

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

Bruna Vieira Alonso

**Potencial do leite orgânico como fonte de bactérias ácido-láticas produtoras
de moléculas bioativas aplicáveis à cadeia produtiva do leite**

Juiz de Fora
2025

Bruna Vieira Alonso

**Potencial do leite orgânico como fonte de bactérias ácido-láticas produtoras
de moléculas bioativas aplicáveis à cadeia produtiva do leite**

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Ribeiro

Coorientadora: Profa. Dra. Vanessa Aglaê Martins Teodoro

Juiz de Fora

2025

Bruna Vieira Alonso

**Potencial do leite orgânico como fonte de bactérias ácido-láticas produtoras
de moléculas bioativas aplicáveis à cadeia produtiva do leite**

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

Aprovada em 24 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Ribeiro – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Vanessa Aglaê Martins Teodoro – Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

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

Profa. Dra. Aline Dias Paiva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profa. Dra. Karina Neoob de Carvalho Castro
Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, 17/07/2025.



Documento assinado eletronicamente por João Batista Ribeiro, Usuário Externo, em 25/07/2025, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Vanessa Aglaê Martins Teodoro, Professor(a), em 25/07/2025, às 19:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Humberto Moreira Hungaro, Coordenador(a), em 28/07/2025, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Karina Neoob de Carvalho Castro, Usuário Externo, em 28/07/2025, às 18:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Aline Dias paiva, Usuário Externo, em 07/08/2025, às 23:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 2504493 e o código CRC 42EF2133.

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

Alonso, Bruna Vieira.

Potencial do leite orgânico como fonte de bactérias ácido-láticas produtoras de moléculas bioativas aplicáveis à cadeia produtiva do leite / Bruna Vieira Alonso. -- 2025.

78 p. : il.

Orientador: João Batista Ribeiro

Coorientadora: Vanessa Aglaê Martins Teodoro

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2025.

1. Bacteriocinas. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Leite orgânico. 4. Bioproteção. I. Ribeiro, João Batista, orient. II. Teodoro, Vanessa Aglaê Martins, coorient. III. Título.

RESUMO GERAL

A crescente preocupação com a resistência antimicrobiana e a busca por alternativas naturais para a conservação de alimentos têm impulsionado o estudo de bactérias ácido-láticas (BAL), amplamente utilizadas na indústria de laticínios por sua capacidade de produzir metabólitos com ação antimicrobiana, como ácidos orgânicos e bacteriocinas. Este trabalho teve como objetivo isolar, identificar, comparar perfis de resistência a antibióticos e caracterizar o potencial bioprotetor de linhagens de BAL de amostras de leite cru de sistemas orgânicos e convencionais no estado do Rio de Janeiro. Foram isoladas 126 colônias bacterianas, das quais 67 foram identificadas presuntivamente como BAL. A análise por REP-PCR resultou em 48 linhagens geneticamente distintas, posteriormente identificados por MALDI-TOF como pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Considerando o conjunto das linhagens analisadas, ensaios de antibiograma por difusão em ágar revelaram maior taxa de resistência das linhagens de BAL ao antibiótico cotrimoxazol e suscetibilidade de todas as linhagens ao cloranfenicol, sem detecção dos genes de resistência pesquisados (*ermB*, *tetO/M/K*, *blaZ*, *mecA*, *aacA-aphD* e *vanA/B*). Todas as linhagens, independente do sistema de produção, se mostraram suscetíveis à pelo menos quatro dos antibióticos testados. Em termos comparativos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois sistemas quanto às taxas de linhagens suscetíveis aos antibióticos testados. Os ensaios de antagonismo pela técnica *spot-on-the-lawn* das linhagens de BAL provenientes de leite orgânico contra oito patógenos relevantes para a cadeia produtiva do leite (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*) evidenciou pelo menos uma bactéria potencialmente bioprotetora contra cada um dos patógenos testados. A atividade de *Enterococcus italicus* 06 contra *E. faecalis* ATCC 29212 mostrou-se sensível a enzimas proteolíticas, estável em pHs 4 e 6 e nos binômios tempo/temperatura de, 80 °C por 10 minutos e 121 °C por 15 minutos, indicando que a inibição por *E. italicus* é devida à produção de uma bacteriocina com potencial aplicação na biopreservação de alimentos. Os achados reforçam a relevância das BAL como candidatas seguras e funcionais para uso em sistemas alimentares, além

de destacarem o leite orgânico como uma matriz promissora para a prospecção de culturas bioprotetoras.

Palavras-chave: Bacteriocinas. Resistência antimicrobiana. Leite orgânico. Bioproteção.

GENERAL ABSTRACT

The growing concern about antimicrobial resistance and the search for natural alternatives for food preservation have driven the study of lactic acid bacteria (LAB), widely used in the dairy industry for their ability to produce antimicrobial metabolites, such as organic acids and bacteriocins. This study aimed to isolate, identify, compare antibiotic resistance profiles, and characterize the bioprotective potential of LAB strains from raw milk samples collected from both organic and conventional production systems in the state of Rio de Janeiro, Brazil. A total of 126 bacterial colonies were isolated, of which 67 were presumptively identified as LAB. REP-PCR analysis resulted in 48 genetically distinct strains, later identified by MALDI-TOF as belonging to the genera *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus*. Considering the set of strains analyzed, agar diffusion antibiogram assays revealed a higher rate of resistance to the antibiotic cotrimoxazole among LAB strains and universal susceptibility to chloramphenicol, with no detection of the tested resistance genes (*ermB*, *tetO/M/K*, *blaZ*, *mecA*, *aacA-aphD*, and *vanA/B*). All strains, regardless of the production system, were susceptible to at least four of the tested antibiotics. Comparatively, no statistically significant difference was observed between the two systems regarding the susceptibility rates to the tested antibiotics. Antagonism assays using the spot-on-the-lawn technique with LAB strains from organic milk against eight pathogens relevant to the dairy production chain (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes*) demonstrated at least one potentially bioprotective LAB strain active against each of the tested pathogens. The antimicrobial activity of

Enterococcus italicus 06 against *E. faecalis* ATCC 29212 was sensitive to proteolytic enzymes and stable at pH 4 and 6, as well as at time/temperature combinations of 80 °C for 10 minutes and 121 °C for 15 minutes, indicating that the inhibition by *E. italicus* is due to the production of a bacteriocin with potential application in food biopreservation. The findings reinforce the relevance of LAB as safe and functional candidates for use in food systems and highlight organic milk as a promising matrix for the discovery of bioprotective cultures.

Keywords: Bacteriocins. Antimicrobial resistance. Organic milk. Bioprotection.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2 CAPÍTULO 1 - BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS DE LEITE ORGÂNICO APRESENTAM PERFIS DE RESISTÊNCIA MAIS SEGUROS EM COMPARAÇÃO ÀS DE LEITE CONVENCIONAL?.....	12
RESUMO.....	12
2.1 INTRODUÇÃO.....	15
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.2.1 Coleta de amostras de leite, isolamento bacteriano e identificação presuntiva dos isolados.....	17
2.2.2 Análise de fingerprint das bactérias por REP-PCR.....	19
2.2.3 Análise de similaridade dos padrões de bandas eletroforéticas.....	19
2.2.4 Identificação das bactérias por <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i> (MALDI-TOF).....	20
2.2.5 Análise fenotípica do perfil de resistência de linhagens de BAL a antibióticos.....	20
2.2.6 Detecção de genes de resistência a antibióticos em linhagens de BAL por PCR.....	21
2.2.7 Análise estatística dos dados.....	23
2.2.8 Concentração Mínima Inibitória (CIM).....	24
2.3 RESULTADOS.....	25
2.3.1 Isolamento, identificação presuntiva e avaliação da diversidade genética dos isolados de BAL.....	25
2.3.2 Identificação das linhagens de BAL em nível de espécie por MALDI-TOF.....	27
2.3.3 Análise fenotípica de resistência a antibióticos e análise estatística dos dados.....	29
2.3.4 Detecção de genes de resistência a antibióticos em linhagens de BAL por PCR.....	31
2.3.5 Concentração Mínima Inibitória (CIM).....	31
2.4 DISCUSSÃO.....	32
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
REFERÊNCIAS.....	38
3 CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE BACTERIOCINA PRODUZIDA POR	

ENTEROCOCCUS ITALICUS ISOLADOS DE LEITE ORGÂNICO.....	46
RESUMO.....	46
3.1 INTRODUÇÃO.....	49
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.2.1 Isolamento, caracterização genética e identificação de bactérias ácido-láticas (BAL).....	50
3.2.2 Teste de antagonismo pelo método <i>spot-on-the-lawn</i>	51
3.2.3 Pesquisa por moléculas antimicrobianas de natureza proteica.....	52
3.2.4 Caracterização parcial da substância no sobrenadante da cultura livre de células (SCLC).....	52
3.2.5 Teste de lise para exclusão da ação de bacteriófagos.....	53
3.3 RESULTADOS.....	54
3.3.1 Isolamento, diversidade genética e identificação das bactérias ácido-láticas.....	54
3.3.2 Teste de antagonismo pelo método <i>spot-on-the-lawn</i>	54
3.3.3 Pesquisa por moléculas antimicrobianas de natureza proteica.....	58
3.3.4 Caracterização parcial da substância antimicrobiana no sobrenadante da cultura <i>Enterococcus italicus</i> 6 livre de células (SCLC).....	58
3.3.5 Teste de lise para exclusão da ação de bacteriófagos.....	59
3.4 DISCUSSÃO.....	60
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO GERAL

As bactérias ácido-láticas (BAL) constituem um grupo microbiano amplamente distribuído em alimentos fermentados, com destaque para a indústria de laticínios, onde são empregadas tanto como culturas iniciadoras quanto não iniciadoras (NSLAB), contribuindo para o desenvolvimento de propriedades sensoriais e funcionais dos produtos. Sua capacidade de produzir metabólitos antimicrobianos (como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e, principalmente, bacteriocinas) as torna agentes naturais promissores para a biopreservação de alimentos, podendo reduzir a necessidade de conservantes químicos e atender à crescente demanda por alimentos mais seguros e naturais (MOKOENA, 2017; HAMMAMI et al., 2019, CHEN et al., 2025).

Nesse contexto, a prospecção de linhagens de BAL com atividade antimicrobiana e perfis de suscetibilidade seguros tem ganhado relevância, especialmente em sistemas de produção com menor uso de insumos químicos, como a pecuária leiteira orgânica. Consideram-se perfis de suscetibilidade seguros aqueles que demonstram ausência de resistência adquirida a antibióticos clinicamente relevantes e que apresentam sensibilidade a pelo menos dois desses antimicrobianos, conforme critérios adotados por órgãos reguladores como a ANVISA e a EFSA. O leite cru proveniente de propriedades leiteiras que adotam o sistema orgânico de produção, nas quais é proibido o uso de antibióticos e estão sujeitas a condições menos intervencionistas, constitui um ambiente propício à seleção de microbiota naturalmente diversa, com potencial para a produção de compostos bioativos ainda pouco explorados (COTTER et al., 2005; SABUNEVICA; ZAGORSKA, 2023).

Apesar da reconhecida segurança das BAL, a resistência antimicrobiana também pode estar presente nesse grupo, seja de forma intrínseca ou adquirida. Diante do aumento global da resistência a antibióticos e da possibilidade de transferência horizontal de genes de resistência para microrganismos patogênicos, torna-se essencial avaliar o perfil fenotípico e genotípico das BAL, especialmente quando há interesse em sua aplicação tecnológica em alimentos (WHO, 2017; HUMMEL et al., 2007). Comparar os perfis de resistência em sistemas de produção orgânica e convencional pode elucidar os impactos das práticas de manejo sobre a

segurança microbiológica das linhagens, bem como fornecer evidências acerca do potencial do leite orgânico como fonte de BAL para fins tecnológicos.

Dessa forma, esta dissertação está estruturada em dois capítulos, correspondentes a artigos científicos que serão submetidos para publicação, os quais abordam de forma complementar dois eixos de investigação interligados: (i) a análise comparativa dos perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antibióticos em BAL isoladas de leite cru proveniente de sistemas orgânico e convencional; e (ii) a triagem de BAL isoladas de leite orgânico quanto à produção de substâncias antimicrobianas de natureza proteica, com foco na caracterização de uma possível bacteriocina produzida por *Enterococcus italicus*. Conjuntamente, os estudos apresentam uma população de bactérias com informações associadas suficientes para a recomendação de investigação mais aprofundada em linhagens de BAL específicas com indícios de segurança e funcionalidade para uso no setor lácteo, evidenciam o potencial do leite orgânico como fonte de linhagens bioprotetoras, bem como contribui para um melhor entendimento da diversidade das BAL no leite, reforçando sua importância como culturas viáveis para aplicação industrial.

2 CAPÍTULO 1 - BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS DE LEITE ORGÂNICO APRESENTAM PERFIS DE RESISTÊNCIA MAIS SEGUROS EM COMPARAÇÃO ÀS DE LEITE CONVENCIONAL?

Bruna Vieira Alonso^a; Vanessa Aglaê Martins Teodoro^a; Karina Neoob de Carvalho Castro^b; Kenia Moura Teixeira^c; Rodrigo Yudi Fujimoto^c; Isabela Vieira Barbosa^a; Paula Aparecida Azevedo Almeida^b; Joice Fátima Moreira Silva^d; João Batista Ribeiro^{b*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil, 36036-900

^b Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil, 36038-330

^c Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brasil, 49025-040

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, 37200-900.

* Corresponding author: joão-batista.ribeiro@embrapa.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar se bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de leite cru de sistema orgânico apresentam perfis de suscetibilidade a antibióticos mais seguros, em comparação às BAL provenientes de leite convencional. A partir de 10 amostras de leite, 48 linhagens pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* foram obtidas. Independente do sistema de produção, a menor taxa de linhagens suscetíveis foi observada para o antibiótico cotrimoxazol (52%) e a maior para o cloranfenicol (100%). Em termos comparativos, os dados não evidenciaram distinções estatisticamente significativas de taxas de resistência das linhagens aos antibióticos entre os sistemas orgânico e convencional. Os genes *ermB*, *tetO/M/K*, *blaZ*, *mecA*, *aacA-aphD* e *vanA/B* não foram detectados em nenhuma linhagem da população analisada. São necessários estudos com uma população de BAL mais numerosa, preferencialmente com maior número e distribuição mais equilibrada de linhagens dentro de cada táxon, para uma resposta mais conclusiva. Além disso, a avaliação

de outros caracteres e inclusão de novos genes de resistência e fatores ambientais é desejável.

Palavras-chave: *Lactobacillus*. Antibióticos. Antibiograma. Resistência. *Enterococcus*. *Lactococcus*. BAL.

ABSTRACT

This study aimed to investigate whether lactic acid bacteria (LAB) isolated from raw milk produced under organic systems exhibit safer antibiotic susceptibility profiles compared to LAB derived from conventional milk. From 10 milk samples, 48 strains belonging to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, and *Leuconostoc* were obtained. Regardless of the production system, the lowest proportion of susceptible strains was observed for the antibiotic cotrimoxazole (52%), while the highest was for chloramphenicol (100%). Comparatively, the data did not reveal statistically significant differences in antibiotic resistance rates between strains from organic and conventional systems. The resistance genes *ermB*, *tetO/M/K*, *blaZ*, *mecA*, *aacA-aphD*, and *vanA/B* were not detected in any of the analyzed strains. Further studies with a larger LAB population, preferably with a greater and more balanced distribution of strains within each taxon, are needed for more conclusive results. Additionally, the evaluation of other traits and inclusion of new resistance genes and environmental factors is recommended.

Keywords: *Lactobacillus*. Antibiotics. Antibigram. Resistance. *Enterococcus*. *Lactococcus*. LAB.

2.1 INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) são microrganismos Gram-positivos, não esporulados e catalase-negativos, geralmente em forma de cocos ou bacilos, com alta tolerância a ambientes ácidos (SABO et al., 2014; WANG et al., 2021). Produzem ácido lático pela fermentação de carboidratos (KHALID, 2011) e compreendem diversos gêneros, como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Weissella* (MOKOENA, 2017).

Algumas BAL têm potencial probiótico, atuando de forma benéfica no hospedeiro por meio da modulação da microbiota, suporte à imunidade e produção de compostos antimicrobianos (VAN ZYL et al., 2020). Linhagens selecionadas são utilizadas como culturas iniciadoras em alimentos fermentados, promovendo mudanças previsíveis no produto (GARCÍA-DIÉZ; SARAIVA, 2021; YANG et al., 2023). Já as BAL não iniciadoras (NSLAB) participam da maturação de alimentos fermentados, contribuindo para o sabor, aroma e textura, ainda que não sejam inoculadas intencionalmente (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010; FOX et al., 2017). Contudo, podem causar defeitos sensoriais indesejáveis (LUNARDI et al., 2021).

