diversity. Front. Microbiol. 9:2654. <https://doi:10.3389/fmicb.2018.02654>.

Macaluso, G., Fiorenza, G., Gaglio, R., Mancuso, I., Scatassa, M. L. (2016). In vitro evaluation of bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated during traditional Sicilian cheese making. Ital. J. Food Saf. 5(1). <https://doi:10.4081/ijfs.2016.5503>.

Madi, N., Boushaba, R. (2017). Identification of potential biopreservative lactic acid bacteria strains isolated from algerian cow's milk and demonstration of antagonism against *S. aureus* in cheese. Food Sci. Technol. Res. 23(5), 679–688. <https://doi:10.3136/fstr.23.679>.

Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., Teixeira, P. (2014). Bactéria: *Listeria monocytogenes*, in: Motarjemi Y. (ed.), Encyclopedia of Food Safety, Waltham: Academic Press, pp. 450-461.

Mariam, S.H., Zegeye, N., Aseffa, A., Howe, R. (2017). Diffusible substances from lactic acid bacterial cultures exert strong inhibitory effects on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar enteritidis in a co-culture model. BMC Microbiol. 17(35): 1-11. <https://doi:10.1186/s12866-017-0944-3>.

Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sorensen, S. J., Jakobsen, M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. Int. J. Food Microbiol. 153(1-2), 192–202. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.014>.

Mclauchlin, J., Rees, C. E. D. (2009). Genus I. *Listeria*, in: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D. *et al.* (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second ed., Springer, Dordrecht Heidelberg, New York, v.3, pp. 244 – 256.

Mclauchlin, J.; Mitchell, R. T.; Smerdon, W. J. *et al.* (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. Int. J. Food Microbiol. 92(1): 15-33. [https://doi:10.1016/S0168-1605\(03\)00326-X](https://doi:10.1016/S0168-1605(03)00326-X).

Mead, G. C. (2000). Prospects for “Competitive Exclusion” Treatment to Control Salmonellas and Other Foodborne Pathogens in Poultry. Vet. J. 159(2), 111–123. <https://doi:10.1053/tvj.1999.0423>.

Mehmood, H., Marwat, A.D.J.K., Khan, N.A.J. (2017). Invasive *Listeria monocytogenes* gastroenteritis leading to stupor, bacteremia, fever, and diarrhea: a rare life-threatening condition. J. Investig. Med. High Impact Case Rep. 1 –3. <https://doi.org/10.1177/2324709617707978>.

Melo, T.A., Santos, T.F., Almeida, M.E., Junior, L.A.G.F., Andrade, E.F., Rezende, R.P., Marques, L.M., Romano, C.C. (2016). Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by Lactobacillus isolated from fine cocoa. BMC Microbiol. 16(1). <https://doi:10.1186/s12866-016-0871-8>.

Mokoena, M.P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. Molecules. 22(8): 1-13. <https://doi:10.3390/molecules22081255>.

Mota, R.A., Medeiros, E.S., Santos, M.V., Pinheiro Júnior, J.W., Moura, A.P.B., Coutinho, L.C.A. (2012). Participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no Estado de Pernambuco (Brasil). Ciênc. Anim. Bras. 13(1):124-130. <https://dx.doi.org/10.5216/cab.v13i1.3790>.

Myllyluoma, E.; Ahonen, A.M.; Korpela, R.; Vapaatalo, H.; Kankuri E. (2008). Effects of multispecies probiotic combination on *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. Clin Vaccine Immunol. 15(9):1472-82. <https://doi:10.1128/CVI.00080-08>.

Neopane, P., Nepal, H. P., Shrestha, R., Uehara, O., Abiko, Y. (2018). In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-

admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *Int. J. Gen. Med.* 11, 25–32. <https://doi:10.2147/ijgm.s153268>.

Nero, L. A., Mattos, M. R., Beloti, V., Barros, M. A. F., Ortolani, M. B. T., & Franco, B. D. G. M. (2009). Autochthonous microbiota of raw milk with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *J. Food Saf.* 29(2), 261–270. <https://doi:10.1111/j.1745-4565.2009.00155.x>.

Nero, L.A., Da Cruz, A.G., Bersot, L.S. (2017). *Produção, Processamento e Fiscalização de Leite e Derivados*, first ed. Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte.

