REVISTA
DO INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES
v. 77, n. 1, jan-mar 2022

Artigo DOI: 10.14295/2238-6416.v77i1.884

AVALIAÇÃO DE ASPECTOS FENOTÍPICOS DE SEGURANÇA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS ARTESANAIS DO TIPO COLONIAL DO SUL DO BRASIL

Evaluation of phenotypical safety aspects of lactic acid bacteria isolated from artisanal Colonial-type cheese from the south of Brazil

Carlos Henrique Gomes de Sousa Lima[1], Nádia Carbonera[2], Elizabete Helbig[1]*

RESUMO

Esse estudo teve como objetivo isolar e avaliar bactérias ácido-lácticas (BAL) de queijos Coloniais artesanais comercializados em feiras livres de Pelotas, RS, quanto aos aspectos fenotípicos de segurança. Foram selecionados 105 isolados, 73 foram caracterizadas como Gram-positivas e catalase negativas e avaliadas quanto a aspectos fenotípicos de virulência. Todas as estirpes foram gelatinase e DNase negativas. Quanto a atividade hemolítica, houve detecção de sete estirpes como α e dois como β-hemolítica, resultado em 64 isolados de BAL para avaliação de susceptibilidade a antimicrobianos. Esses isolados apresentaram sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina. Para os outros antimicrobianos, apresentaram resistência a ciprofloxacina (93,5%, 58/64), oxacilina 98,4% (63/64), penicilina G 51,6% (41/64) e vancomicina (85,9%, 54/64). Baseado nesses resultados, os isolados apresentaram-se potencialmente seguros, achados que visam contribuir na busca de novas cepas benéficas para a indústria láctea.

Palavras-chave: produtos lácteos, isolamento, segurança.

---

1 Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Nutrição. Rua Gomes Carneiro, n. 01, Porto, 96010-610, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: carloshgsl@hotmail.com

2 Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Capão do Leão, RS, Brasil.

*Autor para correspondência

Recebido / Received: 09/09/2021
Aprovado / Approved: 30/12/2021

ABSTRACT

This study aimed to isolate and evaluate lactic acid bacteria (LAB) from artisanal Colonial-type cheeses commercialized in open markets in Pelotas, RS, in terms of phenotypic safety aspects. Around 105 strains were isolated, 73 were characterized as Gram-positive and catalase-negative, and evaluated for phenotypic aspects of virulence. All strains were gelatinase and DNase negative. Regarding hemolytic activity, there was the detection of seven strains as α and two as β-hemolytic, resulting in 64 strains of LAB for antimicrobial susceptibility assessment. These isolates were sensitive to chloramphenicol and tetracycline antibiotics. For the other antimicrobials, they showed resistance to ciprofloxacin (93.5%, 58/64), oxacillin 98.4% (63/64), penicillin G 51.6% (41/64), and vancomycin (85.9%, 54/64). Based on these results, the isolates were potentially safe, a conclusion that contributes to the search for new beneficial strains for the dairy industry.

Keywords: dairy products, isolation, safety.

INTRODUÇÃO

O uso de micro-organismos na conservação de alimentos tem ganhado importância nos últimos anos, devido à demanda pelo uso reduzido de conservantes químicos pelos consumidores e pelo aumento crescente de espécies bacterianas resistentes a antibióticos e a conservantes. Dentre estes, destacam-se as bactérias ácido-lácticas (BAL), capazes de produzirem vários compostos antimicrobianos que são considerados importantes na biopreservação dos alimentos, mas também são rentáveis e seguros. As BAL podem ser definidas como um grupo de cocos e bastonetes Gram-positivos, catalase negativos, não esporulados, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos que produzem ácido-láctico como o principal produto durante a fermentação de carboidratos (FOX *et al.*, 2017).

Embora muitas BAL sejam Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS) para a produção de alimentos, existem algumas que podem possuir um caráter patogênico, capazes de produzir enzimas responsáveis por causar doenças infecciosas em humanos, como bacteremia e endocardite, e por disseminar genes de resistência a antibióticos (CHEN *et al.*, 2019). A habilidade de algumas espécies de *Enterococcus* em causarem doenças pode ser promovida pela produção de fatores de virulência capazes de danificarem os tecidos, como a citolisina e a gelatinase. Os *Enterococcus* também são os maiores responsáveis por infecções hospitalares, por apresentarem resistência intrínseca e adquirida a diversos antibióticos (BIRRI *et al*., 2013).