Por isso, a seleção criteriosa de linhagens — iniciadoras ou não — deve considerar tanto sua segurança microbiológica quanto seu desempenho tecnológico (FRANCIOSI et al., 2009; ZACARIAS et al., 2011). BAL com propriedades funcionais e capacidade de bioproteção são alternativas promissoras à substituição de conservantes químicos, alinhando-se à demanda por alimentos mais naturais (HAMMAMI; FLISS; CORSETTI, 2019; SAID et al., 2019; MACHADO, 2023).

Relatórios recentes da FAO e OMS (2019) e da FAO (2024) evidenciam a tendência de consumo por alimentos mais saudáveis e sustentáveis, o que reforça o uso de BAL como agentes bioprotetores naturais e seguros. A produção orgânica de leite está alinhada a esse movimento, ao evitar antibióticos, hormônios e aditivos sintéticos, promovendo o bem-estar animal e fornecendo matéria-prima mais limpa (MACHADO et al., 2022). Segundo o Observatório do Leite Orgânico (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2023), o setor tem crescido no Brasil, destacando sua relevância.

A pecuária convencional, por outro lado, ainda apresenta uso inadequado de antibióticos, favorecendo a resistência antimicrobiana tanto em patógenos quanto em microrganismos de interesse tecnológico (DO NASCIMENTO; MAESTRO; DE CAMPOS, 2001; VAN BOECKEL et al., 2015; SHARMA et al., 2018). A transferência

horizontal de genes de resistência representa risco à segurança dos alimentos (GAD; ABDEL-HAMID; FARAG, 2014), e a OMS alerta que, sem ações efetivas, a resistência antimicrobiana pode comprometer a eficácia dos antibióticos até 2050 (ANVISA, 2019).

Nesse cenário, analisar os perfis de resistência em BAL isoladas de diferentes sistemas de produção, sobretudo do orgânico, que impõe menor pressão seletiva pode revelar linhagens mais seguras para aplicação tecnológica (PITTA et al., 2020; BORELLI et al., 2023). Ainda que muitas BAL sejam consideradas seguras, há registros de linhagens com genes de resistência, mesmo que em menor frequência (LIMA et al., 2016).

A aplicação de microrganismos vivos em alimentos com alegações funcionais ou probióticas, como as BAL, no Brasil é regulamentada pela RDC nº 241/2018 (ANVISA), com alterações pelas RDCs nº 839/2023 e nº 843/2024, que reforçam a necessidade de identificação no nível de linhagem, comprovação de segurança e eficácia funcional. Nesse cenário, BAL isoladas de leite orgânico destacam-se como candidatas promissoras, por estarem potencialmente menos expostas a antibióticos e, conseqüentemente, apresentarem menor probabilidade de carregar genes de resistência antimicrobiana ou de virulência, características compatíveis com os critérios de segurança exigidos pela legislação vigente. A escassez de estudos comparativos no Brasil que avaliem o impacto dos diferentes sistemas de produção sobre a resistência antimicrobiana em BAL reforça a necessidade de investigações nessa área.

Diante disso, este estudo teve como objetivo isolar e avaliar comparativamente BAL de leite bovino orgânico e convencional quanto aos perfis de suscetibilidade a antibióticos. A motivação decorre do crescimento da produção orgânica no Brasil (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2023) e da necessidade de identificar se esse sistema oferece vantagens em segurança microbiológica para o uso tecnológico de BAL.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

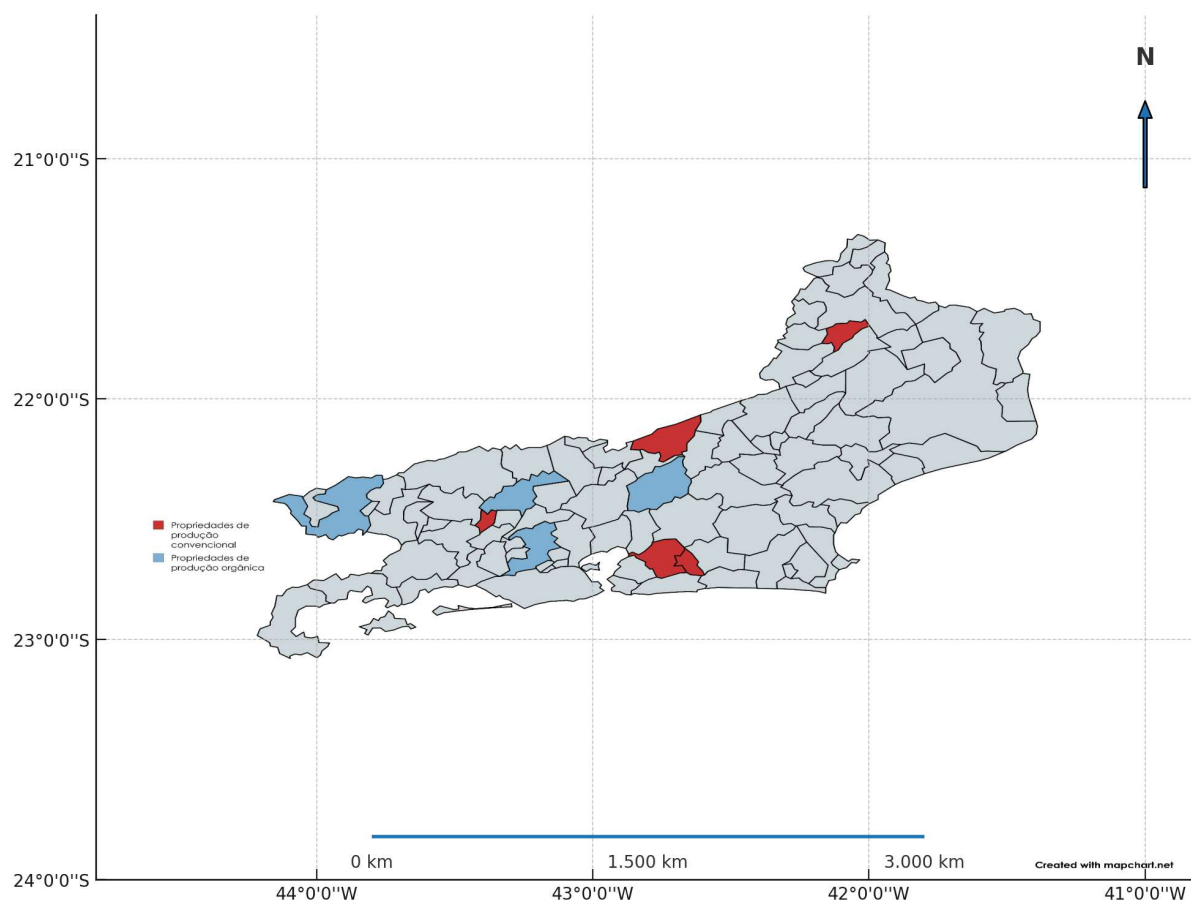
Os procedimentos adotados neste estudo envolveram a coleta e análise de amostras de leite cru provenientes de sistemas orgânico e convencional, com o objetivo de isolar, identificar e caracterizar BAL. Para fins deste estudo,

considerou-se como sistema orgânico aquele que segue as diretrizes estabelecidas pela Instrução Normativa nº 46/2011 do MAPA, que proíbe o uso rotineiro de antibióticos, hormônios e aditivos sintéticos, prioriza o bem-estar animal e exige certificação por organismo credenciado. Já o sistema convencional refere-se à produção leiteira que não adota essas restrições e permite o uso de insumos veterinários de forma preventiva ou corretiva, conforme regulamentação sanitária vigente. A seguir, são descritas as etapas de coleta, isolamento bacteriano, identificação das linhagens, bem como os testes de resistência a antimicrobianos e análise molecular.

2.2.1 Coleta de amostras de leite, isolamento bacteriano e identificação presuntiva dos isolados

Amostras de leite recém-ordenhado ($n = 10$, 50 mL cada) foram coletadas, assepticamente, em tanques de expansão refrigerados (até 4 °C) de quatro propriedades produtoras de leite orgânico e seis de leite convencional, localizadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil (Figura 1). As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo, transportadas ao laboratório e mantidas a 4 °C até o momento do isolamento das BAL, realizado em até 24 horas após a coleta. As coletas ocorreram em setembro de 2022, e a seleção das propriedades de produção convencional foi baseada na proximidade geográfica com as propriedades orgânicas, com o objetivo de minimizar a influência de variáveis ambientais que poderiam interferir nos resultados.

Figura 1 - Localização das propriedades com coleta de leite cru no estado do Rio de Janeiro



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Mapa representando as cidades do estado do Rio de Janeiro onde foram realizadas as coletas e suas coordenadas geográficas em graus, minutos e segundos. As coordenadas dos municípios são as seguintes: Vassouras (22°24'19" S, 43°39'44" W); Resende (22°28'14" S, 44°27'03" W); Nova Iguaçu (22°45'20" S, 43°27'37" W); Teresópolis (22°25'00" S, 42°58'31" W); Itaboraí (22°44'39" S, 42°51'36" W); Tanguá (22°43'59" S, 42°43'18" W); Sapucaia (21°59'40" S, 42°54'54" W); Mendes (22°31'28" S, 43°43'55" W); São José de Ubá (21°21'55" S, 41°57'06" W).

Após a homogeneização, alíquotas de 1 mL de cada amostra foram diluídas serialmente em tubos estéreis contendo solução salina 0,65%. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram inoculadas por espalhamento em placas contendo meio ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Becton, Dickinson, and Company, Franklin Lakes, Estados Unidos) e incubadas a 35 °C, por 24 a 48 horas, em condições de aerobiose. As colônias foram selecionadas com base em características morfológicas como tamanho, coloração e tipo de borda. Para a identificação presuntiva de BAL, foram realizados os testes de Gram e catalase, conforme metodologia descrita por Gram (1884) e Loew (1900), respectivamente, com modificações, utilizando colônias isoladas e reagentes específicos.

2.2.2 Análise de *fingerprint* das bactérias por REP-PCR

Todas as colônias classificadas presuntivamente como BAL foram avaliadas pela técnica de REP-PCR, conforme proposto por Versalovic et al. (1994), com modificações descritas por Silva et al. (2025), visando eliminar a redundância genética entre os isolados. Foi utilizado o kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase da Promega (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos) com o primer (GTG)₅ universal (Sequência 5' – 3' GTGGTGGTGGTGGTG). O programa utilizado no Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Estados Unidos) para amplificação do DNA consistiu em: 1 ciclo de desnaturação inicial (95°C por 15 minutos), 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (95°C por 30 segundos, 40°C por 1 minuto e 65°C por 8 minutos) e um último ciclo de extensão (65°C por 10 minutos).

As reações foram submetidas a corridas de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,9% (Ludwig Biotec, Brasil). O marcador de peso molecular de 1 Kb da DNA Ladder (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos) foi utilizado na eletroforese. Ao final da corrida, os géis foram corados em brometo de etídio 0,01% (Sigma-Aldrich, USA), por 10 minutos e a descoloração foi realizada por 30 minutos em água destilada. A documentação da imagem do gel foi feita no fotodocumentador L-PIX EX (Loccus Biotecnologia, Brasil).

2.2.3 Análise de similaridade dos padrões de bandas eletroforéticas

Os fingerprints de DNA dos isolados de BAL foram analisados visualmente em géis individuais e conjuntamente comparados utilizando o *software* BioNumerics® v.6.6.11 (Applied Maths, Bélgica). A similaridade entre os perfis digitalizados foi calculada utilizando as distâncias de Jaccard, com tolerância de 1% e a relação entre as populações avaliadas por meio da construção de dendrogramas utilizando o algoritmo UPGMA. Isolados com similaridade genética inferior a 90% foram considerados geneticamente distintos para fins de seleção de representantes não redundantes para as análises subsequentes (GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001).

2.2.4 Identificação das bactérias por Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF)

Linhagens de BAL não redundantes foram identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF, conforme Nacef et al. (2017). Para tal, colônias frescas isoladas foram inoculadas em ágar MRS para obtenção de crescimento confluyente e incubadas em estufa a 35°C, por 24 horas. Após este período de crescimento, a massa celular total de cada bactéria foi transferida assepticamente para tubos tipo Eppendorf de 2,0 mL contendo 300 µL de água deionizada estéril. A suspensão foi, então, homogeneizada e acrescida de 900 µL de etanol 100% (Sigma-Aldrich, USA). Foi realizada extração das proteínas celulares e os espectros de massas foram adquiridos usando um espectrômetro de massas Autoflex III SmartBeam, conforme instruções do fabricante (Bruker Daltonics Inc.).

A identificação das linhagens foi baseada nos escores obtidos, interpretados segundo os critérios do fabricante: escore $\geq 2,000$ foi considerado identificação segura em nível de espécie; entre 1,700 e 1,999, identificação confiável em nível de gênero; e $< 1,700$ foi considerado não identificável com confiabilidade estatística.

2.2.5 Análise fenotípica do perfil de resistência de linhagens de BAL a antibióticos

A avaliação das linhagens de BAL geneticamente não redundantes quanto ao perfil de resistência a antibióticos foi realizada seguindo o protocolo descrito em Charteris et al. (1998), com modificações descritas por Silva et al. (2025). Foram utilizados discos de nove antibióticos amplamente empregados na cadeia produtiva do leite (Vancomicina 30 µg, Penicilina G 10 µg, Estreptomicina 10 µg, Tetraciclina 30 µg, Ampicilina 10 µg, Gentamicina 10 µg, Cloranfenicol 30 µg, Eritromicina 15 µg e Cotrimoxazol [Trimetoprima 1,25 µg e Sulfametoxazol 23,75 µg]) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). As bactérias selecionadas foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar MRS e incubadas a 35°C por 24 horas. Em seguida, foram preparadas suspensões bacterianas a partir de cada linhagem, transferindo uma alíquota de 100 µL (0,5 na escala de McFarland) de cada uma para 1 mL de caldo MRS. Essas suspensões foram incubadas por 24 horas a 35°C. Após o período de incubação, 100 µL de cada cultura foram transferidos para placas de Petri contendo

água MRS, e a suspensão foi espalhada uniformemente sobre toda a superfície do meio utilizando um swab estéril. Após a absorção completa da suspensão no meio, os discos contendo os antimicrobianos foram colocados sobre o ágar. As placas foram incubadas por mais 24 horas a 35°C e, então, foi realizada a medição dos halos de inibição.

2.2.6 Detecção de genes de resistência a antibióticos em linhagens de BAL por PCR

A detecção dos genes de resistência a antibióticos (*ermB*, *tetO/M/K*, *blaZ*, *mecA*, *aacA-aphD*, *vanA/B*) foi realizada por PCR *multiplex* conforme protocolos já descritos na literatura (Tabela 1). A seleção desses genes se baseou na sua ampla distribuição entre bactérias Gram-positivas e no potencial de transferência horizontal desses determinantes genéticos, especialmente a partir de patógenos relevantes para a mastite bovina como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. (GUEIMONDE et al., 2013). Como controles positivos nas reações de PCR, foram utilizadas cepas do acervo da Coleção de Microrganismos de Interesse para Agroindústria e Pecuária (CMIAP) da Embrapa, previamente caracterizadas e descritas por Almeida (2018), conforme detalhado na Tabela 1. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL, utilizando o kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega), contendo tampão 5X, MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM de cada nucleotídeo), 1 U de Taq DNA polimerase, pares de primers específicos (Tabela 1) e 1 µL de DNA genômico (0,4–40 ng). As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min e 50 s, com extensão final a 72 °C por 7 min, seguindo protocolo adaptado por Almeida (2018).

