

# AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE COAGREGAÇÃO E ANTAGONISMO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

## EVALUATION OF THE COAGGREGATION AND ANTAGONISTIC CAPACITY OF LACTIC ACID BACTERIA

DOI: 10.65747/conali2025v1c09

Heliabe Kadmiel Mendonça Ferreira<sup>1</sup>; Matheus Oliveira Silveira<sup>1</sup>; Ana Caroline Chagas Nascimento<sup>1</sup>; Anna Giselle Cavalcanti Vaz Mendes Silva<sup>2</sup>; José Erick Galindo Gomes<sup>3</sup>; Keila Aparecida Moreira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Medicina Veterinária - UFape; <sup>2</sup>Doutoranda em Biociência Animal - UFRPE; <sup>3</sup>Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos – UFape; <sup>4</sup>Docente do Curso de Medicina Veterinária – UFape;

Contato: [heliabe.mendonca@ufape.edu.br](mailto:heliabe.mendonca@ufape.edu.br)

**Resumo:** Os produtos lácteos são alimentos de elevado valor nutricional e constituem um meio favorável para o desenvolvimento de microrganismos benéficos, como as bactérias ácido láticas, amplamente reconhecidas por seu potencial probiótico. Além da capacidade fermentativa, esses microrganismos podem atuar de maneira direta na promoção da segurança alimentar. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de coagregação e antagonismo de cepas de bactérias ácido láticas isoladas de queijos de coalho artesanais produzidos no Agreste Meridional de Pernambuco frente a microrganismos patogênicos de relevância para a indústria alimentícia. O ensaio de coagregação foi conduzido a partir da incubação de suspensões padronizadas de BAL e patógenos, sendo a atividade avaliada por espectrofotometria. A atividade antagonista foi avaliada pela exposição de patógenos a BAL previamente inativadas e posterior mensuração dos halos de inibição. Os resultados revelaram que várias cepas apresentaram índices elevados de coagregação, com destaque para a cepa A6, que atingiu 91,98% frente a *Salmonella Typhimurium*, além da cepa A4 e A8, ambas superiores a 89% contra cepas de *Listeria monocytogenes*. Com relação ao antagonismo, todas as cepas apresentaram capacidade inibitória, com destaque para as cepas A4, A6, A7 e B2. Esses achados reforçam a relevância das bactérias ácido láticas como potenciais culturas probióticas aplicáveis em alimentos funcionais, contribuindo não apenas para a inibição de patógenos, mas também para a melhoria da segurança microbiológica em derivados lácteos. Dessa forma, as cepas avaliadas apresentam elevado potencial biotecnológico, fornecendo subsídios valiosos para pesquisas futuras e aplicações inovadoras na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** patógenos; probióticos; segurança alimentar.

**Abstract:** Dairy products are nutrient-rich foods that provide a favorable environment for beneficial microorganisms, such as lactic acid bacteria (LAB), widely recognized for their probiotic potential and contribution to human health. Besides their fermentative capacity, these microorganisms can directly promote food safety. This study aimed to evaluate the coaggregation and antagonistic potential of ten LAB strains isolated from artisanal coalho cheeses produced in the Agreste Meridional region of Pernambuco, Brazil, against pathogenic microorganisms relevant to the food industry. The coaggregation assay was conducted by incubating standardized suspensions of LAB and pathogens, with activity assessed by spectrophotometry. Antagonistic activity was evaluated by

exposing pathogens to previously inactivated LAB, followed by measurement of inhibition zones. Results showed that several strains exhibited high coaggregation indices, notably strain A6, which reached 91.98% against *Salmonella Typhimurium*, and strains A4 and A8, both above 89% against *Listeria monocytogenes* strains. Regarding antagonism, all strains demonstrated inhibitory capacity, with strains A4, A6, A7, and B2 standing out. These findings reinforce the relevance of LAB as potential probiotic cultures applicable in functional foods, contributing not only to pathogen inhibition but also to improving microbiological safety in dairy products. Thus, the evaluated strains present high biotechnological potential, providing valuable support for future research and innovative applications in the food industry.