Assim, testes de segurança são importantes para que novas cepas possam ser utilizadas para consumo humano, através dos quais especificações como origem, ausência de atividades nocivas e de resistência aos antibióticos adquiridos são necessárias no sistema de seleção, sendo as pesquisas *in vitro* a primeira etapa da triagem (FAO; WHO, 2002). A avaliação de patogenicidade por meio de testes fenotípicos é uma alternativa complementar aos testes genotípicos e de baixo custo, entre elas a detecção de determinadas enzimas capazes de causar patogenicidade, como as gelatinases, desoxirribonucleases bacterianas (DNases) e hemolisinas (BIRRI *et al.*, 2013).

Entre os diversos *habitats* dessas bactérias, destacam-se os alimentos lácteos fermentados, entre eles os queijos artesanais, principalmente aqueles elaborados a partir de leite cru. Entende-se por queijo artesanal, o que possui algum grau de processamento realizado nas propriedades rurais, geralmente de produção familiar, através de um processo artesanal de produção, sendo geralmente comercializados em feiras de produção agroecológica. Entre estes destaca-se o queijo Colonial artesanal produzido na região sul do Brasil, produzido a partir de uma cultura natural de soro de leite como coagulante (CARVALHO *et al*., 2019).

O desenvolvimento de pesquisas envolvendo queijos produzidos artesanalmente buscam ampliar o conhecimento acerca da avaliação de sua microbiota nativa e verificação das propriedades microbiológicas e probióticas dos micro-organismos, possibilitando novas perspectivas para a melhoria da qualidade do queijo e da sua segurança alimentar, preservando suas características organolépticas (MOZZI *et al.,* 2010). O objetivo do estudo foi selecionar e avaliar BAL isoladas de queijos Coloniais artesanais comercializados em feiras livres do município de Pelotas, RS, quanto a aspectos fenotípicos de segurança.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Para o desenvolvimento deste estudo, as matérias-primas utilizadas foram os queijos Coloniais artesanais, comercializados em cinco feiras de produção agroecológica localizadas em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Em cada feira, foram coletadas duas amostras aleatórias, em meses alternados, sendo utilizadas apenas as que foram produzidas com leite cru, sendo essa informação solicitada diretamente ao estabelecimento comercial. Os produtos foram adquiridos em temperatura ambiente e após a aquisição, as amostras foram acondicionadas em embalagens estéreis de polietileno e transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil, seguindo as normas do Compêndio de Métodos para o Exame Microbiológico de Alimentos (DOWNES; ITO, 2001). Os queijos foram mantidos em refrigeração (± 5 °C) e processados em até 12 horas após a aquisição.

Isolamento e caracterização morfológica

A metodologia utilizada foi preconizada por Perin *et al.* (2014) para isolamento e caracterização morfológica de BAL em queijos. Foram coletadas exatamente 25 g das porções centrais das amostras e transferidos assepticamente para sacos plásticos estéreis específicos para coleta de amostra, com 225 mL de um meio composto por 1% de água tamponada (Sigma-Aldrigh, Estados Unidos), diluição esta correspondendo a 10^{-1}. A bolsa foi homogeneizada (Stomacher 400 Circulator, Seward Laboratory Systems, Inglaterra) por três minutos. Alíquotas de 1 mL de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v), correspondendo a 10^{-2} e diluições seriadas de até 10^{-9} foram realizadas. As soluções foram semeadas pela técnica de inoculação em profundidade em meio de crescimento *Man Rogosa and Sharp* (MRS) (CM0361/OXOID), e incubadas em placas de Petri a 37 °C por 48 h. As condições de incubação foram realizadas sob anaerobiose utilizando frascos específicos (JA0401, Permution, Brasil).

Após o crescimento no meio seletivo, as melhores colônias foram selecionadas, preferencialmente as maiores, lisas e com bordas definidas, a seguir foram cultivadas em placas de Petri com MRS ágar a 37 °C por 48 h e avaliadas quanto à coloração de Gram e teste de catalase (H_2O_2, 3% v/v), aquelas que não cresceram no recultivo foram descartadas. Isolados Gram-positivos, cocóides ou bacilares e catalase negativos, foram submetidos a testes de segurança *in vitro*, como capacidade hemolítica, produção de gelatinase e DNase e resistência a antibióticos.