Tabela 1 – Lista de *primers* e controles positivos utilizados na detecção de genes de resistência a antibióticos em BAL

Gene alvo	Primer	Amplicon (pb)	Controles positivos	Referência
-----------	--------	---------------	---------------------	------------

<i>ermB</i>	ermB1 - CGTTTACGAAATTGGAACAG GTAAAGGGC ermB2 - GAATCGAGACTTGAGTGTG C	359	CMIAP GL 10101 S. <i>agalactiae</i>	Lina et al., 1999; Almeida, 2018
<i>tetO</i>	tetO 1 - AACTTAGGCATTCTGGCTCA C tetO 2 - TCCCACTGTTCCATATCGTC A	515	CMIAP GL 10101 S. <i>agalactiae</i>	Ng et al., 2001; Almeida, 2018
<i>tetM</i>	tetM 1 - AGTTTTAGCTCATGTTGATG tetM 2 - TCCGACTATTTAGACGACGG	1862	CMIAP GL 10101 S. <i>agalactiae</i>	Trzcinski et al., 2000; Almeida, 2018
<i>tetK</i>	tetK 1 - TATTTTGGCTTTGTATTCTTT CAT tetK 2 - GCTATACCTGTTCCCTCTGA TAA	1159	CMIAP GL 8545 S. <i>epidermidis</i>	Trzcinski et al., 2000; Almeida, 2018
<i>aacA-aphD</i>	aacA-aphD 1 - TAATCCAAGAGCAATAAGGG C aacA-aphD 2 - GCCACACTATCATAACCACT A	228	CMIAP GL 10101 S. <i>agalactiae</i>	Strommenger et al. 2003; Almeida, 2018

<i>mecA</i>	mecA 1 - TGGCTATCGTGTCACAATCG mecA 2 - CTGGAACCTTGTTGAGCAGA G	310	CMIAP GL 8545 S. <i>epidermidis</i>	Vannuffel et al., 1995; Almeida, 2018
<i>blaZ</i>	blaZ 1 - AAGAGATTTGCCTATGCTTC blaZ 2 - GCTTGACCACTTTTATCAGC	517	CMIAP GL 8545 S. <i>epidermidis</i>	Vesterholm-Nie Isen et al., 1999; Almeida, 2018
<i>vanA</i>	vanA 1 - TCTGCAATAGAGATAGCCGC vanA 2 - GGAGTAGCTATCCCAGCATT	377 377	- -	Lemcke et al., 2000 Lemcke et al., 2000
<i>vanB</i>	vanB 1 - GCTCCGCAGCCTGCATGGA CA vanB 2 - ACGATGCCGCCATCCTCCT GC	529	-	Lemcke et al., 2000

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os códigos referem-se à identificação no nível de linhagem do espécimen depositado na CMIAP.

2.2.7 Análise estatística dos dados

Para avaliar a resistência a antibióticos entre as BAL isoladas de leite orgânico e convencional, foram realizadas duas análises estatísticas principais: o teste exato de Fisher, para comparar a proporção de linhagens resistentes a cada antibiótico, e o teste de Mann-Whitney, para comparar a distribuição do número de suscetibilidades entre os sistemas, adequado para dados discretos e não normais. O número total de resistências por linhagem (variando de 0 a 9) foi calculado como o número de antibióticos aos quais cada linhagem apresentou resistência. A

normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Todas as análises foram realizadas no *software* RStudio® (versão 4.3.2). O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

2.2.8 Concentração Mínima Inibitória (CIM)

A determinação da concentração mínima inibitória (CIM) em BAL tradicionalmente utiliza o meio *Mueller-Hinton* (MH), conforme estabelecido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023). No entanto, esse meio foi padronizado para microrganismos patogênicos de interesse clínico e não contempla as exigências nutricionais específicas das BAL, que são microrganismos fastidiosos e requerem suplementações específicas para crescimento ideal (GÄNZLE, 2015). Diante disso, foi realizado um experimento preliminar para comparar o desempenho das linhagens selecionadas nos meios MH e MRS, este último tradicionalmente utilizado e considerado adequado ao cultivo de BAL devido à sua composição nutricional compatível com as exigências desses microrganismos (GÄNZLE, 2015).

Com base nos resultados do experimento de antibiograma, foram selecionadas linhagens com diferentes perfis de resistência e cultivadas nos meios *Mueller-Hinton* (MH) e MRS, incubados a 35 °C por 24 e 48 horas. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, contendo 200 µL de cada meio previamente inoculado com suspensões bacterianas padronizadas à escala 0,5 de McFarland. As amostras foram distribuídas em duplicata para cada meio e tempo de incubação. Como controle positivo, utilizou-se a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, cultivada exclusivamente em MH, conforme diretrizes do CLSI (2023). Controles negativos foram preparados com os meios estéreis, sem inoculação. A densidade óptica foi medida em 600 nm, nos tempos de 24 e 48 horas, utilizando espectrofotômetro de microplacas BioTek Eon™ (Agilent Technologies, EUA), permitindo a construção de curvas comparativas de crescimento.

Com base nesses resultados e nos perfis fenotípicos obtidos por difusão em disco, foram selecionadas quatro linhagens de BAL (duas oriundas do leite orgânico e duas do leite convencional) para avaliação da MIC. Essa etapa foi realizada com o objetivo de reforçar os resultados fenotípicos do antibiograma, considerando que não há padrões interpretativos específicos estabelecidos para BAL nos protocolos

convencionais, e que tanto o método de difusão em disco quanto os ensaios de microdiluição exigem adaptações específicas para esses microrganismos (KLARE et al., 2005; MAYRHOFER et al., 2014). A seleção considerou a origem das amostras e os perfis fenotípicos contrastantes de resistência à gentamicina e à ampicilina: uma linhagem resistente e uma sensível para cada sistema, visando representar diferentes perfis de resistência.

Os antibióticos escolhidos são amplamente utilizados na cadeia produtiva do leite e apresentaram variações nos resultados de resistência ao longo do estudo. O teste de CIM foi realizado por microdiluição em caldo, em placas de 96 poços, conforme metodologia do CLSI (2023), com adaptações, utilizando kits comerciais padronizados (Sigma-Aldrich, EUA; HiMedia, Índia). As concentrações testadas variaram entre 0,5–16 µg/mL para ampicilina e 2–64 µg/mL para gentamicina. As análises foram conduzidas em triplicata, com leitura da densidade óptica após 24 horas de incubação a 35 °C, utilizando o mesmo espectrofotômetro. Conforme especificação do CLSI M100 (2023), a cepa *E. faecalis* ATCC 29212 foi empregada como controle positivo para garantir a confiabilidade da metodologia de CIM aplicada. As linhagens foram consideradas suscetíveis à ampicilina quando apresentaram CIM ≤2 µg/mL e resistentes quando CIM ≥16 µg/mL. Para gentamicina, embora o CLSI recomende a avaliação com concentrações elevadas (500 µg/mL) para detecção de resistência adquirida, os kits comerciais utilizados no presente estudo empregam faixas entre 2–64 µg/mL, sendo os pontos de corte baseados na validação interna dos fabricantes tendo como base referências como o CLSI M100 e organismos controle padrão. Ressalta-se que, na ausência de critérios específicos para BAL, essa abordagem representa uma estratégia metodológica de referência adotada em estudos com microrganismos não padronizados.

2.3 RESULTADOS

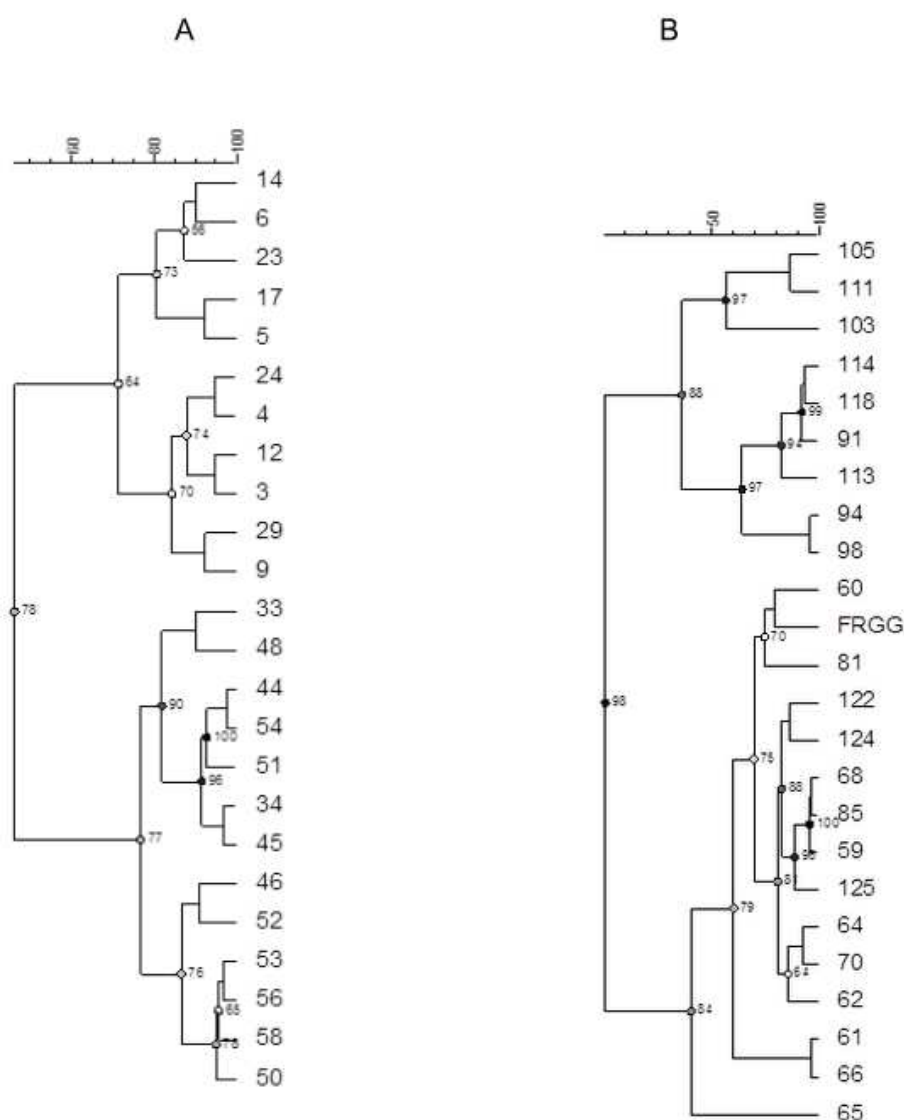
2.3.1 Isolamento, identificação presuntiva e avaliação da diversidade genética dos isolados de BAL

Um total de 126 isolados bacterianos foi obtido em MRS a partir de 10 amostras de leite, sendo 58 provenientes do leite de fazendas de sistema de criação orgânica e 68 de fazendas de sistema de criação convencional. Dentre esses

isolados, 67 foram identificados presuntivamente como BAL, exibindo a forma de cocos (n=64) ou de bacilos (n=3) com resultado positivo na coloração de Gram e negativo no teste da catalase. Do total, 24 linhagens foram oriundas da produção orgânica e 43 da convencional.

Para todas as linhagens bacterianas presuntivamente identificadas como BAL (n=67), *fingerprints* de DNA foram obtidos por REP-PCR. Análises por inspeção visual (*fingerprints* presentes no mesmo gel) e com auxílio do programa BioNumerics® (*fingerprints* de todos os isolados) evidenciaram 48 linhagens geneticamente distintas, sendo 24 provenientes do sistema de produção orgânica e 24 do convencional. Os microrganismos que apresentaram perfis moleculares com grau de similaridade igual ou superior a 90% com base nos padrões de bandas dos *fingerprints* foram considerados clones (Figura 2).

Figura 2 - Dendrogramas das BAL isoladas das amostras de leite cru das fazendas de criação orgânica (A) e convencional (B)



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

2.3.2 Identificação das linhagens de BAL em nível de espécie por MALDI-TOF

Todas as linhagens geneticamente não redundantes, exceto a 29, foram identificadas ao nível de espécie por espectrometria de massa, como pertencentes aos seguintes gêneros: *Lactobacillus* (n=3), *Lactococcus* (n=19), *Leuconostoc* (n=6) e *Enterococcus* (n=19) (Tabela 2). Os escores de identificação variaram de 1,8 a 2,32.

Tabela 2 – Quantidade de linhagens por gênero e espécie de BAL identificadas por *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF) por sistema de produção

Gênero/Espécie	Sistema Orgânico	Sistema Convencional	Total
Lactobacillus	0	3	3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	2	2
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	0	1	1
Lactococcus	6	13	19
<i>Lactococcus lactis</i>	5	7	12
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	6	7
Leuconostoc	5	1	6
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	2	0	2
<i>Leuconostoc lactis</i>	3	0	3
<i>Leuconostoc citreum</i>	0	1	1
Enterococcus	12	7	19
<i>Enterococcus italicus</i>	7	2	9
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	4	7
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	0	2
<i>Enterococcus faecium</i>	0	1	1
Não identificado	1	0	1
Total	24	24	48

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

2.3.3 Análise fenotípica de resistência a antibióticos e análise estatística dos dados

Todas as 48 linhagens de BAL foram testadas quanto à resistência aos antibióticos e os resultados foram baseados na mensuração do diâmetro dos halos formados em volta do disco de antibiótico. Os critérios descritos por Charteris et al. (1998) e Nalepa; Markiewicz (2023) foram utilizados para considerar uma bactéria como resistente ou não aos antibióticos.

A maior taxa de linhagens resistentes foi observada para o cotrimoxazol, com 45,8% (11/24) das linhagens do sistema orgânico e 50,0% (12/24) das do sistema convencional, seguida pela estreptomicina, com 33,3% (8/24) em ambos os sistemas. Nenhuma linhagem apresentou resistência ao cloranfenicol. A resistência à ampicilina foi mais frequente nas linhagens do sistema orgânico (20,8%, 5/24) em comparação às do convencional (4,2%, 1/24), enquanto a resistência à tetraciclina foi exclusiva do sistema orgânico (12,5%, 3/24).

Considerando a definição de multirresistência como resistência a três ou mais classes de antibióticos (MAGIORAKOS, et al., 2012), foram identificadas três linhagens multirresistentes: uma do sistema orgânico (*Enterococcus gallinarum* 48), e duas do sistema convencional (*Lactobacillus plantarum* 113 e *Lactocaseibacillus paracasei* 124). Todas apresentaram resistência a quatro diferentes classes antimicrobianas, indicando a presença pontual, porém relevante, de perfis fenotípicos de ampla resistência em ambos os sistemas. Também foram observadas linhagens com perfis completamente suscetíveis aos nove antibióticos testados. No sistema de produção orgânica, sete linhagens apresentaram suscetibilidade total, sendo elas: 5 *Lactococcus lactis*, 14 *Enterococcus italicus*, 46 *Enterococcus faecalis*, 50, 53, 56 e 58 (todas *Enterococcus italicus*). No sistema de produção convencional, quatro linhagens também se mostraram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados: 62, 65 e 68 (*Lactococcus lactis*) e 66 (*Enterococcus faecalis*).

O teste exato de Fisher não revelou diferenças estatisticamente significativas nas proporções de resistência entre os sistemas para nenhum dos antibióticos avaliados ($p > 0,05$). O teste de Shapiro-Wilk indicou que os dados não seguem distribuição normal ($p < 0,01$ para ambos os sistemas), justificando a aplicação do teste de Mann-Whitney. Esse teste não apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao número de resistências por linhagem ($U =$

346, $p = 0,087$). A homogeneidade de variâncias entre os sistemas foi confirmada pelo teste de Levene ($p = 0,083$). A Tabela 3 apresenta as proporções de linhagens resistentes a cada antibiótico em ambos os sistemas, bem como os resultados dos testes estatísticos comparativos.

Tabela 3 – Proporção de resistência a antibióticos em BAL isoladas de leite orgânico e convencional e análise estatística

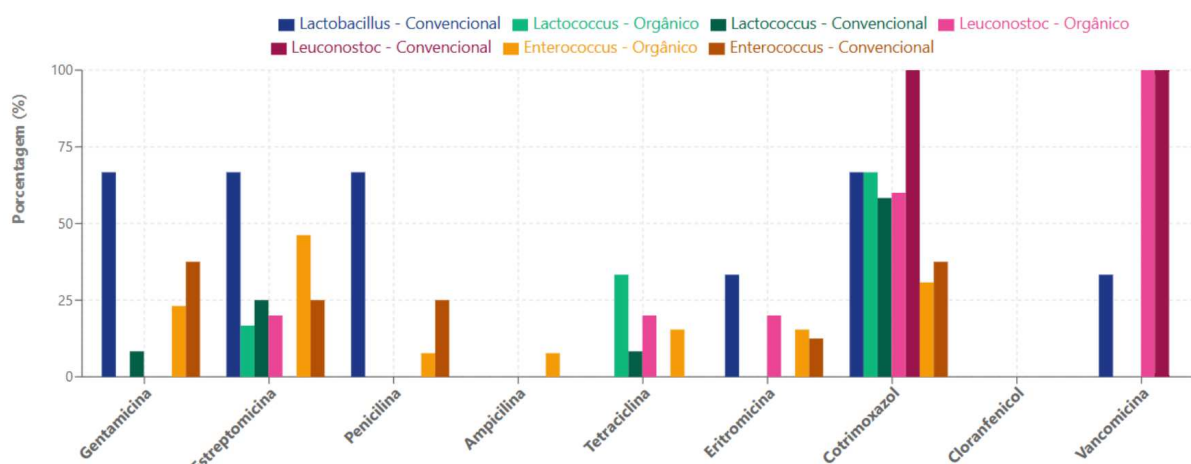
Antibiótico	Orgânico (n=24)	Convencional (n=24)	p-valor (Teste Exato de Fisher)
Gentamicina	4 (16,7%)	4 (16,7%)	1,000
Estreptomicina	8 (33,3%)	8 (33,3%)	1,000
Penicilina	1 (4,2%)	2 (8,3%)	1,000
Ampicilina	5 (20,8%)	1 (4,2%)	0,194
Tetraciclina	3 (12,5%)	0 (0%)	0,234
Eritromicina	2 (8,3%)	1 (4,2%)	1,000
Cotrimoxazol	11 (45,8%)	12 (50,0%)	1,000
Cloranfenicol	0 (0%)	0 (0%)	-
Vancomicina	5 (20,8%)	3 (12,5%)	0,702

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A tabela apresenta a proporção de linhagens resistentes a cada antibiótico em sistemas orgânico e convencional, com valores de p do teste exato de Fisher. Um p -valor $< 0,05$ indica diferença significativa. Nenhuma diferença significativa foi observada.