**Keywords:** pathogens; probiotics; food safety.

## INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos são alimentos considerados de alto valor nutricional para a dieta. As substâncias que fazem parte de sua composição química como lactose, proteínas, enzimas, vitaminas, sais, lipídeos, etc., também favorecem o desenvolvimento de microrganismos. Dentre estes, destacam-se as bactérias ácido lácticas (BAL), consideradas benéficas ao homem. As BAL são fundamentais no processo de fermentação dos alimentos, conferindo características organolépticas aos produtos e também produzindo substâncias antimicrobianas, capazes de preservar a vida útil do alimento, impedindo a proliferação de patógenos (1, 2).

As bactérias ácido lácticas (BAL) são definidas como Gram-positivas, em formato de bastonetes e cocos, produtoras de ácido láctico, não formadoras de esporos e catalase negativa. Estas bactérias são muito importantes para a indústria de alimentos por terem a classificação de "GRAS" (*Generally Recognized as Safe*), sendo utilizadas como culturas iniciadoras, principalmente na produção de alimentos fermentados (3, 4).

As BAL são capazes de produzir um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipídicas, que transformam os nutrientes presentes nos alimentos, em compostos com propriedades sensoriais específicas, alterando suas características organolépticas. Uma das principais fontes de bactérias ácido lácticas em derivados lácteos é o queijo de coalho artesanal, mas também podem ser encontradas nos mais diversos tipos de alimentos, como o vinho, pães, carnes e outros produtos lácteos, facilitando assim seu isolamento e identificação (5).

Vale destacar ainda que, algumas BAL são consideradas como microrganismos probióticos, ou seja, aqueles que quando consumidos em quantidade adequada, são capazes de conferir benefícios à saúde do hospedeiro, principalmente por sua atividade antagonista contra microrganismos patogênicos da microbiota intestinal, reforço da barreira intestinal, modulação do sistema imune, e integração na composição e atividade da microbiota intestinal. Neste sentido, os produtos considerados como probióticos devem apresentar características que garantam sua permanência e proliferação no trato gastrointestinal, como a resistência a ácidos, bile e aderência ao epitélio intestinal (3, 6). Ademais, algumas BAL também podem fornecer, a partir do seu processo fermentativo das matrizes alimentícias, atividades biológicas, como por exemplo, potencial antioxidante para prevenir e controlar doenças causadas pelo estresse oxidativo nos hospedeiros

(5).

As bactérias ácido lácticas são capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana, denominadas de bacteriocinas, que contribuem para a ação probiótica, aumentando ainda mais sua importância para a indústria de leite e derivados. Pesquisas demonstram que bactérias ácido lácticas produtoras de bacteriocinas impedem as cepas de bactérias patogênicas de invadir o cólon, mantendo as populações microbianas do intestino estáveis. Outros metabólitos antimicrobianos também são produzidos por essas bactérias, como os ácidos orgânicos, contribuindo para inibir a proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos. Dessa forma, a vida de prateleira de produtos fermentados produzidos com BAL, torna-se cada vez maior, garantindo a segurança alimentar dos consumidores (3, 4).

Outros fatores importantes para a capacidade probiótica das BAL estão associados a sua capacidade de agregação de células bacterianas de uma mesma espécie de BAL (autoagregação), bem como a capacidade de agregação entre diferentes espécies de BAL e/ou bactérias patogênicas (coagregação) (7). A habilidade de coagregação contribui para a capacidade inibitória contra microrganismos patogênicos, formando complexos que impedem a aderência e proliferação desses microrganismos nocivos nas mucosas do hospedeiro e em alimentos. Essa propriedade é considerada benéfica tanto do ponto de vista da saúde do hospedeiro, quanto para a qualidade de produtos lácteos probióticos (8).