Avaliação de segurança

Capacidade hemolítica

A atividade hemolítica foi executada adaptando-se a metodologia descrita por Baumgartner *et al.* (1998). Para isso, os isolados foram estriados em MRS ágar suplementado com 5,0% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado (New Prov, Brasil). Os resultados foram avaliados após incubação a 37 °C por 48 h, em condição de anaerobiose. A reação hemolítica foi verificada por meio da formação de zonas claras ao redor da colônia, como β-hemólise. A formação de pigmento verde ao redor da cepa indicou α-hemólise, enquanto a ausência da reação foi indicativa de γ- hemólise. A cepa *Escherichia coli* ATCC 43895 foi utilizada como controle positivo.

Atividade de gelatinase

A atividade da enzima gelatinase foi avaliada nos isolados selecionados conforme metodologia sugerida por Su *et al.* (1991), utilizando-se o MRS ágar suplementado com 3% de gelatina (Sigma-Aldrich). O resultado foi avaliado após incubação dos isolados a 37 °C por 48 h sob anaerobiose. A produção da enzima foi verificada por meio da formação de um halo ao redor da estria após adição de cerca de 0,3 mL da solução de Frazier (cloreto de mercúrio, 15,0 g; ácido clorídrico concentrado, 20 mL; e água destilada, 100 mL) por placa para confirmação da hidrólise da gelatina. Como controle positivo utilizou-se *Escherichia coli* ATCC 43895.

Atividade da enzima DNase

A produção da enzima DNase foi determinada inoculando 1 µL dos isolados, previamente ativados em caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) à 37 °C por 24 h para o ágar teste de DNase (Acumedia, EUA) com azul de toluidina 0,1%. O aparecimento de halos rosa ao redor dos isolados, após a adição de solução de ácido clorídrico 1 N (Labsynth, Diadema, Brasil), apresentou resultado positivo para a produção da enzima (PERIN *et al.*, 2014). Para controle positivo foi empregada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Resistência a antibióticos

Para a verificação da susceptibilidade a antimicrobianos, seis antibióticos foram utilizados cloranfenicol (30 µg), oxacilina (1 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e penicilina G (UI), segundo as recomendações do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais e Laboratoriais (CLSI, 2012). Após o cultivo, os isolados foram inoculados em 4 mL de água destilada estéril para obter o padrão de turvação de McFarland 0,5 (Probac, Brasil) (10^8 UFC/mL) em espectrofotômetro a 580 nm (SP Labor, Brasil). Em seguida, *swabs* estéreis foram utilizados para espalhar o inócuo por toda extensão de placas contendo MRS ágar (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para, em seguida, discos de antimicrobianos serem adicionados. A susceptibilidade antimicrobiana foi realizada em duplicata e avaliada por meio da mensuração dos halos de inibição de crescimento bacteriano, após incubação, durante 37 °C por 24-48 h, conforme critérios propostos por Charteris *et al.* (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e caracterização morfológica

Foram selecionadas 132 colônias bem definidas a partir da diluição 10^{-7}, porém, 17 não apresentaram crescimento na replicação em meio ágar MRS seletivo, o que totalizou em 105 isolados. Desses, 78 (74,3%) foram considerados Gram-positivos e entre estes, 73 (69,5%) como BAL por prova de ausência de catalase e evidência morfológica (Tabela 1). Cerca de 50,3% (37/73) foram classificados morfologicamente como bacilos e os outros 49,3% (36/73) como cocos. O sistema de classificação a nível de gênero divide as BAL, conforme a morfologia, em bastonetes (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e cocos (todos os outros gêneros) (LAHTINEN *et al.*, 2011). Hermanns *et al.* (2013) isolaram 112 colônias características de BAL de queijo Colonial artesanal produzido em Pelotas/RS, e constataram que 54,46% foram positivas para coloração de Gram e negativas para catalase; 29,46% estavam na forma de cocos e 25,89% eram bastonetes.

Nos queijos artesanais de leite cru, a microbiota nativa, responsável pela fermentação e maturação típicas da região produtora, é um fator desencadeante das características organolépticas inatas desses produtos (CARVALHO *et al.*, 2019). Há carência de estudos na literatura sobre a caracterização da microbiota láctica específica dos queijos Coloniais artesanais brasileiros.