A relação de resistências apresentadas por cada gênero, em ambos os sistemas de produção, está apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Porcentagem de linhagens resistentes aos antibióticos testados por gênero de BAL em cada sistema de produção



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

O gênero *Lactobacillus* não está representado no gráfico do sistema orgânico por não ter sido identificado em nenhuma das linhagens provenientes desse sistema.

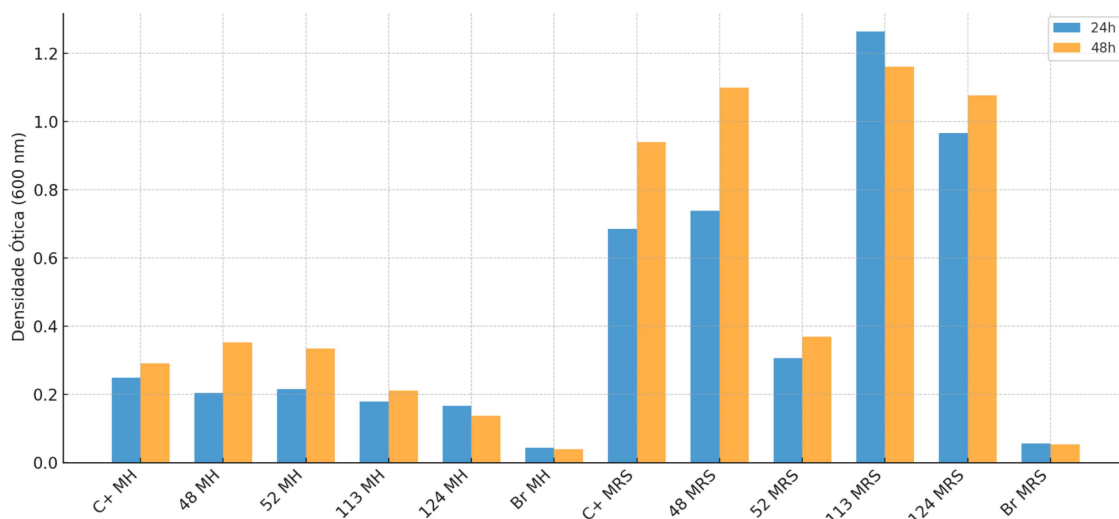
2.3.4 Detecção de genes de resistência a antibióticos em linhagens de BAL por PCR

Nenhum dos genes de resistência pesquisados (*ermB*, *tetO/M/K*, *blaZ*, *mecA*, *aacA-aphD*, *vanA/B*) foi detectado nas linhagens.

2.3.5 Concentração Mínima Inibitória (CIM)

Observou-se que todas as linhagens testadas apresentaram crescimento significativamente superior no meio MRS em comparação ao MH (Figura 4), em ambos os tempos analisados. As linhagens 48, 113 e 124, atingiram densidades ópticas acima de 1,0 no MRS, enquanto apresentaram valores abaixo de 0,4 no MH. A amostra 52 também apresentou crescimento mais expressivo em MRS. Os controles negativos (meios sem inoculação) apresentaram densidade óptica mínima, indicando ausência de contaminação.

Figura 4 – Comparação do crescimento de BAL em meios Mueller-Hinton (MH) e MRS após 24 e 48 horas de incubação, com base na densidade óptica (600 nm)



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

C+: Controle positivo (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212), Br: Branco (Caldo sem inoculação).

No teste de CIM foi observado que *E. gallinarum* 48 apresentou inibição na concentração de 8 µg/mL para ampicilina, enquanto *E. faecalis* 52 foi inibida em todas as concentrações testadas, de 0,5 a 16 µg/mL. Para a gentamicina, a CIM observada foi de 16 µg/mL para *L. plantarum* 113 e de 32 µg/mL para *L. paracasei* 124. O controle positivo, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, apresentou CIM de 2 µg/mL para ampicilina e 8 µg/mL para gentamicina, valores compatíveis com os pontos de controle estabelecidos pelo CLSI para esse padrão de referência. Nos controles negativos, que continham apenas o meio de cultura sem inoculação bacteriana, não foi observada turbidez nem alteração na densidade óptica ao longo do tempo, indicando ausência de contaminação e confirmando a validade dos ensaios.

2.4 DISCUSSÃO

Somente linhagens confirmadas como geneticamente não redundantes, foram usadas para cálculo de frequência de resistência aos antibióticos, o que reduz o risco de superestimativa devido a repetição de linhagens geneticamente idênticas. Dentre as 48 linhagens de BAL isoladas de leite cru de dois tipos de sistemas de produção, 39,5% (n=19) pertenciam ao gênero *Enterococcus* e *Lactococcus*, sendo os mais frequentes no estudo. Entretanto, a espécie mais isolada foi *Lactococcus lactis*, com frequência de 25% (n=12). Estudos anteriores apontam que a distribuição

de BAL em leite e produtos lácteos pode variar conforme a região geográfica (HERMANN et al., 2013), por exemplo, na Etiópia, o gênero mais frequentemente isolado foi *Lactobacillus* spp. (TAYE et al., 2021). A escassez de pesquisas envolvendo BAL em leite orgânico limita comparações mais amplas sobre sua ocorrência nesses sistemas. Além disso, a diversidade microbiana no leite cru é influenciada por uma série de fatores, como as condições higiênico-sanitárias da ordenha, dieta e manejo dos animais, uso de antimicrobianos, ambiente da fazenda, temperatura e refrigeração, entre outros. Essas variáveis contribuem para a heterogeneidade microbiana observada entre diferentes regiões e sistemas produtivos (VERDIER-METZ et al., 2009; QUIGLEY et al., 2013; OIKONOMOU et al., 2014; PORCELLATO et al., 2024).

A análise de resistência antimicrobiana revelou um panorama heterogêneo. A taxa de linhagens resistentes ao cotrimoxazol foi a maior entre os antibióticos testados, representando 50% das resistências totais observadas. Este fármaco, composto por sulfametoxazol e trimetoprima, atua inibindo a síntese de ácido fólico, e sua resistência é frequentemente mediada pelos genes *sul* e *dfr*, associados a elementos genéticos móveis (EGMs), como plasmídeos e transposons (DIBNER; RICHARDS, 2005). Notadamente, *Lactococcus lactis* demonstrou elevada taxa de resistência ao cotrimoxazol, fato também relatado por Silva et al. (2012) em queijos São Jorge Denominação de Origem Protegida (DOP).

As resistências a estreptomicina (cerca de 40% das linhagens) e gentamicina (aproximadamente 17%) também se destacaram. Essas taxas podem refletir tanto mecanismos adquiridos quanto resistência intrínseca, como no caso de *Lactobacillus*, gênero conhecido por apresentar esse tipo de resistência (HUMMEL et al., 2006; GUEIMONDE et al., 2013). A ausência do gene *aacA-aphD* reforça a hipótese de envolvimento de outros mecanismos.

Quanto à resistência à tetraciclina e eritromicina (12,5%), embora os genes *tet(O/M/K)* e *ermB* não tenham sido detectados, é possível que outros genes ou mecanismos alternativos estejam envolvidos (FLORIS et al., 2025). Em contrapartida, a baixa resistência observada a beta-lactâmicos (penicilina e ampicilina) e à vancomicina, corroborada pela ausência dos genes *blaZ*, *mecA* e *vanA/B*, representa um indicativo positivo quanto à segurança das linhagens.

Todos os isolados de *Leuconostoc* spp. (n=6) apresentaram resistência à vancomicina, o que é consistente com a literatura, que descreve a presença de

resistência intrínseca nesse gênero, mediada pela modificação do alvo na parede celular (BAPTISTA, 2013). Dois dos três isolados de *Lactobacillus spp.* também foram resistentes à vancomicina, como descrito por Zhou et al. (2005). Já entre os *Enterococcus spp.*, cinco das linhagens resistentes à gentamicina (62,5%) expressaram resistência compatível com o mecanismo natural de bloqueio da entrada do antibiótico na célula (BAPTISTA, 2013).

Por outro lado, todas as linhagens demonstraram suscetibilidade ao cloranfenicol, independentemente do sistema de produção. Isso indica a ausência de mecanismos comuns de resistência, como a produção de acetiltransferases (FLUIT et al., 2001). Além disso, a resistência ao cloranfenicol ocorre predominantemente por inativação enzimática, sendo rara por mutações no rRNA 23S (TENOVER, 2006).

A maior resistência ao cotrimoxazol e à estreptomicina nas linhagens do sistema convencional pode estar associada à maior exposição a esses fármacos, frequentemente utilizados no manejo profilático e terapêutico de animais (GILLINGS, 2013). Por outro lado, a resistência mais elevada à tetraciclina em linhagens do sistema orgânico levanta a hipótese de mecanismos intrínsecos, particularmente em gêneros como *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, ou ainda de pressão seletiva ambiental decorrente de fatores como uso de fertilizantes orgânicos, qualidade da água e persistência de genes de resistência no ambiente (BELÉN FLÓREZ et al., 2005; FERNÁNDEZ et al., 2012; YANG et al., 2025).

Essas evidências reforçam a necessidade de adoção de políticas específicas para cada sistema de produção. Nos sistemas convencionais, deve-se priorizar a redução do uso de antimicrobianos, assim como a implementação de boas práticas de manejo, vigilância dos resíduos e educação sanitária (FAO; WOA, 2023). Já no sistema orgânico, recomenda-se o monitoramento de fontes ambientais (como solo, água e resíduos), e a aplicação de estratégias para mitigar a entrada de genes de resistência por vias ambientais (AGER et al., 2023).

A ausência de genes de resistência pesquisados nas linhagens analisadas nos dois sistemas de produção, é um achado relevante, sobretudo frente ao risco de transferência horizontal para patógenos. Essa característica, somada à suscetibilidade generalizada ao cloranfenicol e à baixa resistência a beta-lactâmicos e glicopeptídeos, reforça o potencial de aplicação tecnológica dessas BAL no setor de lácteos. No entanto, a alta resistência ao cotrimoxazol e a presença de

resistências não explicadas geneticamente demonstram a importância de investigações complementares, com a ampliação do número de genes pesquisados e avaliação da mobilidade genética de genes que porventura venham ser encontrados. Estratégias preventivas devem ser priorizadas para garantir a segurança microbiológica da cadeia produtiva, tanto em sistemas orgânicos quanto convencionais.

A avaliação da resistência por difusão em disco é prática e padronizada, mas pode subestimar a resistência em bactérias fastidiosas como as BAL, especialmente quando comparada à abordagem quantitativa da CIM (CHARTERIS et al., 1998). Nesse contexto, a determinação da CIM surge como uma abordagem quantitativa complementar, capaz de refinar a interpretação fenotípica da resistência. Os testes de CIM realizados com quatro linhagens de BAL selecionadas estrategicamente demonstraram concordância com os resultados obtidos por antibiograma. Essa convergência entre os métodos reforça a confiabilidade dos dados fenotípicos apresentados. Para a ampicilina, as duas linhagens provenientes de leite orgânico apresentaram perfis coincidentes entre os métodos. *E. gallinarum* 48 foi resistente em ambos os testes (antibiograma e CIM) e *E. faecalis* 52 foi suscetível. Já para a gentamicina, as linhagens obtidas de leite convencional mostraram CIMs de 16 µg/mL (*L. plantarum* 113) e 32 µg/mL (*L. paracasei* 124), sendo a primeira classificada como sensível no antibiograma. Isso indica que, de acordo com o ponto de corte utilizado (≤ 16 µg/mL para sensibilidade, segundo os critérios dos parâmetros estabelecidos), *L. plantarum* 113 encontra-se dentro da faixa de suscetibilidade, enquanto *L. paracasei* 124 excede esse valor, indicando possível resistência. Embora o número de amostras avaliadas por CIM tenha sido limitado, os dados obtidos sugerem que o antibiograma pode ser uma ferramenta útil na triagem fenotípica de resistência em BAL, especialmente quando associado a métodos quantitativos como a CIM (CLSI, 2023).

Embora o tamanho da amostra possa limitar a identificação de diferenças mais sutis, os resultados obtidos oferecem informações valiosas dentro do contexto regional avaliado. O presente estudo avaliou um conjunto representativo de 48 linhagens geneticamente distintas, obtidas a partir de um número considerável de amostras de leite cru de propriedades orgânicas e convencionais. As linhagens abrangeram diferentes espécies dentro dos principais gêneros de BAL de interesse tecnológico, o que reforça a diversidade analisada. Ainda assim, a distribuição

desigual de espécies entre os sistemas pode limitar comparações mais refinadas, especialmente dentro de um mesmo gênero ou espécie.

Estudos futuros, com um número ampliado de linhagens, propriedades e regiões geográficas distintas, poderão complementar e ampliar os achados aqui apresentados, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da resistência antimicrobiana em BAL de diferentes sistemas de produção.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foram isoladas 48 linhagens de BAL dos gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* e caracterizadas quanto ao perfil de resistência à antibióticos de uso comum na cadeia produtiva do leite (tetraciclina, ampicilina, estreptomicina, eritromicina, cotrimoxazol, penicilina, cloranfenicol, gentamicina e vancomicina). De forma geral, observou-se alta suscetibilidade à maioria dos antimicrobianos testados em ambos os sistemas de produção, com destaque para as linhagens do leite orgânico, que apresentaram maior proporção de suscetibilidade à eritromicina (91,7%), penicilina (95,8%) e cloranfenicol (100%), especialmente entre os gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus*, que são tipicamente sensíveis a esses antibióticos.

Os testes de CIM apresentaram concordância com os dados obtidos por difusão em disco, fortalecendo a confiabilidade dos resultados fenotípicos. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os sistemas de produção ($p > 0,05$, teste exato de Fisher), a menor suscetibilidade à ampicilina (79,2%) e à tetraciclina (87,5%) nas linhagens do sistema orgânico levanta a hipótese de influência de fatores ambientais, mesmo em um contexto de restrição ao uso de antimicrobianos.

A ausência dos genes de resistência pesquisados (*ermB*, *tetO/M/K*, *blaZ*, *mecA*, *aacA-aphD* e *vanA/B*) em todas as linhagens analisadas em ambos os sistemas de produção, representa um achado positivo quanto à segurança microbiológica dessas BAL. No entanto, a variabilidade entre os perfis observados sugere a necessidade de estudos mais amplos, incluindo maior número de propriedades, genes adicionais e análises genômicas complementares, a fim de aprofundar a compreensão sobre o impacto dos sistemas de produção nos perfis de

resistência de BAL e avaliar com maior precisão se o manejo orgânico representa uma vantagem consistente quanto à segurança microbiológica das BAL.

REFERÊNCIAS

AGER, E. O.; CARVALHO, T.; SILVA, E. M.; RICKE, S. C.; HITE, J. L. Global trends in antimicrobial resistance on organic and conventional farms. **Scientific Reports**, v. 13, n. 22608, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-47862-7.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre a comprovação de segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília, DF: ANVISA, 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujx0NI8uVgt/content/id/35791206/do1-2018-07-31-resolucao-da-diretoria-colegiada-n-241-de-26-de-julho-de-2018-35791024. Acesso em: 31 jul. 2025.

ALMEIDA, P. A. A. **Desenvolvimento e avaliação de método molecular baseado em PCR multiplex para detecção de genes de resistência a antimicrobianos relevantes para o controle da mastite bovina**. 2018. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resistência antimicrobiana é ameaça global, diz OMS. Brasília, DF, [s.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global-diz-oms>. Acesso em: 30 jun. 2025.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 839, de 14 de dezembro de 2023**. Dispõe sobre a comprovação de segurança e a autorização de uso de novos alimentos e novos ingredientes. Brasília, DF: ANVISA, 2023. Disponível em: <https://anvisaegis.datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&tipo=RDC&numeroAto=00000839&seqAto=000&valorAno=2023&orgao=RDC/DC/ANVISA/MS>. Acesso em: 31 jul. 2025.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 843, de 22 de fevereiro de 2024**. Dispõe sobre a regularização de alimentos e embalagens sob competência do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) destinados à oferta no território nacional. Brasília, DF: ANVISA, 2024. Disponível em: https://anvisaegis.datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&tipo=RDC&numeroAto=00000843&seqAto=000&valorAno=2024&orgao=RDC/DC/ANVISA/MS&codTipo=&desItem=&desItemFim=&cod_menu=1696&cod_modulo=134&pesquisa=true. Acesso em: 31 jul. 2025.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal, 2013.