A coagregação contribui para a exclusão competitiva de patógenos, uma vez que a proximidade física facilita a inibição de seu crescimento e reduz sua capacidade de aderência as superfícies intestinais ou industriais. Além disso, de um modo geral, a coagregação pode favorecer a ação sinérgica de compostos antimicrobianos produzidos pelas bactérias ácido lácticas, intensificando o efeito protetor. Através desses mecanismos, os níveis de segurança e estabilidade microbiológica do alimento são mantidos (1, 9).

A capacidade de aderência a superfícies industriais ou intestinais através da formação de biofilmes por microrganismos patogênicos é um dos maiores desafios para a indústria alimentícia. A formação de biofilmes potencializa mecanismos de sinalização celular e compartilhamento de substratos para o crescimento de colônias bacterianas patogênicas (10). Neste sentido, algumas bactérias ácido lácticas isoladas de alimentos, também são capazes de diminuir a formação desses biofilmes através da produção de bacteriocinas e metabólitos nocivos aos microrganismos patogênicos (11).

Diante do exposto, a pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial de coagregação e antagonismo de cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de coalho artesanais produzidos no Agreste Meridional de Pernambuco frente a diferentes espécies de microrganismos patogênicos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Microrganismos**

As dez cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) utilizadas para a realização deste trabalho foram isoladas previamente a partir de amostras de queijos coalho artesanais produzidos no Agreste Meridional de Pernambuco. As BAL foram armazenadas a -80 °C no Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos (LMTEB) da UFAPE.

### **Potencial de coagregação**

O teste de coagregação foi realizado de acordo com Todorov e Dicks (12). As cepas de bactérias ácidos lácticas foram ativadas em caldo MRS por 24 h a 37 °C, e as cepas de bactérias patogênicas foram ativadas em caldo BHI por 24 h a 37 °C. Para a realização desta análise, foram utilizadas como cepas patogênicas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* Scott A (ATCC 49594) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Todas as cepas foram colhidas por centrifugação (7.000 x g por 10 min a 20 °C). Em seguida, foram lavadas duas vezes e diluídas em solução salina 0,85% estéril. A suspensão celular de cada cepa, foi ajustada (DO<sub>660nm</sub> = 0,3) e transferida (1 mL) para um microtubo estéril de 2 mL. Cada cepa de BAL foi pareada com as cepas patogênicas de forma individual, sendo misturadas e incubadas aerobiamente por 60 minutos a 37 °C. Essa temperatura foi escolhida para avaliar o comportamento das cepas em temperatura corporal (37 °C). Transcorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas (300 x g por 20 min a 20 °C), e a densidade ótica do sobrenadante foi determinada a 660 nm. A porcentagem de coagregação foi calculada com base na diferença entre a densidade ótica inicial e final: %Coagregação =  $((DO_0 - DO_{60}) / DO_0) \times 100$ . As análises foram realizadas em triplicata.

### **Atividade antagonista**

O teste de antagonismo foi realizado de acordo com Tagg, *et al.* (13). As cepas de bactérias ácidos lácticas foram ativadas em caldo MRS por 24 h a 37 °C, e as cepas de bactérias patogênicas foram ativadas em caldo BHI nas mesmas condições de tempo e temperatura das BAL. Para a realização desta análise, foram utilizadas como cepas patogênicas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* Scott A (ATCC 49594) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Após o crescimento das BAL, 5 µL de cada cultivo foram colocados sobre a superfície de uma placa de Petri contendo ágar MRS e incubados por 48 h a 37 °C. Posteriormente, 1 mL de clorofórmio foi colocado sobre a superfície do meio de cultura contendo as BAL crescidas em placa de Petri, deixando-o agir por 30 minutos em temperatura ambiente sob fluxo exaustor e mais 30 minutos sobre luz ultravioleta, visando eliminar os microrganismos e permanecer apenas as substâncias inibidoras. Em seguida, foram adicionados 3,5 mL de ágar BHI semi-sólido contendo as bactérias patogênicas para cada placa onde as cepas de BAL foram cultivadas, de forma individual. As placas foram novamente incubadas por 48 horas a 37 °C, essa temperatura foi escolhida para avaliar o comportamento das

cepas em temperatura corporal. Em seguida, o halo de inibição foi medido (mm) com auxílio de paquímetro digital. As análises foram realizadas em triplicata.