Avaliação de segurança

Perfil de expressão de virulência fenotípica

Os dados revelam que nenhuma das 73 cepas de BAL apresentaram atividade positiva para DNases e gelatinase. Em relação à atividade hemolítica, 9,6% (7/73) apresentaram-se como α-hemolítica, ou seja, produziram hemólise parcialmente,

Tabela 1 – Caracterização morfológica e bioquímica de bactérias isoladas de queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS (n = 105)*

Queijo	Isolados	Gram		Morfologia		Catalase	
		Positiva	Negativa	Cocos	Bastonetes	Positiva	Negativa
Q1	8	7	1	6	2	-	7
Q2	12	12	-	2	10	1	11
Q3	10	8	2	8	2	4	4
Q4	10	7	3	3	7	-	7
Q5	8	4	4	1	7	-	4
Q6	10	8	2	10	-	-	8
Q7	10	7	3	9	1	-	7
Q8	15	9	6	15	-	-	9
Q9	9	5	4	5	4	-	5
Q10	13	11	2	7	6	-	11
Total	**105**	**78**	**27**	**66**	**39**	**5**	**73**

*n= número de isolados avaliados.

Tabela 2 – Testes de segurança e fatores fenotípicos de virulência de BAL isoladas de queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS (n = 73)

Queijo	Cepas	Gelatinase		DNase		Hemólise		
		Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	β	α	ɣ
Q1	7	-	7	-	7	-	-	7
Q2	11	-	11	-	11	-	2	9
Q3	4	-	4	-	4	-	-	4
Q4	7	-	7	-	7	-	1	6
Q5	4	-	4	-	5	-	1	3
Q6	8	-	8	-	8	-	1	7
Q7	7	-	7	-	7	-	2	5
Q8	9	-	9	-	9	-	-	9
Q9	5	-	5	-	5	1	-	4
Q10	11	-	11	-	11	1	-	10
Total	**73**	**-**	**73**	**-**	**73**	**2**	**7**	**64**

*n= número de cepas avaliadas; β: hemólise total; α: hemólise parcial; ɣ: ausência de hemólise.

enquanto 2,8% (2/73) como β-hemolítica, resultando em 64 BAL adequadas para avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos, conforme Tabela 2.

As desoxirribonucleases bacterianas (DNases) são enzimas capazes de hidrolisar ácidos nucléicos para produzir oligonucleotídeos, como fatores de virulência, que podem estar envolvidas no crescimento de micro-organismos, permitindo a degradação do DNA extracelular em uma fonte acessível de carbono, nitrogênio e fosfato (MULCAHY *et al*., 2010), bem como na resistência de bactérias contra a atividade antimicrobiana mediada por neutrófilos (BERENDS *et al*., 2010).

Em um estudo de Ferrari *et al*. (2016), todas as 60 cepas isoladas de derivados do leite de cabra não apresentaram atividade enzimática para DNase. Pino *et al*. (2019) caracterizaram o perfil de segurança de 113 isolados de Piacentinu Ennese de

Denominação de Origem Protegida (DOP) e nenhuma das cepas testou positivo para DNase, gelatinase e hemólise.

As metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de proteinases, que inclui as gelatinases, afetam a ruptura e o *turnover* da matriz extracelular, implicada na destruição do tecido em várias condições fisiopatológicas (THRAILKILL *et al*., 2009). De acordo com Thurlow *et al.* (2010), esta proteinase está envolvida em infecções enterocócicas, contribuindo para a produção de biofilme, bem como a degradação de importantes peptídeos imunes. Os resultados encontrados neste trabalho estão em desacordo com os obtidos por Domingos-Lopes *et al.* (2017), que detectaram a presença fenotípica para produção de gelatinase em 47% de 114 cepas de BAL isoladas de queijo Pico artesanal.

A atividade hemolítica consegue romper a camada epitelial, facilitando a atuação da gelatinase, capaz de lesar o revestimento mucoide, interferir no funcionamento normal desses tecidos e favorecer o surgimento de processos infecciosos (EFSA, 2008). Os resultados são consistentes com aqueles encontrados por outros autores ao isolar BAL de matrizes lácticas (COLOMBO *et al.,* 2020; SHI *et al*., 2019).

Resistência a antibióticos

Com base na abordagem fenotípica, indicou-se que todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina (Tabela 3). Para os outros antimicrobianos, eles apresentaram resistência intrínseca, como parte das características naturais fenotípicas dos micro-organismos, à oxacilina 98,4% (63/64) ciprofloxacina (93,5%, 58/64), vancomicina (85,9%, 54/64) e Penicilina G 51,6% (41/64).

Atualmente, não existe o uso Indiscriminado de antibióticos na ração animal e sua aplicação em humanos também é proibida (GONZALES *et al*., 2012). Desde 2003, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) proibiu o uso de cloranfenicol para animais de fazenda devido ao potencial de resíduos tóxicos presentes em produtos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2003).