BELÉN FLÓREZ, A. B.; DELGADO, S.; MAYO, B. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 51-58, 2005.

BORELLI, E.; ELLIS, K.; TOMLINSON, M.; HUGHES, K.; ZINN, C. E.; WALLACE, R. J.; SMITH, D. Antimicrobial usage and resistance in Scottish dairy herds: a survey of farmers' knowledge, behaviours and attitudes. *BMC Veterinary Research*, v. 19, n. 72, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03625-0>. Acesso em: 31 jul. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). **Instrução Normativa SDA Nº 46, de 6 de outubro de 2011**. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção, bem como as listas de substâncias e práticas permitidas para uso nestes sistemas. Brasília, DF: MAPA, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011-producao-vegetal-e-animal-regulada-pela-in-17-2014.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2025.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; CONNOR, E. P. O.; COLLINS, J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 33. ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: CLSI, 2023.

DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 1–11, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00254-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00254-4).

DAS, D.; GOYAL, A. Lactic Acid Bacteria in Food Industry. **Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology**, p. 757-772, 2011.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634>.

DO NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; DE CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 119–124, 2001.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Observatório do Leite Orgânico**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023. Disponível em: <http://leiteorganico.cnpgl.embrapa.br>. Acesso em: 30 jun. 2025.

FAO; WHO (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). **Sustainable healthy diets – Guiding principles**. Rome: FAO & WHO, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/3/ca6640en/ca6640en.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2025.

FAO; WOA (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL). **Regional Guidelines for the Monitoring and Surveillance of Antimicrobial Resistance, Use and Residues in Food and Agriculture – Volume 5: Monitoring antimicrobial use at the farm level**. Bangkok: FAO & World Organisation for Animal Health, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cc8807en>. Acesso em: 1 jul. 2025.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of Food and Agriculture 2024: Value-driven transformation of agrifood systems**. Rome: FAO, 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/publications/sofa/2024/en>. Acesso em: 30 jun. 2025.

FERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-SANTIAGO, S.; GUINEA, J.; MARTÍNEZ, J. L. Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1001-1009, 2012. DOI: 10.1128/AAC.05398-11.

FLORIS, I.; BATTISTINI, R.; TRAMUTA, C.; GARCIA-VOZMEDIANO, A.; MUSOLINO, N.; SCARDINO, G.; BIANCHI, D. M. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria from dairy products in Northern Italy. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 4, p. 375, 2025. DOI: 10.3390/antibiotics14040375.

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FRANCIOSI, E.; SETTANI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. **International Dairy Journal**, 19, 3-11, 2009.

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, n. 1, 2014.

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106–117, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>.

GARCÍA-DÍEZ, J.; SARAIVA, C. Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 2544, 2021. DOI: 10.3390/ijerph18052544.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 31-36, 2001.

GILLINGS, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 4, 2013. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00004.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, F.; DELGADO, S.; RUIZ, L.; MARGOLLES, A.; RUAS-MADIEDO, P. Functional bacterial cultures for dairy applications: Towards improving safety, quality, nutritional and health benefit aspects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 1, p. 212-229, 2022. DOI: 10.1111/jam.15510.

GRAM, H. C. Über die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. **Fortschritte der Medizin**, 2: 185–189, 1884.

GUEIMONDE, M.; SÁNCHEZ B.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G.; MARGOLLES, A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. **Frontiers in microbiology**, 4, 202, 2013. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00202

HAMMAMI, R.; FLISS, I.; CORSETTI, A. Editorial: Application of Protective Cultures and Bacteriocins for Food Biopreservation. **Front Microbiol.**, 2019.

HASSAN, A. M.; EL-BAKKUSH, A. A.; EL-SHAFEI, K.; EL-SHOUBAGY, G. A.; EL-AZIZ, N. M. A. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 25-34, 2014.

HERMANN, G.; MÜLLER, E. E.; SULERES, C.; FARIAS, B. T.; NUNES, E. C. A. Isolamento e identificação de bactérias lácticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 191-196, 2013.

HUMMEL, A. S.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. **Applied and environmental microbiology**, 73(3), 730-739, 2007. DOI: 10.1128/AEM.02105-06

KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences**, v. 1, 2011.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; MÜLLER-BERTLING, S.; REISSBRODT, R.; HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; GOOSSENS, H.; WITTE, W. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci, and Bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8982–8986, 2005. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8982-8986.2005.

LEMCKE, R.; BÜLTE, M. Occurrence of the vancomycin-resistant genes vanA, vanB, vanC1, vanC2 and vanC3 in Enterococcus strains isolated from poultry and pork. **International Journal of Food Microbiology**, 60(2-3), p. 185–194, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00310-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00310-X)

LIMA, R. C.; CAVALCANTI, M. I. R. S.; AZEVEDO, R. A. de; XAVIER, L. H. C.; GUIMARÃES, C. de A. S. **Atividade antagonista e perfil de resistência a antibióticos de bactérias ácido-láticas isoladas de frutas tropicais**. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2016.

LINA, G.; QUAGLIA, A.; REVERDY, M. E.; LECLERCQ, R.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43(5), p. 1062–1066, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1062>

LOEW, O. A new enzyme of general occurrence in organisms. **Science (New York, N.Y.)**, v. 11, n. 279, p. 701–702, 1900. DOI: 10.1126/science.11.279.701.

LUNARDI, A.; VIVIAN, L.; PERUSSOLO, F.; CARPES, S. T. Bactérias ácido-láticas não iniciadoras (NSLAB): Um desafio à indústria do queijo. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 3, p. 26383-26409, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n3-372.

MACHADO, F. S.; DINIZ, F. H.; PIRES, M. de F. A.; SOARES, J. P. G. **Leite orgânico: regulamentação para a pecuária leiteira orgânica no Brasil**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2022. Disponível em: [<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1146062/1/Boletim-268-Leite-organico-regulamentacao-para-a-pecuaria-leiteira-organica-no-Brasil.pdf>]. Acesso em: 30 jun. 2025.

MACHADO, T. F. **Potencial uso de bacteriocinas na conservação de alimentos**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2023. Disponível em: [<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1151945/1/DOC-199.pdf>]. Acesso em: 30 jun. 2025.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMEYER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; SCHAFFNER, F.; VAARA, M. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

MAYRHOFER, S.; ZITZ, U.; BIRRU, F. H.; GOLLAN, D.; GOŁOŚ, A. K.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J. Comparison of the CLSI guideline and ISO/IDF standard for antimicrobial susceptibility testing of lactobacilli. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 6, p. 591–603, 2014. DOI: 10.1089/mdr.2013.0189.

MOKOENA, M. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 1255, 2017. DOI: 10.3390/molecules22081255.

NACEF, M.; CHEVALIER, M.; CHOLLET, S.; DRIDER, D.; FLAHAUT, C. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the Maroilles. **International Journal of Food Microbiology**, 247, p.2-8, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>. PMID:27423415.

NALEPA, B.; MARKIEWICZ, L. H. Microbiological Biodiversity of Regional Cow, Goat

and Ewe Milk Cheeses Produced in Poland and Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Them. **Animals**, 13(1), 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13010168>

NG, L. K.; MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, 15(4), p. 209–215, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363>

OIKONOMOU, G.; BICALHO, M. L.; MEIRA JUNIOR, E.; ROSSI, R. E.; FODITSCH, C.; MACHADO, V. S.; BICALHO, R. C. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically infected quarters. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. e85904, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0085904.

PITTA, D. W.; INDUGU, N.; TOTH, J. D.; BENDER, J. S.; BAKER, L. D.; HENNESSY, M. L.; VECCHIARELLI, B.; ACETO, H.; DOU, Z. The distribution of microbiomes and resistomes across farm environments in conventional and organic dairy herds in Pennsylvania. **Environmental Microbiome**, 15(1), 21, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00368-5>.

PORCELLATO, D.; MOREIRA, L. P. D.; FRANKLIN, F. V.; DUARTE, V. da S.; ØYAAS, J.; SVALESTAD, F.; SKEIE, S. Impact of microbial milk quality on mesophilic starter culture metabolism: A metaproteomics approach. **International Dairy Journal**, v. 159, p. 106070, 2024. DOI: 10.1016/j.idairyj.2024.106070.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.

SABO, S. S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J. D. M.; OLIVEIRA, R. P. S. **Food Research International**, v. 64, p.527-536, 2014.

SAID, L. B.; SIFOU, M.; DENDOUGUI, H.; BOUGHANEM, A. Bioprotective culture: a new generation of food additives for the preservation of food quality and safety. **Industrial Biotechnology**, 2019, p. 138-147. DOI: <https://doi.org/10.1089/ind.2019.29175.lbs>.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, 2010, 27(6), 691–697.

SHARMA, C.; KAUR, S.; SINGH, A.; SACHDEV, A. Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 237, 2018. DOI: 10.3389/fvets.2017.00237.

SILVA, J. F. M.; ALONSO, B. V.; ALMEIDA, P. A. A.; BARBOSA, I. V.; PAULA, O. A. B. de; BARBOSA, L. R.; BRUNO, L. M.; MENEZES, L. D. M.; SILVA, M. R.; COSTA, G. M. da; RODARTE, M. P.; RIBEIRO, J. B. Searching for antibiotic-susceptible bioprotective lactic acid bacteria to control dangerous biological agents in artisanal

cheese. **Food Microbiology**, v. 130, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104762>.

SILVA, L. J. M. da. **Isolamento e caracterização bioquímica das bactérias do ácido láctico do queijo São Jorge DOP**. 2012. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, Portugal, 2012.

STROMMENDER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G.; WITTE, W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(9), p. 4089–4094, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003>

TAYE, Y.; DEGU, T.; FESSEHA, H.; MATHEWOS, M. Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. **The Scientific World Journal**, v. 2021, 2021. DOI: 10.1155/2021/4697445.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. S3–S10, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>.

TRZCINSKI, K.; COOPER, B. S.; HRYNIEWICZ, W.; DOWSON, C. G. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 45(6), p. 763–770, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/45.6.763>

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1503141112.

VANNUFFEL, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H.; VANDERCAM, B.; DELMEE, M.; WAUTERS, G.; GALA, J. L. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 33(11), p. 2864–2867, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.33.11.2864-2867.1995>

VAN ZYL, W. F.; DEANE, S. M.; DICKS, L. M. T. Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. **Gut Microbes**, 12(1):1831339, 2020. DOI:10.1080/19490976.2020.1831339

VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBÈS, C.; MONTEL, M. C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? **Food Microbiology**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 305–310, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.005>.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, 19(24), 6823–6831, 1991.

VERSALOVIC, J. BRUJIN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based Polymerase Chain Reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VESTERHOLM-NIELSEN, M.; OLHOM LARSEN, M.; ELMERDAHL OLSEN, J.; MOLLER AARESTRUP, F. Occurrence of the blaZ gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 40(3), p. 279–286, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1186/BF03547026>

WANG, Y.; WU, J.; LV, M.; SHAO, Z.; HUNGWE, M.; WANG, J.; BAI, X.; XIE, J.; WANG, Y.; GENG, W. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. 612285, 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2021.612285.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th ed. Washington, DC: **American Public Health Association**, 2004.

YANG, S.; BAI, M.; KWOK, L. Y.; ZHONG, Z.; SUN, Z. The intricate symbiotic relationship between lactic acid bacterial starters in the milk fermentation ecosystem. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 65(4), 728–745, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2280706>

YANG, Y.; ZHANG, T.; CHEN, P.; ZHANG, H.; SONG, L.; LI, C.; ZHAO, Y.; LI, H.; GU, Y.; LI, M. Profiles of antibiotic resistome risk in diverse water environments. **Communications Earth & Environment**, [S. l.], v. 6, n. 158, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43247-025-02139-x>.

ZACARÍAS, M. F.; BINETTI, A.; LACO, M.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. **International Dairy Journal**, 21, 548-555, 2011.

ZHOU, J. S.; PILLIDGE, C. J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 211-217, 2005. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.011.

3 CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE BACTERIOCINA PRODUZIDA POR *ENTEROCOCCUS ITALICUS* ISOLADOS DE LEITE ORGÂNICO

Bruna Vieira Alonso¹; Vanessa Aglaê Martins Teodoro¹; Karina Neoob de Carvalho Castro²; Kenia Moura Teixeira³; Rodrigo Yudi Fujimoto³; Isabela Vieira Barbosa¹; Paula Aparecida Azevedo Almeida²; Joice Fátima Moreira Silva⁴; João Batista Ribeiro^{2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil, 36036-900

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil, 36038-330

³ Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brasil, 49025-040

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, 37200-900.

* Autor correspondente: joão-batista.ribeiro@embrapa.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antagonista de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de leite cru orgânico proveniente do estado do Rio de Janeiro, Brasil, contra oito patógenos relevantes para a cadeia produtiva do leite. A partir de 58 isolados de BAL, obtidos por cultivo em meio MRS e triagem fenotípica, 24 linhagens geneticamente distintas foram selecionadas por REP-PCR. A identificação por MALDI-TOF revelou a presença de diversas espécies, com destaque para *Enterococcus italicus*. A atividade antagonista foi avaliada por ensaio *spot-on-the-lawn* contra oito patógenos alimentares. A linhagem BAL 6, identificada como *E. italicus* 6, apresentou atividade antagonista elevada (halo/colônia ≥ 2 mm) contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*, com espectro amplo de inibição. Sua atividade foi sensível a enzimas proteolíticas quando testado contra *Enterococcus faecalis*, indicando a natureza proteica do composto antimicrobiano. Além de *E. italicus* 6, as linhagens de *Lactococcus lactis* 18, *Leuconostoc pseudomesenteroides* 13 e *Enterococcus*

faecalis 9 também apresentaram halos ≥ 2 mm, embora com espectro antimicrobiano mais restrito. Ensaio com sobrenadante da cultura livre de células (SCLC) confirmaram estabilidade da substância proteica frente ao aumento de pH (para 6,0) e aquecimento moderado. A ausência de fagólise descartou a interferência de bacteriófagos. Os resultados indicam que *E. italicus* oriundo de leite orgânico possui potencial biotecnológico como cultura bioprotetora para aplicação na preservação de alimentos.

Palavras-chave: *Enterococcus italicus*. BAL. Antagonismo. SCLC. Bioproteção. Bacteriocina.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antagonistic activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from raw organic milk produced in the state of Rio de Janeiro, Brazil, against eight pathogens relevant to the dairy production chain. From 58 LAB isolates obtained through cultivation in MRS medium and phenotypic screening, 24 genetically distinct strains were selected using REP-PCR. Identification by MALDI-TOF revealed the presence of several species, notably *Enterococcus italicus*. Antagonistic activity was assessed through a spot-on-the-lawn assay against eight foodborne pathogens. LAB strain 6, identified as *E. italicus* 6, showed strong antagonistic activity (halo/colony ≥ 2 mm) against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli*, demonstrating a broad inhibitory spectrum. Its activity was sensitive to proteolytic enzymes when tested against *Enterococcus faecalis*, indicating the proteinaceous nature of the antimicrobial compound. In addition to *E. italicus* 6, the strains *Lactococcus lactis* 18, *Leuconostoc pseudomesenteroides* 13, and *Enterococcus faecalis* 9 also produced halos ≥ 2 mm, although with a narrower antimicrobial spectrum. Assays using cell-free culture supernatant (CFCS) confirmed the stability of the protein compound under increased pH (up to 6.0) and moderate heating. The absence of phage lysis ruled out bacteriophage interference. These results suggest that *E. italicus* isolated from organic milk has biotechnological potential as a protective culture for food preservation.

Keywords: *Enterococcus italicus*. LAB. Antagonism. CFCS. Bioprotection. Bacteriocin.

3.1 INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) desempenham um papel central na produção de alimentos fermentados, sendo amplamente utilizadas na indústria de laticínios para a fabricação de queijos, leites fermentados e iogurtes. Essas bactérias Gram-positivas, catalase-negativas, geralmente na forma de cocos ou bacilos, produzem ácido láctico como principal metabólito da fermentação de carboidratos, contribuindo para as características sensoriais e para a preservação dos alimentos (KHALID, 2011; WANG et al., 2021). Entre os gêneros mais estudados estão *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*, que têm se destacado não apenas pelo seu potencial probiótico, mas também pelo efeito bioprotetor frente a microrganismos patogênicos e deteriorantes (MOKOENA, 2017; PARADA et al., 2007).