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico R (R CORE TEAM, 2024). ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey foi aplicada para verificar diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os ensaios.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados de coagregação obtidos para as dez cepas de BAL avaliadas frente as cinco espécies de microrganismos patogênicos: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* Scott A e *Enterococcus faecalis*.

Para o teste realizado com *E. coli* ATCC 25922, a BAL que demonstrou maior potencial de coagregação foi a A6, com um percentual de 90,22%, diferindo estatisticamente das demais. Os testes realizados apresentam maiores resultados quando comparados aos resultados observados nos estudos de Oliveira *et al.* e Collado *et al.* (11, 18), que apresentaram valores de 15% a 26%. Neste sentido as cepas isoladas e utilizadas no presente trabalho demonstram-se como boas candidatas a microrganismos probiótico quando comparadas a outros isolados, o que sugere possibilidade de utilização industrial.

A alta capacidade de coagregação frente a esse microrganismo é explicada por mecanismos moleculares e interações físico-químicas específicas. A presença de **adesinas bacterianas** permite o reconhecimento direto de estruturas superficiais dos patógenos, especialmente por meio das fímbrias no caso da *E. coli*. Adicionalmente, as **interações hidrofóbicas** entre moléculas da superfície da bactéria ácido láctica e os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias patogênicas promovem adesão estável (14, 15). Outro mecanismo crucial é o **mimetismo molecular**, no qual *uma BAL* expressa estruturas superficiais semelhantes às dos patógenos, confundindo os sistemas de adesão de *E. coli*, sequestrando-os (16, 17, 18).

Tabela 1 - Coagregação (%) de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos coalho artesanais produzidos em municípios da região Agreste Meridional de Pernambuco.

| Cepa | <i>E. coli</i>           | <i>L. monocytogenes</i>  | <i>S. typhimurium</i>    | <i>L. monocytogenes</i> Scott A | <i>E. faecalis</i>        |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| A1   | 81,38±2,95 <sup>bc</sup> | 82,02±0,72 <sup>b</sup>  | 84,05±2,12 <sup>b</sup>  | 78,70±2,55 <sup>f</sup>         | 78,52±0,63 <sup>e</sup>   |
| A2   | 81,97±2,50 <sup>bc</sup> | 81,34±0,92 <sup>b</sup>  | 91,48±0,07 <sup>a</sup>  | 73,92±0,41 <sup>g</sup>         | 84,55±0,90 <sup>c</sup>   |
| A3   | 82,10±0,70 <sup>c</sup>  | 87,92±0,22 <sup>a</sup>  | 83,51±1,65 <sup>b</sup>  | 70,18±0,26 <sup>g</sup>         | 87,77±0,11 <sup>b</sup>   |
| A4   | 87,05±0,20 <sup>ab</sup> | 89,82±0,18 <sup>a</sup>  | 86,88±0,89 <sup>b</sup>  | 84,99±1,26 <sup>c</sup>         | 81,20±1,68 <sup>cde</sup> |
| A5   | 81,09±0,90 <sup>c</sup>  | 84,08±1,70 <sup>ab</sup> | 80,43±0,80 <sup>bc</sup> | 78,17±1,08 <sup>f</sup>         | 81,99±0,43 <sup>cd</sup>  |
| A6   | 90,22±0,44 <sup>a</sup>  | 85,71±1,61 <sup>a</sup>  | 91,98±0,33 <sup>a</sup>  | 82,88±0,64 <sup>d</sup>         | 81,61±1,74 <sup>cde</sup> |
| A7   | 81,35±0,36 <sup>c</sup>  | 80,70±0,05 <sup>b</sup>  | 77,00±0,95 <sup>c</sup>  | 90,74±0,51 <sup>a</sup>         | 88,21±1,30 <sup>ab</sup>  |
| A8   | 85,89±0,66 <sup>b</sup>  | 72,30±0,36 <sup>c</sup>  | 84,64±0,32 <sup>b</sup>  | 92,32±0,04 <sup>a</sup>         | 90,63±0,56 <sup>a</sup>   |
| B1   | 82,09±0,63 <sup>c</sup>  | 82,92±0,97 <sup>b</sup>  | 85,43±0,41 <sup>b</sup>  | 88,07±0,52 <sup>b</sup>         | 85,65±1,11 <sup>bc</sup>  |
| B2   | 71,85±2,29 <sup>d</sup>  | 72,88±0,92 <sup>c</sup>  | 77,85±1,09 <sup>c</sup>  | 71,91±1,84 <sup>g</sup>         | 72,34±4,84 <sup>f</sup>   |