Em um estudo de Pino *et al*. (2019) com a população de *Lactobacillus* do queijo Piacentinu Ennese, todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina, o que para os autores pode ser indicativo da ausência de AGP na área geográfica onde o queijo é produzido. A sensibilidade a esses antimicrobianos também foi encontrada por Ruiz-Moyano *et al*. (2019).

Algumas BAL, como os Lactobacillus demonstram uma alta resistência natural a muitos antimicrobianos, como fluoroquinolonas, incluindo ciprofloxacina, devido à sua capacidade de atuar como reservatórios de genes de aversão a antibióticos que pode estar associada à presença de bombas de efluxo do tipo NorA (PETRONIO, 2013).

A oxacilina não está relacionada à transferência por conjugação de plasmídeo, sendo que a literatura relata as BAL como capazes de codificar resistência intrinsecamente à oxacilina. Para Teuber *et al.* (1999), isso ocorre porque as taxas de resistência à oxacilina são maiores que as da penicilina. Esse mecanismo referente aos β-lactâmicos pode ser explicado pela possível impermeabilidade da parede celular bacteriana ou pela produção e ação da β-lactamase (penicilinase), capaz de hidrolisar o antibiótico (CHARTERIS *et al*., 1998).

Os gêneros *Lactobacilli*, *Pediococci* e *Leuconostoc* spp. são relatados como tendo uma propriedade única de resistência natural à vancomicina, ao contrário de outras bactérias Gram-positivas (GAD *et al.*, 2014). Esta capacidade pode ser explicada pela composição de d-alanil-d-lactato no peptidioglicano das BAL, em vez do dipeptídeo d-alanil-d-alanina (d-Ala-d-Ala), o alvo da vancomicina, resultando em tolerância ao antibiótico (ZHANG *et al*., 2018).

A ausência de atividade hemolítica, gelatinase e DNase e o não carregamento de genes de resistência a antibióticos são critérios de seleção de potenciais candidatos a probióticos, contribuindo para a aplicabilidade de novas cepas funcionais em laticínios. As BAL são consideradas as principais produtoras de aminas biogênicas, compostos que derivam da descarboxilação de aminoácidos por meio do metabolismo microbiano e podem causar

efeitos tóxicos no organismo, o que acarreta a importância de sua avaliação (BARBIERI *et al.*, 2019). Outros testes de abordagens genotípicas, verificação de segurança em modelos animais e humanos ainda são necessários para que novas cepas possam chegar ao mercado (FAO; WHO, 2002).

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das BAL isoladas de queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS (n=64)*

ATB		Amostras										
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	T
CLO	S	7	9	4	6	3	7	5	9	4	10	64
	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OXA	S	-	-	-	-	-	2	-	-	1	1	4
	MS	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	2
	R	7	9	4	6	3	4	5	8	3	9	58
VAN	S	-	-	-	-	-	6	-	-	1	3	10
	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	7	9	4	6	3	1	5	9	3	7	54
TET	S	7	9	4	6	3	7	5	9	4	10	64
	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEN	S	3	3		1		4	4	2	1	5	23
	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	4	6	4	5	3	3	1	7	3	5	41
CIP	S	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	7	9	4	6	3	7	5	9	3	10	63

*ATB = antibiótico, CLO (cloranfenicol - 30 µg), OXA (oxacilina - 1 µg), VAN (vancomicina - 30 µg), TET (tetraciclina - 30 µg), PEN (penicilina G – UI), CIP (ciprofloxacina - 5 µg) e T = total. R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível.

CONCLUSÃO

O presente estudo destacou que os queijos Coloniais são fontes prósperas de BAL potencialmente seguras. De 105 isolados, 73 foram caracterizados como Gram-positivos e catalase negativos e avaliados quanto a aspectos fenotípicos de virulência. Todas as estirpes foram gelatinase e DNase negativas, e quanto a atividade hemolítica, houve detecção de sete cepas como α e duas como β-hemolítica, resultado em 64 cepas de BAL para avaliação de susceptibilidade a antimicrobianos. Esses isolados apresentaram sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina, e resistência intrínseca à oxacilina, ciprofloxacina, vancomicina e penicilina G. Estudos genotípicos, e *in vivo* como parte de estudos pré-clínicos, serão necessários nas etapas subsequentes para garantir a segurança dos isolados e futura aplicabilidade na biopreservação de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financiador 001.