A função bioprotetora das BAL, especialmente na cadeia produtiva de laticínios, está relacionada à produção de moléculas bioativas, como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. Bacteriocinas são compostos antimicrobianos de natureza proteica que podem inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejados de maneira específica, sem efeitos adversos ao alimento ou ao consumidor (PARADA et al., 2007; SUREKHA; REDDY, 2014). A nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, é um exemplo amplamente aplicado na indústria devido à sua estabilidade térmica e segurança, reforçando o potencial de exploração de novas bacteriocinas como conservantes naturais em substituição aos aditivos químicos (HAMMAMI et al., 2019).

A produção de bacteriocinas por BAL pode ser modulada por diversos fatores, incluindo perfil genético da linhagem, condições ambientais, disponibilidade de nutrientes e presença de estressores, como antimicrobianos, que podem atuar como estímulo, favorecendo a síntese dessas substâncias como resposta competitiva (CLEVELAND et al., 2001). Dessa forma, o uso de antibióticos em sistemas convencionais de produção de leite pode reduzir a diversidade microbiana e favorecer linhagens resistentes. Em contraste, a produção orgânica, que exclui ou diminui o uso de antibióticos e aditivos, tende a favorecer a diversidade e a estabilidade de populações microbianas, aumentando a probabilidade de encontrar linhagens com potencial para produção de novas substâncias antimicrobianas, incluindo bacteriocinas (AONO, 2014).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a presença e caracterizar os compostos antimicrobianos, com ênfase em bacteriocinas, produzidos por BAL isoladas de leite orgânico, visando identificar linhagens com potencial biotecnológico para aplicação na bioproteção de alimentos. Durante a triagem, uma linhagem de *E. italicus* destacou-se pela produção de uma substância de natureza proteica com atividade antimicrobiana, cuja caracterização é apresentada neste trabalho. A pesquisa contribui para a compreensão da diversidade funcional das BAL em sistemas de produção orgânica e reforça a relevância de alternativas naturais e eficazes no controle de patógenos alimentares.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Isolamento, caracterização genética e identificação de bactérias ácido-láticas (BAL)

O procedimento de coleta, transporte, processamento das amostras e isolamento inicial das BAL foi o mesmo descrito no Capítulo 1, onde se encontram os detalhes metodológicos completos (ver seção 2.2.1 do Capítulo 1). Resumidamente, amostras oriundas de quatro propriedades orgânicas do estado do Rio de Janeiro foram diluídas e inoculadas em meio MRS, com posterior seleção de colônias Gram-positivas e catalase-negativas, segundo metodologia adaptada de Wassie e Wassie (2016).

Os isolados foram analisados pela REP-PCR para a obtenção de perfis genéticos e identificação de linhagens distintas, conforme protocolo de Versalovic et al. (1994), com adaptações. As reações foram realizadas com o kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega®), utilizando o primer (GTG)₅. A PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,9% e o gel, corado com brometo de etídio e documentado em sistema fotodocumentador L-PIX EX (Loccus®). Foram considerados clones os isolados que apresentaram $\geq 90\%$ de similaridade nos padrões eletroforéticos. A análise de similaridade entre os perfis foi conduzida no software BioNumerics® v.6.6.11, utilizando o coeficiente de Jaccard (tolerância de 1%) e agrupamento pelo método *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* (UPGMA), conforme Gevers et al. (2001).

As linhagens geneticamente distintas foram então identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF, conforme protocolo de Nacef et al. (2017). Colônias frescas foram cultivadas em ágar MRS a 35 °C por 24 horas, ressuspensas em água deionizada e etanol absoluto, e submetidas à extração proteica. Os espectros foram adquiridos com o equipamento Autoflex III SmartBeam (Bruker Daltonics Inc.) para comparação com banco de dados espectral e determinação da identidade taxonômica.

3.2.2 Teste de antagonismo pelo método *spot-on-the-lawn*

A atividade antagonista das BAL foi avaliada frente a oito microrganismos patogênicos relevantes na cadeia produtiva do leite: *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* IAL 1848), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae* ATCC 12386), *Listeria monocytogenes* (ATCC 5779), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* ATCC 29212), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis* ATCC 12228), *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae* ATCC 12388) e *Streptococcus uberis* (*S. uberis* ATCC 700407), seguindo a metodologia proposta por Tagg et al. (1976), com adaptações descritas por Todorov et al. (2011).

As BAL foram inicialmente cultivadas em ágar MRS a 35 °C por 24 horas. Em seguida, 5 µL de suspensões bacterianas previamente preparadas foram inoculados em cinco pontos equidistantes em placas de 9 cm de diâmetro contendo 20 mL de ágar MRS e incubados a 35 °C por mais 24 horas, para o desenvolvimento das colônias. Os patógenos foram reativados em ágar *Brain-Heart Infusion* (BHI) e repassados para caldo BHI e incubados a 35 °C por 4 horas, e 100 µL das suspensões foram adicionados a 7 mL de meio BHI semissólido, previamente mantido a 55 °C. Essa mistura foi vertida sobre as placas contendo os spots de BAL, seguidas de nova incubação a 35 °C por 18 horas.

Os diâmetros das colônias de BAL e dos halos de inibição formados ao redor das mesmas foram medidos utilizando régua milimetrada, e a atividade antagonista expressa pela relação entre o diâmetro do halo e o tamanho da colônia (H/C). Relações superiores a 2 mm foram consideradas indicativas de forte atividade antimicrobiana (TAGG et al., 1976; TODOROV et al., 2011).

3.2.3 Pesquisa por moléculas antimicrobianas de natureza proteica

A presença de moléculas antimicrobianas de natureza proteica produzidas pelas BAL foi avaliada seguindo a metodologia adaptada de Lewus e Montville (1991) e De Martinis e Franco (1998), contra todos os patógenos testados, durante o teste de antagonismo *spot-on-the-lawn*. Após o desenvolvimento das BAL em ágar MRS a 35 °C por 24 horas, conforme descrito no item 3.2.2, foram aplicados 5 µL de soluções enzimáticas (proteinase K, pepsina e amilase, todas na concentração de 5 mg/mL) ao lado das colônias previamente formadas. Após a adição das enzimas, as placas foram incubadas a 35 °C por mais 24 horas. A ausência de halos de inibição nas áreas tratadas com enzimas proteolíticas foi considerada como indicativo de atividade antimicrobiana de natureza proteica (LEWUS; MONTVILLE, 1991; DE MARTINIS; FRANCO, 1998). O controle negativo foi constituído por uma réplica de cada placa sem aplicação de enzimas.

3.2.4 Caracterização parcial da substância no sobrenadante da cultura livre de células (SCLC)

O SCLC foi obtido a partir do cultivo da BAL em caldo MRS a 35 °C por 24 horas. Após o crescimento, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante coletado, e filtrado utilizando membrana de acetato de celulose de 0,22 µm. Foi realizada a medição do pH do sobrenadante filtrado.

O SCLC foi submetido a diferentes tratamentos, incluindo liofilização, ajuste de pH para 6,0 com NaOH 1M e tratamentos térmicos (80 °C por 10 minutos e 121 °C por 15 minutos). Como controle positivo foi usado o SCLC filtrado sem tratamento e como controle negativo, o caldo MRS puro.

A estabilidade da substância inibitória presente no SCLC foi avaliada por incubação com enzimas proteolíticas (tripsina, protease, proteinase K, pepsina) e uma amilolítica (amilase). Para isso, foram misturados cinquenta microlitros (50 µL) do sobrenadante da cultura livre de células (SCLC) com cinquenta microlitros (50 µL) da solução de cada enzima, na proporção de 1:1. As misturas foram incubadas a 35 °C por 30 minutos, e posteriormente avaliadas quanto à manutenção da atividade antimicrobiana.

O teste de antagonismo foi realizado pelo método de difusão em poços, adaptado de Wishna-Kadawarage et al. (2024). Placas de 9 cm contendo 50 mL de MRS semissólido (0,7%) inoculado com 250 µL da bactéria indicadora *E. faecalis* (aproximadamente 10^8 UFC/mL), foram preparadas. Poços com 10 mm de diâmetro foram preenchidos com 50 µL de cada tratamento do SCLC, incluindo controles e misturas com enzimas. Após incubação a 35 °C por 24 horas, os halos de inibição foram medidos para avaliação da atividade antimicrobiana.

A metodologia utilizada nesta etapa do presente estudo foi adaptada dos protocolos estabelecidos na literatura para estudos de atividade antimicrobiana e análise de moléculas bioativas de natureza proteica, conforme descritos em Lewus e Montville (1991) e De Martinis e Franco (1998).

3.2.5 Teste de lise para exclusão da ação de bacteriófagos

A presença de bacteriófagos no SCLC foi investigada utilizando as técnicas *pour plate* e microgota, adaptadas de metodologias descritas na literatura para detecção de fagos em matrizes biológicas (HUDSON et al., 2005; BUTTIMER et al., 2017).

Na técnica de *pour plate*, 100 µL do SCLC previamente filtrado em membrana de 0,22 µm foram misturados com 100 µL de suspensão da bactéria indicadora *E. faecalis* adicionados a 7 mL de meio BHI semissólido (0,7%). A mistura foi vertida sobre uma fina camada de ágar BHI em placas de Petri, formando uma sobrecamada. Foram testados os seguintes tratamentos: SCLC com pH ajustado para 6,0, SCLC tratado termicamente a 80 °C por 10 minutos e SCLC autoclavado a 121 °C por 15 minutos, além de um controle negativo contendo apenas o indicador.

Na técnica de microgota, 100 µL da bactéria indicadora foram adicionados a 7 mL de BHI semissólido e vertidos sobre placas contendo uma fina camada de ágar BHI. Após a solidificação, alíquotas de 10 µL de SCLC dos mesmos tratamentos descritos anteriormente foram aplicadas diretamente sobre a superfície da camada sólida. Placas controle negativas, contendo apenas a bactéria indicadora, foram preparadas utilizando o mesmo procedimento.

Todas as placas, para ambas as técnicas, foram incubadas a 35 °C por 24 horas para observação dos resultados, considerando os critérios para identificação de atividade fagolítica, descritos por Hudson et al. (2005) e Rogovski et al. (2021).

Essa abordagem foi conduzida para eliminar a possibilidade de que bacteriófagos fossem responsáveis pela atividade antimicrobiana observada no SCLC, considerando a ausência de halos de lise como indicativo de não atuação de fagos, em consonância com métodos descritos na literatura (BUTTIMER et al., 2017).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Isolamento, diversidade genética e identificação das bactérias ácido-láticas

A análise microscópica e bioquímica dos isolados obtidos a partir das amostras de leite orgânico resultou na seleção de 58 colônias com características típicas de BAL, todas Gram-positivas e catalase-negativas em forma de coco ou bastonete. Com base na análise de variabilidade genética, 24 linhagens geneticamente distintas foram selecionadas.

A identificação taxonômica das 24 linhagens distintas por espectrometria de massa MALDI-TOF revelou a presença de *E. italicus* (n=7), *Lactococcus lactis* (n=5), *Leuconostoc lactis* (n=3), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (n=2), *E. faecalis* (n=3), *Enterococcus gallinarum* (n=2) e *Lactococcus garvieae* (n=1). Uma linhagem em forma de coco não pôde ser identificada com precisão.

3.3.2 Teste de antagonismo pelo método *spot-on-the-lawn*

Dentre as 24 linhagens, 15 (62,5%) apresentaram halos de inibição ≥ 2 mm, indicando atividade antagonista relevante contra os patógenos testados, como pode ser analisado na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade antagonista contra os patógenos testados expressa como intervalo de halos de inibição (H/C), em milímetros, observados para cada espécie de BAL isolada de leite produzido em sistema orgânico

Espécie de BAL	Bactéria indicadora	Intervalo de Relação Halo/Colônia (mm)
----------------	---------------------	---

<i>Enterococcus italicus</i> (n=7)	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.14–2.26
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1.40–2.31
	<i>Escherichia coli</i>	1.67–2.72
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1.34–2.85
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.35–2.00
	<i>Streptococcus uberis</i>	1.41–2.29
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.41–2.17
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.15–2.25
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=3)	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.97–2.26
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1.93–2.45
	<i>Escherichia coli</i>	2.88–3.10
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2.05–2.38
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.75–2.03
	<i>Streptococcus uberis</i>	2.05–2.44
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.75–2.10
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.67–1.80
<i>Enterococcus gallinarum</i> (n=2)	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.45–1.50
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0–0.58
	<i>Escherichia coli</i>	1.53–1.84

	<i>Listeria monocytogenes</i>	1.34-1.57
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.21-0.72
	<i>Streptococcus uberis</i>	0.34-1.03
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.42-1.44
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0
<i>Lactococcus lactis</i> (n=5)	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.94–2.34
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1.55–2.45
	<i>Escherichia coli</i>	1.96–3.44
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1.83–2.62
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.57–2.25
	<i>Streptococcus uberis</i>	1.65–2.05
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.65–2.03
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.30–1.70
<i>Lactococcus garvieae</i> (n=1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.11
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1.94
	<i>Escherichia coli</i>	2.96
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1.90
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.70
	<i>Streptococcus uberis</i>	1.65
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.62

	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.60
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (n=2)	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.00-2.02
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1.78-1.96
	<i>Escherichia coli</i>	2.50-2.67
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2.37-2.59
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.25-2.32
	<i>Streptococcus uberis</i>	1.65-1.68
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.70-1.93
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.27-1.60
<i>Leuconostoc lactis</i> (n=3)	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.70–2.18
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1.57–2.17
	<i>Escherichia coli</i>	1.75–2.88
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1.74–2.36
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.55–2.25
	<i>Streptococcus uberis</i>	1.80–2.10
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.75–2.10
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.36–1.58

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

E. italicus, *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc lactis* destacaram-se contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, enquanto *Lactococcus lactis* e *E. faecalis* exibiram maior eficácia frente a *S. agalactiae*. Contra *E. coli*, *E. italicus*, *L. pseudomesenteroides* e *Lactococcus lactis* apresentaram os melhores resultados. Já

S. dysgalactiae e *S. uberis*, *E. italicus* e *Lactococcus lactis* demonstraram os maiores índices de inibição. Por fim, contra *S. epidermidis* e *E. faecalis*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis* e *E. italicus* tiveram os melhores desempenhos.

3.3.3 Pesquisa por moléculas antimicrobianas de natureza proteica

A maioria das linhagens de BAL que demonstraram atividade antimicrobiana mantiveram essa ação mesmo após a aplicação de enzimas proteolíticas e amilolíticas, sugerindo que, na maior parte dos casos, os compostos inibitórios não eram de natureza proteica. Contudo, a linhagem número 6 (*Enterococcus italicus*) destacou-se como a única linhagem cuja atividade antimicrobiana foi eliminada no local de aplicação das diferentes enzimas (proteinase K, pepsina e amilase) sugerindo a presença de uma possível molécula de natureza proteica, com sua ação sendo especificamente inibida pelas enzimas nas áreas tratadas (Figura 1).

Figura 1 - Evidência de atividade antimicrobiana da linhagem número 6 (*E. italicus*) contra *E. faecalis* mediada por bacteriocina



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Observa-se um halo de inibição em forma de meia-lua ao redor da colônia produtora. A aplicação localizada de proteinase K no interior do halo resultou no crescimento do microrganismo indicador no ponto tratado (sinalizado pela seta vermelha), sugerindo que o composto inibitório é de natureza proteica, compatível com a ação de uma bacteriocina

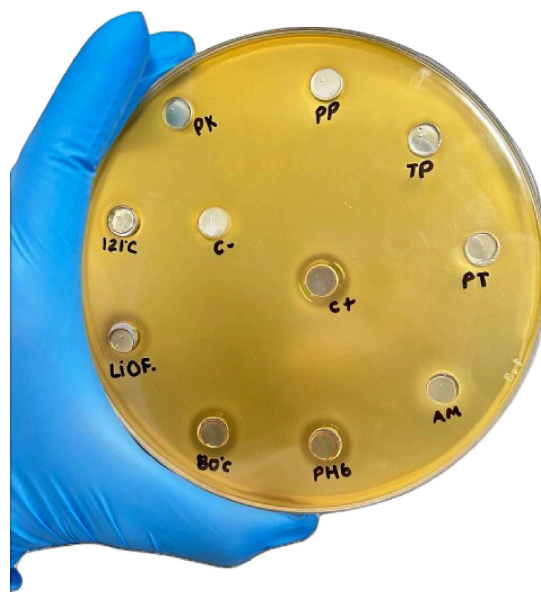
3.3.4 Caracterização parcial da substância antimicrobiana no sobrenadante da cultura *Enterococcus italicus* 6 livre de células (SCLC)

Nos ensaios em que foi usado o SCLC controle positivo, sem tratamentos, observou-se halo de inibição de 16 mm contra *Enterococcus faecalis*, enquanto o controle negativo (caldo MRS) não exibiu atividade (Figura 2).