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Os

resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3).

A ocorrência de *E. coli* em produtos lácteos é um indicativo robusto de contaminação fecal e de falhas nos controles higiênico-sanitários ao longo da cadeia de produção (ordenha, transporte, pós-pasteurização), e certas linhagens, em especial as produtoras de toxinas Shiga (STEC), constituem risco direto para a saúde humana pois, estas toxinas lesionam o epitélio intestinal. A *E. coli* apresenta capacidade de se associar à fração lipídica do leite, o que pode proteger células bacterianas de algumas etapas de processamento físico-químico. Sua detecção em leite cru e derivados é usada como indicador de risco sanitário e de potencial presença de agentes patogênicos. Dessa forma, alimentos funcionais probióticos, com microrganismos capazes de desempenhar um papel benéfico ao hospedeiro através de sua coagregação com patógenos como a *E. coli*, são fundamentais para a indústria alimentícia (19).

Para os resultados de coagregação frente as bactérias do gênero *Listeria*, as cepas mais promissoras foram a A4, com um percentual de 89,92%, para a espécie *L. monocytogenes* ATCC 19117, entretanto, não houve diferença significativa entre esta e as cepas A3, A5 e A6. Já para *L. monocytogenes* Scott A ATCC 49594, a cepa A8 apresentou o maior potencial de coagregação com um percentual de 92,32%, não diferindo estatisticamente com a cepa A7. Os resultados corroboram com os achados por Abdel *et al.* (21), onde quatro isolados probióticos de BAL demonstraram valores entre 87% e 93% após duas horas completas de incubação.

A alta eficácia de coagregação das cepas analisadas no presente trabalho frente a patógenos do gênero *Listeria* pode ser atribuída a semelhança de polaridade de superfície celular das bactérias, e é um importante mediador de coagregação. A característica hidrofóbica da superfície das bactérias ácido lácticas, como as adesinas e os ácidos lipotecóicos, favorece a interação com a membrana celular de patógenos hidrofóbicos, como os do gênero *Listeria*, fazendo com que se coagrem mais facilmente (21).

Além disso, a fermentação láctica pode favorecer indiretamente o processo de coagregação, visto que com a diminuição do pH, tanto a *Listeria monocytogenes* Scott A quanto a *Listeria monocytogenes*, aumentam ou alteram sua exposição dos lipídeos de membrana como forma de adaptação à adversidade. Esse fenômeno favorece a coagregação pela possibilidade de aumento de hidrofobicidade e fluidez de membrana em resposta a fermentação pela BAL. Ademais, estudos sugerem que a formação de biofilmes competitivos em superfícies de adesão não só inibem a colonização por esses patógenos, mas também favorecem sua coagregação, justamente para inibir seu estabelecimento (22, 23).