O'sullivan, D.J., Lee, J-H., Dominguez, W. (2010). Lactic Acid Bacteria: Genomics, Genetic Engineering. *Ency. Dairy Sci.* 67-77. <https://doi:10.1016/b978-0-12-374407-4.00514-8>.

Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Shahbaz, H. M., Al-Nabulsi, A. A., Abu Ghoush, M. H., Osaili, T. M., Ayyash, M.M., Holley, R. A. (2018). Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17(5), 1277-1292. <http://doi:10.1111/1541-4337.12387>.

Oldak, A., Zielińska, D. (2017). Bacteriocins from lactic acid bacteria as an alternative to antibiotics. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 71: 328-338. <https://doi:10.5604/01.3001.0010.3817>.

Oliveira, M.N. (2009). *Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais*. Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto.

Oliver, S. P., Jayarao, B. M., Almeida, R. A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.* 2(2), 115–129. <https://doi:10.1089/fpd.2005.2.115>.

Oscáriz, J.C., Pisabarro, A.G. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology.* 4:13-9. <https://doi.org/10.1007/s101230100003>.

Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50(3): 512–542. <https://doi:10.1590/s1516-89132007000300018>.

Park, J.S., Shin, E., Hong, H., Shin, H.J., Cho, Y.H., Ahn, K.H., Paek, K., Lee, Y. (2015). Characterization of *Lactobacillus fermentum* PL9988 Isolated from Healthy Elderly Korean in a Longevity Village. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(9):1510-8. <https://doi:10.4014/jmb.1505.05015>.

Pereira, G. V. M., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of

methods and criteria. *Biotechnol. Adv.* 36, 2060–2076  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>

Perin, L.M., Pereira, J.G., Bersot, L.S., Nero, L.A. (2019). The Microbiology of Raw Milk, in: Nero, L.A., De Carvalho, A.F. (Eds.), *Raw milk: Balance between hazards and benefits*, first ed., San Diego: Elsevier, pp. 45-64.

Peton, V., Le Loir, Y. (2014). *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infection. Infect. Genet. Evol.* 21, 602–615.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.011>.

Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Gil-Campos, M., Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv. Nutr.* 10: 49–66.  
<https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>.

Quigley, L., O'sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol* 150:81 –94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, P.R., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Reviews.* 37(5): 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.

Rahmeh, R., Akbar, A., Kishk, M., Al-Onaizi, T., Al-Azmi, A., Al-Shatti, A. Shajan, S. Al-Mutairi, Akbar, B. (2019). Distribution and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from raw camel milk. *New Microbes New Infect.* 100560.  
<https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100560>.

Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol.* 36(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.010>.

Reichhardt, C., Lim, J. Y., Rice, D., Fong, J. N., & Cegelski, L. (2014). Structure and Function of Bacterial Biofilms by Solid-State NMR. *Biophys. J.* 106(2), 192a. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.1139>.

Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng. Rev.*, 4(2), 124–140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>.

Riaz, A., Noureen, S., Liqat, I., Arshad, M., Arshad, N. (2019). Antilisterial efficacy of *Lactobacillus brevis* MF179529 from cow: an in vivo evidence. *BMC Complement. Altern. Med.* 19(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2444-5>.

Riley, M.A., Chavan, M.A. (2007). *Bacteriocins Ecology and Evolution*. Springer Berlin Heidelberg, New York.



Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J. L., Rodríguez, J. M., Nuñez, M., Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.* 15(1), 51–57. <https://doi:10.1016/j.idairyj.2004.05.004>.

Samelis, S., Kakouri, A. (2018). Hurdle factors minimizing growth of *Listeria monocytogenes* while counteracting in situ antilisterial effects of a novel nisin A-producing *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* co-starter in thermized cheese milks. *AIMS Microbiol.* 4(1): 19-47. <https://doi:10.3934/microbial.2018.1.19>.

Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I.H.N., Traore, A.S. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria: a minireview. *Afr. J. Biotechnol, Lagos* 5: 678-683.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *J. Emerg. Infect. Dis.* 17(1), 7–15. <https://doi:10.3201/eid1701.p11101>.