Após a liofilização, o SCLC apresentou o maior halo de inibição (18 mm). O ajuste de pH para 6,0 e o tratamento térmico a 80 °C por 10 minutos resultaram em halos de 15 mm, indicando manutenção da atividade antimicrobiana. Entretanto, o tratamento térmico a 121 °C por 15 minutos reduziu a inibição para 13 mm.

Quando submetido a enzimas proteolíticas e amilolítica (tripsina, protease, proteinase K, pepsina e amilase), o SCLC não exibiu halos de inibição, indicando a degradação da substância antimicrobiana. Esses resultados confirmam que a molécula inibitória é de natureza proteica, possivelmente uma bacteriocina, com estabilidade considerável ao aumento de pH e tratamentos térmicos moderados.

Figura 2 - Ensaio de atividade antimicrobiana do sobrenadante da cultura livre de células (SCLC) da linhagem *Enterococcus italicus* 6 contra *Enterococcus faecalis*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os poços contêm os diferentes tratamentos aplicados ao SCLC: C+ (controle positivo - SCLC da BAL sem nenhum tratamento), C- (controle negativo - caldo MRS estéril), SCLC liofilizado, SCLC ajustado para pH 6,0, SCLC tratado a 80 °C, SCLC tratado a 121 °C e SCLC tratado com enzimas proteolíticas (tripsina, protease, proteinase K, pepsina e amilase). Os halos de inibição indicam a presença de atividade antimicrobiana, enquanto a ausência de halos nos poços com enzimas confirma a degradação da substância inibitória, sugerindo tratar-se de uma molécula de natureza proteica.

3.3.5 Teste de lise para exclusão da ação de bacteriófagos

Em ambas as metodologias aplicadas, os tratamentos realizados no SCLC (pH 6,0, autoclavado a 121 °C/15 minutos, tratado a 80 °C/10 minutos) e o controle negativo não apresentaram evidências de formação de placas de lise.

Na técnica de *pour plate*, foi observado crescimento confluyente da bactéria indicadora formando um tapete em todas as placas, de modo similar ao observado para o controle negativo. De forma semelhante, na técnica de microgota, não houve áreas de lise no meio, indicando ausência de atividade fagocítica no SCLC testado. Esses resultados excluem a possibilidade da atividade antimicrobiana observada no SCLC ser devida à presença de bacteriófagos.

3.4 DISCUSSÃO

O isolamento e a identificação de BAL provenientes de leite orgânico confirmaram a presença de uma microbiota diversificada, incluindo espécies como *Enterococcus italicus*, *Lactococcus lactis*, e *Leuconostoc lactis*. A diversidade genética dentro de populações de BAL pode estar associada a características específicas de ambientes de produção, como o leite orgânico, que pode abrigar microbiotas mais heterogêneas devido ao menor uso de antibióticos no sistema (MOKOENA, 2017; PAIVA et al., 2024). BAL são componentes-chave na microbiota de produtos lácteos, contribuindo para características sensoriais e de segurança dos alimentos (KHALID, 2011; WANG et al., 2021). Nesse sentido, *Lactococcus lactis* destaca-se como espécie tecnologicamente relevante por sua habilidade de acidificar rapidamente o meio e produzir compostos voláteis que influenciam positivamente sabor e aroma (LEROY; DE VUYST, 2004), enquanto *E. italicus*, embora menos explorado, tem sido isolado de ambientes lácteos e demonstrado potencial para produção de bacteriocinas com atividade antimicrobiana (NACEF et al., 2017).

A identificação das espécies por MALDI-TOF destacou *E. italicus* como uma espécie predominante, esta espécie está associada a ambientes ricos em nutrientes, como leite cru, e possui características adaptativas para sobreviver em condições variáveis de pH e temperatura (NACEF et al., 2017). Outras espécies identificadas, como *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc lactis*, são conhecidas por sua aplicação na indústria de alimentos devido à capacidade de produzir compostos bioativos com propriedades antimicrobianas (DAS; GOYAL, 2011; SAID et al., 2019).

A linhagem 6, identificado como *E. italicus*, destacou-se nos testes de antagonismo in vitro por sua atividade antimicrobiana consistente contra patógenos relevantes, incluindo *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Essa linhagem apresentou relações de halo/colônia superiores a 2 mm, evidenciando sua capacidade de produzir compostos bioativos. Embora não existam, até o momento, estudos específicos sobre a atividade antimicrobiana de *E. italicus*, o gênero *Enterococcus* é amplamente reconhecido por incluir espécies produtoras de bacteriocinas conhecidas como enterocinas, as quais têm demonstrado eficácia contra patógenos alimentares como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.* (FRANZ et al., 2007; NES et al., 2007). As enterocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos por espécies de *Enterococcus*, que atuam principalmente formando poros na membrana plasmática das bactérias-alvo, levando à perda de integridade celular, vazamento de conteúdo citoplasmático e morte celular (KASIMIN et al., 2022). A diversidade e estabilidade destas enterocinas as tornam candidatas promissoras para uso em bioproteção de alimentos, sendo compatíveis com as características observadas nesta linhagem.

Além de *E. italicus* 6, outras linhagens de BAL apresentaram atividade antimicrobiana relevante nos testes de antagonismo in vitro. Especificamente, cepas de *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc lactis* demonstraram capacidade de inibir o crescimento de patógenos como *S. aureus* e *L. monocytogenes*, embora com halos de inibição menores. A atividade antagonista dessas espécies pode estar relacionada à produção de metabólitos como ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, como já descrito na literatura para essas BAL (PARADA et al., 2007; HWANG et al., 2018). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram achados anteriores que evidenciam o potencial antimicrobiano de BAL, em especial do gênero *Enterococcus*. Estudos como o de Nacef et al. (2017) demonstraram que determinadas espécies desse gênero são capazes de inibir patógenos alimentares por meio da produção de bacteriocinas, reforçando os dados observados na presente pesquisa.

A hipótese de que a atividade antimicrobiana observada no presente trabalho esteja relacionada à produção de bacteriocinas foi sustentada de modo conclusivo por um conjunto de evidências experimentais. Primeiramente, foi demonstrado que a substância responsável pela inibição possui natureza proteica, uma vez que sua atividade foi eliminada após tratamento com enzimas proteolíticas, como proteinase

K e pepsina. Sendo este um critério clássico na caracterização de bacteriocinas, pois esses peptídeos antimicrobianos são sensíveis à ação de proteases (LEWUS; MONTVILLE, 1991).

Além disso, a análise do SCLC revelou que a substância inibitória apresenta estabilidade frente ao aumento de pH e diferentes binômios de tempo e temperatura. A manutenção da atividade antimicrobiana após exposição a temperaturas elevadas (80 °C por 10 minutos e 121 °C por 15 minutos) e aumento de pH (pH 6,0) está de acordo com o perfil de estabilidade comumente descrito para diversas bacteriocinas, o que amplia seu potencial para aplicação em sistemas alimentares, especialmente em produtos processados (DE MARTINIS; FRANCO, 1998).

Outro aspecto relevante foi a exclusão da possibilidade de envolvimento de bacteriófagos na atividade inibitória observada. Ensaio específicos confirmaram a ausência de halos de lise típicos de fagos, reforçando que a ação antimicrobiana é de origem bacteriana e não relacionada à lise viral.

De Martinis e Franco (1998) observaram que bacteriocinas contidas em sobrenadante livre de células mantêm atividade após exposição a 100 °C e variações de pH, comportamento consistente com nossa linhagem teste. De forma semelhante, Franz et al. (1996) relataram a termoestabilidade e estabilidade de enterocinas em diferentes pH, o que está diretamente alinhado com os achados do presente estudo, em que o SCLC manteve sua atividade antimicrobiana sob condições semelhantes.

Embora muitas enterocinas apresentem termoestabilidade, essa não é uma característica universal. A termoestabilidade varia entre as diferentes classes de enterocinas, principalmente devido à estrutura e composição peptídica. As enterocinas da classe I (bacteriocinas modificadas pós-traducionalmente), como as lantibióticas, geralmente são mais termoestáveis, suportando temperaturas superiores a 100 °C. Já as enterocinas da classe II (peptídeos pequenos não modificados) apresentam estabilidade variável: algumas mantêm atividade a 100 °C, enquanto outras perdem a função sob aquecimento intenso. A classe III, composta por proteínas maiores (>10 kDa), é geralmente termo-lábil (DRIDER et al., 2006; OUOBA et al., 2008; KASIMIN et al., 2022).

A presença de atividade antagonista em diferentes gêneros reforça o potencial bioprotetor das BAL isoladas de leite orgânico e destaca a importância de investigar os mecanismos específicos envolvidos, visto que diferentes compostos

podem atuar de forma sinérgica na inibição de microrganismos indesejáveis. Embora o foco deste trabalho tenha sido a caracterização de uma linhagem específica de *E. italicus*, as demais linhagens representam candidatas promissoras para estudos futuros de purificação e identificação de substâncias bioativas.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou que o leite orgânico é uma fonte valiosa para a prospecção de bactérias ácido-láticas com potencial biotecnológico. Entre as linhagens avaliadas, 62,5% apresentaram atividade antagonista frente a pelo menos um dos microrganismos indicadores testados, sendo *L. monocytogenes* e *S. aureus* os patógenos mais frequentemente inibidos. Espécies como *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc lactis* também demonstraram potencial inibitório, ainda que com halos menores em comparação à linhagem mais ativa. Esses dados reforçam a diversidade funcional das BAL provenientes de sistemas orgânicos e sua relevância como fontes de compostos antimicrobianos naturais. O estudo também culminou no isolamento e caracterização de uma linhagem de *E. italicus*, produtora de bacteriocina com atividade inibitória contra patógenos de grande relevância para a segurança de alimentos, como *L. monocytogenes* e *S. aureus*. A estabilidade térmica e em diferentes condições de pH desta substância antimicrobiana evidencia sua capacidade como bioconservante natural. Conclui-se, portanto, que *E. italicus* se demonstrou promissor para o desenvolvimento de estratégias de bioconservação, demandando ensaios adicionais relacionados a sua inocuidade, bem como, para a elucidação de sua aplicabilidade e funcionamento em alimentos e sob condições reais de processos e produtos industriais.

REFERÊNCIAS

- AONO, N. M. **Diferenciação do leite convencional e orgânico, por análises de isótopos estáveis e de compostos antioxidantes**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo, 2014.
- BUTTIMER, C.; McAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C.; O'MAHONY, J.; COFFEY, A. Bacteriophages and bacterial plant diseases. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, p. 34, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034>
- CLEVELAND, J.; MONTIVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1–20, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8)
- DAS, D.; GOYAL, A. Lactic Acid Bacteria in Food Industry. In: **Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology**. [S. l.: s. n.], 2011.
- DE MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in pork product by *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 119-126, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00059-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00059-2).
- DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L. M.; PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 70, n. 2, p. 564–582, 2006. DOI: 10.1128/MMBR.00016-05.
- FRANZ, C. M.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 29, n. 2-3, p. 255-270, 1996.
- FRANZ, C. M.; VAN BELKUM, M. J.; HOLZAPFEL, W. H.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 293–310, 2007. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x.
- GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 31-36, 2001.
- HAMMAMI, R.; FLISS, I.; CORSETTI, A. Editorial: Application of Protective Cultures and Bacteriocins for Food Biopreservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-4, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01561>.
- HWANG, I. C.; OH, J. K.; KIM, S. H.; OH, S.; KANG, D. K. Isolation and Characterization of an Anti-listerial Bacteriocin from *Leuconostoc lactis* SD501.

Korean Journal for Food Science of Animal Resources, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 1008-1018, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e33>

HUDSON, J. A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 2, p. 426-437, 2005. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.2.426>

KASIMIN, M. E.; SHAMSUDDIN, S.; MOLUJIN, A. M.; SABULLAH, M. K.; GANSAU, J. A.; JAWAN, R. Enterocin: Promising Biopreservative Produced by Enterococcus sp. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 3446, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040684>.

KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences**, v. 1, p. 1-13, 2011.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology Methods**, v. 13, p. 145-150, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90014-H](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90014-H).

MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1255, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>

NACEF, M.; CHEVALIER, M.; CHOLLET, S.; DRIDER, D.; FLAHAUT, C. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the Maroilles. **International Journal of Food Microbiology**, 247, p.2-8, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>. PMID:27423415.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HOLO, H. Bacteriocin diversity in Streptococcus and Enterococcus. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 189, n. 4, p. 1189–1198, 2007. DOI: 10.1128/JB.01254-06.

OUOBA, L. I. I.; LEI, V.; JENSEN, L. B. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria to antimicrobials, and lactic acid bacteria isolated from food. **Food Control**, [S. l.], v. 19, n. 9, p. 835–841, 2008.

PAIVA, N. M. L.; RIBEIRO, S. C.; ROSA, H. J. D.; SILVA, C. C. G. Comparative study of the bacterial community of organic and conventional cow's milk. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 120, p. 104488, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104488>

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 521-542, maio/jun. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000300018>

ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; BONATTO, C.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; ELMAHDY, E. M.; TREICHEL, H.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G. Uses of bacteriophages as bacterial control tools and environmental safety indicators. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 12, p. 793135, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.793135>

SAID, L. B.; GAUDREAU, H.; DALLAIRE, L.; TESSIER, M.; FLISS, I. Bioprotective culture: A new generation of food additives. **Industrial Biotechnology**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 138-147, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1089/ind.2019.29175.lbs>

SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. **Annual Review of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 4, p. 347-368, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182541>

SUREKHA, M.; REDDY, S. M. Preservatives: Classification and properties. In: ROBINSON, R. K. (ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. [S. l.]: Academic Press, 2014. v. 3, p. 217-224.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Bacteriological Reviews**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TODOROV, S. D.; ALMEIDA, D. P.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for *Lactobacillus acidophilus* La-14, a potential probiotic strain. **New Microbiologica**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 357-370, 2011.

VERSALOVIC, J. BRUJIN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based Polymerase Chain Reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

WANG, Y.; WU, J.; LV, M.; SHAO, Z.; HUNGWE, M.; WANG, J.; BAI, X.; XIE, J.; WANG, Y.; GENG, W. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 9, p. 612285, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

WASSIE, M.; WASSIE, T. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, [S. l.], v. 3, n. 8, p. 44-49, 2016.

WISHNA-KADAWARAGE, R. N.; HICKEY, R. M.; SIWEK, M. In-vitro selection of lactic acid bacteria to combat *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 133, 2024. Publicado em 14 mar. 2024. DOI: 10.1007/s11274-024-03946-8.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a relevância de leite cru, especialmente de sistemas de produção orgânica, como fonte promissora de linhagens de BAL com potencial aplicação tecnológica e segurança microbiológica. A análise comparativa entre os sistemas de produção orgânico e convencional no estado do Rio de Janeiro, revelou diversidade genética significativa entre as linhagens, com predominância dos gêneros *Enterococcus* e *Lactococcus*. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas nos perfis de resistência antimicrobiana entre os sistemas avaliados, a ausência de genes de resistência pesquisados sugere baixo risco de transferência gênica, reforçando a segurança dessas linhagens para uso em alimentos.

Além disso, a caracterização de uma substância antimicrobiana produzida por *Enterococcus italicus* isolado do leite orgânico, com sensibilidade a enzimas proteolíticas e estabilidade frente ao aumento de pH e variações de temperatura, indica a produção de uma bacteriocina funcional, com aplicação potencial na biopreservação de produtos lácteos.

Assim, os dados reunidos contribuem para o avanço do conhecimento sobre a microbiota do leite orgânico, demonstram a viabilidade da utilização de BAL como culturas bioprotetoras e reforçam a importância do monitoramento da resistência antimicrobiana em linhagens com uso potencial em alimentos. Estudos futuros devem considerar a ampliação da amostragem, o rastreamento de outros genes de resistência e a caracterização completa dos compostos antimicrobianos produzidos, visando maior aplicabilidade industrial e segurança no alimento.

REFERÊNCIAS

AGER, E. O.; CARVALHO, T.; SILVA, E. M.; RICKE, S. C.; HITE, J. L. Global trends in antimicrobial resistance on organic and conventional farms. **Scientific Reports**, v. 13, n. 22608, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-47862-7.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre a comprovação de segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília, DF: ANVISA, 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujx0NI8uVgt/content/id/35791206/do1-2018-07-31-resolucao-da-diretoria-colegiada-n-241-de-26-de-julho-de-2018-35791024. Acesso em: 31 jul. 2025.