É importante pontuar que *Listeria monocytogenes* é especialmente problemática em produtos lácteos por três características principais: tolerância ao frio, capacidade de sobreviver a condições de redução de água e salinidade, como presentes em alguns queijos e persistência de biofilmes sobre superfícies industriais. Essas propriedades tornam esse patógeno uma ameaça tanto em produtos prontos para consumo quanto em etapas pós-pasteurização, pois a

contaminação frequentemente ocorre por reintrodução no ambiente de processamento e não por falha da pasteurização em si. A persistência em nichos de equipamentos e a formação de biofilmes dificultam a higienização, elevam o risco de contaminação cruzada e motivam ações regulatórias rigorosas quando detectada em linhas de leite ou queijos maturados. A presença de BAL nesses produtos pode acabar desempenhando um papel antagônico a esses patógenos visto que propiciam um ambiente não favorável para que os mesmos se desenvolvam (24, 25, 26).

Para o teste realizado com *S. typhimurium* ATCC 14028, a BAL que demonstrou maior potencial de coagregação foi a A6, com um percentual de 91,98%, não diferindo estatisticamente da cepa A2. Os resultados para a coagregação de 8 cepas isoladas na pesquisa de Gómez *et al.* (3) variaram entre 40% e 75%, o que sugere que os resultados das 10 cepas analisadas no trabalho possuem maior destaque ao tratar do potencial de coagregação desses microrganismos.

Os altos resultados para a coagregação de BAL e microrganismos patogênicos como *Salmonella typhimurium* também é explicada pela presença de adesinas bacterianas e seu reconhecimento direto por estruturas superficiais, como as proteínas de membrana do microrganismo patogênico (15, 16). Adicionalmente, a produção de **exopolissacarídeos (EPS)** atua como uma matriz extracelular adesiva, aglutinando fisicamente os patógenos e reforçando a coagregação. Por fim, a aplicação de microrganismos probióticos faz com que a fermentação e seus produtos ácidos diminuam o pH, que por sua vez, aumenta expressão de adesinas das BAL e altera a carga superficial das bactérias patogênicas (16, 17, 18).

Bactérias do gênero *Salmonella*, em especial *Salmonella typhimurium*, permanecem como um agente de destaque em surtos alimentares ligados a produtos lácteos, sobretudo quando o leite é consumido cru ou quando há contaminação pós-processamento. *S. typhimurium* pode sobreviver a certas etapas de processamento e ser isolada de queijos e leites crus. Além disso, baixos inóculos são suficientes para causar doença em humanos, o que torna a sua presença intolerável do ponto de vista de segurança alimentar. Investigações epidemiológicas, incluindo surtos vinculados a leite cru e queijos envelhecidos, demonstram que práticas ineficazes de proteção da matéria-prima e de controle ambiental podem levar a contaminações de larga escala, com impacto sanitário e econômico substancial. A monitorização frequente de matérias-primas aliada ao uso de bactérias ácido lácticas competitivas aos microrganismos do gênero *Salmonella* são, portanto, medidas essenciais (20).

Por fim, nos testes feitos frente à bactéria patogênica *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, a cepa A8 também demonstrou o melhor resultado, com 90,63% de coagregação, diferindo estatisticamente das demais cepas avaliadas. Segundo os resultados de Todorov *et al.* (27), diferentes cepas de BAL apresentaram resultados de coagregação frente a *Enterococcus faecalis* variando de 87% a 91%. Estes valores reforçam a alta capacidade de coagregação dos microrganismos probióticos e a expressão de características metabólicas e fatores intrínsecos entre as cepas (28).