Scatassa, M. L., Gaglio, R., Cardamone, C., Macaluso, G., Arcuri, L., Todaro, M., Mancuso, I. (2017). Anti-*Listeria* Activity of Lactic Acid Bacteria in Two Traditional Sicilian Cheeses. *Ital. J. Food Saf.* 6(1), 6191. <https://doi:10.4081/ijfs.2017.6191>.

Schleifer K.H., Bell J.A. (2009). Family VIII. Staphylococcaceae, in: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D. *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed., v.3, pp. 244 – 256.

Siddiqui, A.H., Koirala, J. (2018). Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA). StatPearls Publishing LLC: Treasure Island, FL, USA.

Singh, Om V. (2017). Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance. John Wiley & Sons, New Jersey.

Siroli, L., Camprini, L., Pisano, M. B., Patrignani, F., Lanciotti, R. (2019). Volatile Molecule Profiles and Anti-*Listeria monocytogenes* Activity of Nisin Producers *Lactococcus lactis* Strains in Vegetable Drinks. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi:10.3389/fmicb.2019.00563>.

Soleimani, N.A., Kermanshahi, R.K., Yakhchali, B., Sattari, T.N. (2010). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastites. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(20): 2169-2173.

Song, A. A.-L., In, L. L. A., Lim, S. H. E., Rahim, R. A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb. Cell Fact.* 16(1). <https://doi:10.1186/s12934-017-0669-x>.

Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infect.* 9 (10), 1236–1243. <https://doi:10.1016/j.micinf.2007.05.011>.

- Tan, S., Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singap. Med. J.* 56(07), 366–367. <https://doi:10.11622/smedj.2015105>.
- Tetili, F., Bendali, F., Perrier, J., Sadoun, D. (2017). Anti-Staphylococcal enterotoxinogenesis of *Lactococcus lactis* in Algerian raw milk cheese. *Food Technol. Biotechnol.* 55(4). <https://doi:10.17113/ftb.55.04.17.5105>.
- Toualbia, M., Bouras, A.E.D., Bouras, M.K., Kerkoud, M. (2018). Isolation, Identification and Characterization of *Lactobacillus Plantarum* from camel milk and its antagonist effect against diarrheal bacteria. *Emir. J. Food Agric.* 30(4):283-287. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i4.1663>.
- Trabulsi, L.R., Alterthum, F. (2015). *Microbiologia*. 6 ed, Atheneu, São Paulo.
- Vasconcellos, S. A.; Ito, F. H. (2011). Principais zoonoses transmitidas pelo leite. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, 9(1) 32–37.
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, L., Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Front. Microbiol.* 10 (57): 1-17. <https://doi:10.3389/fmicb.2019.00057>.
- Vimont, A., Fernandez, B., Hammami, R., Ababsa, A., Daba, H., Fliss, I. (2017). Bacteriocin-Producing *Enterococcus faecium* LCW 44: A High Potential Probiotic Candidate from Raw Camel Milk. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi:10.3389/fmicb.2017.00865>.
- Vu, J., Carvalho, J. (2011). Enterococcus: Review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Front. Biol.* 6. 357-366. <https://10.1007/s11515-011-1167-x>.
- Wang, X., Haruta, S., Wang, P., Ishii, M., Igarashi, Y., Cui, Z. (2006). Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57(1), 106–115. <https://doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00099.x>.
- Watts, S. (2016). A mini review on technique of milk pasteurization. *J. Pharmacogn Phytochem.* 5(5): 99-101
- WHO. (2007). Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases: First formal meeting of the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG). Geneva, Switzerland.
- WHO. (2015). Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva, Switzerland.
- Widyastuti, Y., Rohmatussolihati, Febrisiantosa, A. (2014). The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food Sci. Nutr.* 5:435-442. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2014.54051>.

Wilson, A. R., Sigeo, D., Epton, H. A. S. (2005). Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 99(6), 1516–1522. <https://doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02725>.

Zacharof, M.P., Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria: A Review Article. *APCBEE Procedia*, Elsevier. 2, 50–56. <https://doi:10.1016/j.apcbee.2012.06.010>.

Zahid, M., Ashraf, M., Arshad, M., Muhammad, G., Yasmin, A., Hameed, A.M. (2015). Antimicrobial activity of bacteriocins isolated from lactic acid bacteria against resistant pathogenic strains. *Int. J. Food Sci. Nutr* 4(3): 326-331. <https://doi:10.11648/j.ijnfs.20150403.20>.