ALMEIDA, P. A. A. **Desenvolvimento e avaliação de método molecular baseado em PCR multiplex para detecção de genes de resistência a antimicrobianos relevantes para o controle da mastite bovina**. 2018. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resistência antimicrobiana é ameaça global, diz OMS. Brasília, DF, [s.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global-diz-oms>. Acesso em: 30 jun. 2025.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 839, de 14 de dezembro de 2023**. Dispõe sobre a comprovação de segurança e a autorização de uso de novos alimentos e novos ingredientes. Brasília, DF: ANVISA, 2023. Disponível em: <https://anvisa.gov.br/legis/datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&tipo=RDC&numeroAto=00000839&seqAto=000&valorAno=2023&orgao=RDC/DC/ANVISA/MS>. Acesso em: 31 jul. 2025.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 843, de 22 de fevereiro de 2024**. Dispõe sobre a regularização de alimentos e embalagens sob competência do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) destinados à oferta no território nacional. Brasília, DF: ANVISA, 2024. Disponível em: https://anvisa.gov.br/legis/datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&tipo=RDC&numeroAto=00000843&seqAto=000&valorAno=2024&orgao=RDC/DC/ANVISA/MS&codTipo=&desItem=&desItemFim=&cod_menu=1696&cod_modulo=134&pesquisa=true. Acesso em: 31 jul. 2025.

AONO, N. M. **Diferenciação do leite convencional e orgânico, por análises de isótopos estáveis e de compostos antioxidantes**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo, 2014.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal, 2013.

BELÉN FLÓREZ, A. B.; DELGADO, S.; MAYO, B. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 51-58, 2005.

BORELLI, E.; ELLIS, K.; TOMLINSON, M.; HUGHES, K.; ZINN, C. E.; WALLACE, R. J.; SMITH, D. Antimicrobial usage and resistance in Scottish dairy herds: a survey of farmers' knowledge, behaviours and attitudes. *BMC Veterinary Research*, v. 19, n. 72, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03625-0>. Acesso em: 31 jul. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). **Instrução Normativa SDA Nº 46, de 6 de outubro de 2011**. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção, bem como as listas de substâncias e práticas permitidas para uso nestes sistemas. Brasília, DF: MAPA, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011-producao-vegetal-e-animal-regulada-pela-in-17-2014.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2025.

BUTTIMER, C.; MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C.; O'MAHONY, J.; COFFEY, A. Bacteriophages and bacterial plant diseases. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, p. 34, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034>.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; CONNOR, E. P. O.; COLLINS, J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic **Lactobacillus** species. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.

CHEN, X.; BAI, H.; MO, W.; ZHENG, X.; CHEN, H.; YIN, Y.; LIAO, Y.; CHEN, Z.; SHI, Q.; ZUO, Z.; LIANG, Z.; PENG, H. Lactic Acid Bacteria Bacteriocins: Safe and Effective Antimicrobial Agents. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 4124, 2025. DOI: 10.3390/ijms26094124.

CLEVELAND, J.; MONTIVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8).

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 33. ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: CLSI, 2023.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005. DOI: 10.1038/nrmicro1273.

DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of **Lactobacillus** spp. to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 1-11, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00254-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00254-4).

DAS, D.; GOYAL, A. Lactic acid bacteria in food industry. In: **Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology**. [S. l.: s. n.], 2011. p. 757-772.

DE MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of **Listeria monocytogenes** in pork product by **Lactobacillus sake** strain. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 119-126, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00059-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00059-2).

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005. DOI: 10.1093/ps/84.4.634.

DO NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; DE CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L. M.; PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 70, n. 2, p. 564–582, 2006. DOI: 10.1128/MMBR.00016-05.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Observatório do Leite Orgânico**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023. Disponível em: <http://leiteorganico.cnpqi.embrapa.br>. Acesso em: 30 jun. 2025.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of Food and Agriculture 2024: Value-driven transformation of agrifood systems**. Rome: FAO, 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/publications/sofa/2024/en>. Acesso em: 30 jun. 2025.

FAO; WHO (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). **Sustainable healthy diets – Guiding principles**. Rome: FAO & WHO, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/3/ca6640en/ca6640en.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2025.

FAO; WOAH (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL). **Regional Guidelines for the Monitoring and Surveillance of Antimicrobial Resistance, Use and Residues in Food and Agriculture – Volume 5: Monitoring antimicrobial use at the farm level**. Bangkok: FAO & World Organisation for Animal Health, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cc8807en>. Acesso em: 1 jul. 2025.

FERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-SANTIAGO, S.; GUINEA, J.; MARTÍNEZ, J. L. Mechanisms of resistance to chloramphenicol in **Pseudomonas putida** KT2440. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1001-1009, 2012. DOI: 10.1128/AAC.05398-11.

FLORIS, I.; BATTISTINI, R.; TRAMUTA, C.; GARCIA-VOZMEDIANO, A.; MUSOLINO, N.; SCARDINO, G.; BIANCHI, D. M. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria from dairy products in Northern Italy. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 4, p. 375, 2025. DOI: 10.3390/antibiotics14040375.

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. 2. ed. New York: Springer, 2017.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 3-11, 2009.

FRANZ, C. M.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by **Enterococcus faecium** BFE 900 from black olives. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 29, n. 2-3, p. 255-270, 1996.

FRANZ, C. M.; VAN BELKUM, M. J.; HOLZAPFEL, W. H.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 293–310, 2007. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x.

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, n. 1, p. 25-34, 2014.

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106-117, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>.

GARCÍA-DÍEZ, J.; SARAIVA, C. Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 2544, 2021. DOI: 10.3390/ijerph18052544.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of **Lactobacillus** species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 31-36, 2001.

GILLINGS, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 4, 2013. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00004.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, F.; DELGADO, S.; RUIZ, L.; MARGOLLES, A.; RUAS-MADIEDO, P. Functional bacterial cultures for dairy applications: Towards improving safety, quality, nutritional and health benefit aspects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 1, p. 212-229, 2022. DOI: 10.1111/jam.15510.

GRAM, H. C. Über die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. **Fortschritte der Medizin**, v. 2, p. 185–189, 1884.

GUEIMONDE, M.; SÁNCHEZ, B.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G.; MARGOLLES, A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 202, 2013. DOI: [10.3389/fmicb.2013.00202](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202).

HAMMAMI, R.; FLISS, I.; CORSETTI, A. Editorial: Application of protective cultures and bacteriocins for food biopreservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-4, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01561>.

HASSAN, A. M.; EL-BAKKUSH, A. A.; EL-SHAFEI, K.; EL-SHOUBAGY, G. A.; EL-AZIZ, N. M. A. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 25-34, 2014.

HERMANN, G.; MÜLLER, E. E.; SULERES, C.; FARIAS, B. T.; NUNES, E. C. A. Isolamento e identificação de bactérias lácticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 191-196, 2013.

HUDSON, J. A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 2, p. 426-437, 2005. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.2.426>.

HUMMEL, A. S.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 730-739, 2007. DOI: 10.1128/AEM.02105-06.

HWANG, I. C.; OH, J. K.; KIM, S. H.; OH, S.; KANG, D. K. Isolation and characterization of an anti-listerial bacteriocin from *Leuconostoc lactis* SD501. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 38, n. 5, p. 1008-1018, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e33>.

KASIMIN, M. E.; SHAMSUDDIN, S.; MOLUJIN, A. M.; SABULLAH, M. K.; GANSAU, J. A.; JAWAN, R. Enterocin: Promising Biopreservative Produced by Enterococcus sp. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 3446, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040684>.

KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences**, v. 1, p. 1-13, 2011.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; MÜLLER-BERTLING, S.; REISSBRODT, R.; HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; GOOSSENS, H.; WITTE, W. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci, and Bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8982–8986, 2005. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8982-8986.2005.

LEMCKE, R.; BÜLTE, M. Occurrence of the vancomycin-resistant genes vanA, vanB, vanC1, vanC2 and vanC3 in **Enterococcus** strains isolated from poultry and pork. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2-3, p. 185–194, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00310-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00310-x).

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology Methods**, v. 13, p. 145-150, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90014-H](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90014-H).

LIMA, R. C.; CAVALCANTI, M. I. R. S.; AZEVEDO, R. A. de; XAVIER, L. H. C.; GUIMARÃES, C. de A. S. Atividade antagonista e perfil de resistência a antibióticos de bactérias ácido-láticas isoladas de frutas tropicais. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2016.

LINA, G.; QUAGLIA, A.; REVERDY, M. E.; LECLERCQ, R.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1062–1066, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1062>.

LOEW, O. A new enzyme of general occurrence in organisms. **Science (New York, N.Y.)**, v. 11, n. 279, p. 701–702, 1900. DOI: 10.1126/science.11.279.701.

LUNARDI, A.; VIVIAN, L.; PERUSSOLO, F.; CARPES, S. T. Bactérias ácido-láticas não iniciadoras (NSLAB): Um desafio à indústria do queijo. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 3, p. 26383-26409, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n3-372.

MACHADO, F. S.; DINIZ, F. H.; PIRES, M. de F. A.; SOARES, J. P. G. **Leite orgânico: regulamentação para a pecuária leiteira orgânica no Brasil**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2022. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1146062/1/Boletim-268-Leite-organico-regulamentacao-para-a-pecuaria-leiteira-organica-no-Brasil.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2025.

MACHADO, T. F. **Potencial uso de bacteriocinas na conservação de alimentos**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2023. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1151945/1/DOC-199.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2025.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; SCHAFFNER, F.; VAARA, M. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An

international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

MAYRHOFFER, S.; ZITZ, U.; BIRRU, F. H.; GOLLAN, D.; GOŁOŚ, A. K.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J. Comparison of the CLSI guideline and ISO/IDF standard for antimicrobial susceptibility testing of lactobacilli. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 6, p. 591–603, 2014. DOI: 10.1089/mdr.2013.0189.

MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1255, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>.

NACEF, M.; CHEVALIER, M.; CHOLLET, S.; DRIDER, D.; FLAHAUT, C. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the Maroilles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 247, p. 2-8, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>.

NALEPA, B.; MARKIEWICZ, L. H. Microbiological biodiversity of regional cow, goat and ewe milk cheeses produced in Poland and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from them. **Animals**, v. 13, n. 1, p. 168, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13010168>.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HOLO, H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 189, n. 4, p. 1189–1198, 2007. DOI: 10.1128/JB.01254-06.

NG, L. K.; MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, n. 4, p. 209–215, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363>.

OIKONOMOU, G.; BICALHO, M. L.; MEIRA JUNIOR, E.; ROSSI, R. E.; FODITSCH, C.; MACHADO, V. S.; BICALHO, R. C. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically infected quarters. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. e85904, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0085904.

OUOBA, L. I. I.; LEI, V.; JENSEN, L. B. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria to antimicrobials, and lactic acid bacteria isolated from food. **Food Control**, [S. l.], v. 19, n. 9, p. 835–841, 2008.

PAIVA, N. M. L.; RIBEIRO, S. C.; ROSA, H. J. D.; SILVA, C. C. G. Comparative study of the bacterial community of organic and conventional cow's milk. **Food Microbiology**, v. 120, p. 104488, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104488>.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 521-542, maio/jun. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000300018>.

PITTA, D. W.; INDUGU, N.; TOTH, J. D.; BENDER, J. S.; BAKER, L. D.; HENNESSY, M. L.; VECCHIARELLI, B.; ACETO, H.; DOU, Z. The distribution of microbiomes and resistomes across farm environments in conventional and organic dairy herds in Pennsylvania. **Environmental Microbiome**, v. 15, n. 1, p. 21, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00368-5>.

PORCELLATO, D.; MOREIRA, L. P. D.; FRANKLIN, F. V.; DUARTE, V. da S.; ØYAAS, J.; SVALESTAD, F.; SKEIE, S. Impact of microbial milk quality on mesophilic starter culture metabolism: A metaproteomics approach. **International Dairy Journal**, v. 159, p. 106070, 2024. DOI: 10.1016/j.idairyj.2024.106070.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.

ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; BONATTO, C.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; ELMAHDY, E. M.; TREICHEL, H.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G. Uses of bacteriophages as bacterial control tools and environmental safety indicators. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 793135, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.793135>.

SABO, S. S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J. D. M.; OLIVEIRA, R. P. S. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.

SABUNEVICA, S.; ZAGORSKA, J. Organic milk as medium for lactic acid bacteria growth: a review. **Rural Sustainability Research**, v. 49, n. 344, p. 73-86, 2023. DOI: 10.2478/plua-2023-0010.

SAID, L. B.; GAUDREAU, H.; DALLAIRE, L.; TESSIER, M.; FLISS, I. Bioprotective culture: a new generation of food additives. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 138-147, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1089/ind.2019.29175.lbs>.

SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 347-368, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182541>.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691-697, 2010.

SHARMA, C.; KAUR, S.; SINGH, A.; SACHDEV, A. Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 237, 2018. DOI: 10.3389/fvets.2017.00237.

SILVA, J. F. M.; ALONSO, B. V.; ALMEIDA, P. A. A.; BARBOSA, I. V.; PAULA, O. A. B. de; BARBOSA, L. R.; BRUNO, L. M.; MENEZES, L. D. M.; SILVA, M. R.; COSTA, G. M. da; RODARTE, M. P.; RIBEIRO, J. B. Searching for antibiotic-susceptible bioprotective lactic acid bacteria to control dangerous biological agents in artisanal

cheese. **Food Microbiology**, v. 130, p. 104762, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104762>.

SILVA, L. J. M. da. **Isolamento e caracterização bioquímica das bactérias do ácido láctico do queijo São Jorge DOP**. 2012. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, Portugal, 2012.

STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G.; WITTE, W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in **Staphylococcus aureus**. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4089–4094, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003>.

SUREKHA, M.; REDDY, S. M. Preservatives: classification and properties. In: ROBINSON, R. K. (ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. [S. l.]: Academic Press, 2014. v. 3, p. 217-224.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TAYE, Y.; DEGU, T.; FESSEHA, H.; MATHEWOS, M. Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. **The Scientific World Journal**, v. 2021, p. 4697445, 2021. DOI: 10.1155/2021/4697445.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. S3–S10, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>.

TODOROV, S. D.; ALMEIDA, D. P.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for **Lactobacillus acidophilus** La-14, a potential probiotic strain. **New Microbiologica**, v. 34, n. 4, p. 357-370, 2011.

TRZCINSKI, K.; COOPER, B. S.; HRYNIEWICZ, W.; DOWSON, C. G. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant **Staphylococcus aureus**. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 763–770, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/45.6.763>.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1503141112.

VANNUFFEL, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H.; VANDERCAM, B.; DELMEE, M.; WAUTERS, G.; GALA, J. L. Specific detection of methicillin-resistant **Staphylococcus** species by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2864–2867, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.33.11.2864-2867.1995>.

VAN ZYL, W. F.; DEANE, S. M.; DICKS, L. M. T. Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1831339, 2020. DOI: 10.1080/19490976.2020.1831339.

VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBÈS, C.; MONTEL, M. C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? **Food Microbiology**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 305-310, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.005>.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; BRUJIN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VESTERHOLM-NIELSEN, M.; OLHOM LARSEN, M.; ELMERDAHL OLSEN, J.; MOLLER AARESTRUP, F. Occurrence of the bla_Z gene in penicillin resistant **Staphylococcus aureus** isolated from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 40, n. 3, p. 279–286, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1186/BF03547026>.

WANG, Y.; WU, J.; LV, M.; SHAO, Z.; HUNGWE, M.; WANG, J.; BAI, X.; XIE, J.; WANG, Y.; GENG, W. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 612285, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>.

WASSIE, M.; WASSIE, T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, n. 8, p. 44-49, 2016.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 17. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2004.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals**. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550130>. Acesso em: 1 jul. 2025.

WISHNA-KADAWARAGE, R. N.; HICKEY, R. M.; SIWEK, M. In-vitro selection of lactic acid bacteria to combat *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 133, 2024. Publicado em 14 mar. 2024. DOI: 10.1007/s11274-024-03946-8.

YANG, S.; BAI, M.; KWOK, L. Y.; ZHONG, Z.; SUN, Z. The intricate symbiotic relationship between lactic acid bacterial starters in the milk fermentation ecosystem. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 728–745, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2280706>.

YANG, Y.; ZHANG, T.; CHEN, P.; ZHANG, H.; SONG, L.; LI, C.; ZHAO, Y.; LI, H.; GU, Y.; LI, M. Profiles of antibiotic resistance risk in diverse water environments.

Communications Earth & Environment, [S. l.], v. 6, n. 158, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43247-025-02139-x>.

ZACARÍAS, M. F.; BINETTI, A.; LACO, M.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G.

Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 548-555, 2011.

ZHOU, J. S.; PILLIDGE, C. J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Antibiotic susceptibility

profiles of new probiotic **Lactobacillus** and **Bifidobacterium** strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 211-217, 2005. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.011.