REFERÊNCIAS

BARBIERI, F. *et al*. Biogenic amine production by lactic acid bacteria: a review. **Foods**, v. 8, n. 1, p. 17, 2019. DOI: 10.3390/foods8010017

BAUMGARTNER, A. *et al*. Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from clinical specimens and such from foodstuffs, humans and technology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 31, n. 5, p. 489-494, 1998. DOI: 10.1006/fstl.1998.0395

BERENDS, E. T. M *et al.* Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 6, p. 576-586, 2010. DOI: 10.1159/000319909

BIRRI, D. J. *et al*. Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy Etiopian infants. **Microbial Ecology,** v. 65, n. 2, p. 504-516, 2013. DOI: 10.1007/s00248-012-0134-7

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 250, p. 8, 24 dez. 2003.

CARVALHO, M. M. *et al*. Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: a case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 9711-9720, 2019. DOI: 10.3168/jds.2019-16373

CHARTERIS, W. P. *et al.* Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.00407.x

CHEN, W., YU, L., SHI, Y. Safety evaluation of lactic acid bacteria. *In*: CHEN, W. **Lactic Acid Bacteria**. Singapore: Springer, 2019. p. 371-409

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 11. ed., Document M02-A11. Wayne: CLSI, 2012.

COLOMBO, M.; NERO, L. A.; TODOROV, S. D. Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 787-795, 2020. DOI: 10.1007/s42770-020-00227-y

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. DOI: 10.1016/j.fm.2016.11.014

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed., Washington: APHA. 2001. 676 p.

EFSA – European Food Safety Authority. Technical guidance - Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 6, n. 7, p. 732, 2008. DOI: 10.2903/j.efsa.2008.732

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations; WHO – World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Londres, Ontário, 2002.

FERRARI, I. S. *et al.* Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. **Food Microbiology,** v. 60, p. 29-38, 2016. DOI: 10.1016/j.fm.2016.06.014

FOX, P. F. *et al*. **Fundamentals of Cheese Science.** Boston: Springer, 2017, 799 p.

GAD, G. F. M. ABDEL-HAMID, A. M.; FARAG, Z. S. H. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 25-33, 2014. DOI: 10.1590/S1517-83822014000100005

GONZALES, E. *et al.* Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, v. 13, n. 13, 2012.

HERMANNS, G. *et al*. Isolamento e identificação de bactérias láticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 11, n. 2, p. 191-196, 2013. DOI: 10.7213/academica.11.002.AO10

LAHTINEN, S. *et al.* **Lactic Acid Bacteria**: microbiological and functional aspects. 4. ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 2011.

MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria**, Pondicherry, India: John Wiley & Sons, 2015. p. 25-31.

MULCAHY, H; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1621-1629, 2010. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02208.x

PERIN, L. M. *et al.* Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic *lactococci* and *enterococci* isolated from goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, n. 18, p. 121-126, 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.001

PETRONIO, G. P. **Study of fluoroquinolone resistance in *Lactobacillus* spp**. 2013. 205 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade de Catânia, Catânia, Itália. 2013.

PINO, A. *et al.* Piacentinu Ennese PDO Cheese as reservoir of promising probiotic bacteria. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, p. 254, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7080254

RUIZ-MOYANO, S. *et al*. Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: Probiotic characteristics and prebiotic metabolism. **LWT - Food Science and Technology**, v. 114, e108388, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.12.005

SHI, Y. *et al*. Antioxidative and probiotic activities of lactic acid bacteria isolated from traditional artisanal milk cheese from Northeast China. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 4, p. 1086-1099, 2019. DOI: 10.1007/s12602-018-9452-5

SU, Y. A. *et al.* Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens.* **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 415-420, 1991. DOI: 10.1128/IAI.59.1.415-420.1991

TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *In*: KONINGS, W. N.; KUIPERS, O. P.; IN 'T VELD, J. H. J. H. (eds). **Lactic Acid Bacteria:** genetics, metabolism and applications, v. 76, p. 115-137, 1999.

THRAILKILL, K. M; BUNN, R. C.; FOWLKES, J. L. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Endocrine**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2009. DOI: 10.1007/s12020-008-9114-6

THURLOW, L. R. *et al*. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4936-4943, 2010. DOI: 10.1128/IAI.01118-09

ZHANG, S. *et al*. d-Alanyl-d-alanine ligase as a broad-host-range counter selection marker in vancomycin-resistant lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 13, p. e00607-17, 2018. DOI: 10.1128/JB.00607-17