Embora alguns enterococos sejam utilizados como culturas adjuntas em certos queijos, espécies como *Enterococcus faecalis* são microrganismos patogênicos oportunistas presentes em matérias-primas e produtos finais devido à sua associação com fatores de virulência, capacidade de formar biofilmes e, sobretudo, por frequentemente carrear genes de resistência antimicrobiana. A presença de *E. faecalis* em leite cru e queijos pode indicar condições precárias de higiene e constitui um vetor potencial para a disseminação de genes de resistência e de elementos de virulência ao longo da cadeia alimentar. Estudos recentes sobre enterococos em produtos lácteos documentam não só a prevalência em amostras de leite e queijos, mas também o perfil resistente a antibióticos e a capacidade de persistência em linhas de produção, o que reforça medidas de controle, como o fenômeno de antibiose natural promovido pela produção de bacteriocinas das bactérias ácido lácticas (29).

A Tabela 2 apresenta os resultados de antagonismo obtidos para as dez cepas de BAL avaliadas frente a cinco espécies de microrganismos patogênicos: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* Scott A e *Enterococcus faecalis*.

Tabela 2 - Antagonismo (mm) de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos coalho artesanais produzidos em municípios da região Agreste Meridional de Pernambuco.

| Cepa | <i>E. coli</i>          | <i>L. monocytogenes</i> | <i>S. typhimurium</i>   | <i>L. monocytogenes</i> Scott A | <i>E. faecalis</i>      |
|------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| A1   | 3,50±0,10 <sup>c</sup>  | 3,75±0,35 <sup>a</sup>  | 3,65±0,07 <sup>ab</sup> | 2,90±0,10 <sup>cd</sup>         | 2,40±0,28 <sup>e</sup>  |
| A2   | 2,65±0,35 <sup>d</sup>  | 3,35±0,21 <sup>ab</sup> | 3,35±0,21 <sup>ab</sup> | 3,25±0,35 <sup>c</sup>          | 4,15±0,21 <sup>bc</sup> |
| A3   | 3,00±0,28 <sup>cd</sup> | 3,16±0,28 <sup>ab</sup> | 4,03±0,41 <sup>a</sup>  | 2,66±0,05 <sup>d</sup>          | 3,33±0,32 <sup>d</sup>  |
| A4   | 3,20±0,00 <sup>c</sup>  | 3,40±0,28 <sup>ab</sup> | 3,55±0,07 <sup>ab</sup> | 2,50±0,14 <sup>d</sup>          | 3,30±0,14 <sup>d</sup>  |
| A5   | 3,10±0,14 <sup>c</sup>  | 3,70±0,36 <sup>a</sup>  | 3,25±0,35 <sup>ab</sup> | 2,96±0,15 <sup>cd</sup>         | 2,96±0,05 <sup>d</sup>  |
| A6   | 4,4±0,14 <sup>b</sup>   | 3,30±0,14 <sup>ab</sup> | 2,85±0,07 <sup>c</sup>  | 6,53±0,45 <sup>a</sup>          | 4,05±0,07 <sup>c</sup>  |
| A7   | 9,00±0,00 <sup>a</sup>  | 3,75±0,35 <sup>a</sup>  | 2,70±0,28 <sup>c</sup>  | 5,10±0,28 <sup>b</sup>          | 5,75±0,35 <sup>a</sup>  |
| A8   | 3,10±0,65 <sup>c</sup>  | 3,23±0,25 <sup>a</sup>  | 2,90±0,36 <sup>c</sup>  | 5,95±0,07 <sup>ab</sup>         | 3,16±0,28 <sup>de</sup> |
| B1   | 3,76±0,25 <sup>c</sup>  | 3,05±0,05 <sup>b</sup>  | 3,40±0,14 <sup>ab</sup> | 4,8±0,30 <sup>b</sup>           | 5,25±0,25 <sup>ab</sup> |
| B2   | 4,00±0,26 <sup>c</sup>  | 3,83±0,20 <sup>a</sup>  | 3,36±0,20 <sup>ab</sup> | 3,10±0,17 <sup>c</sup>          | 4,80±0,28 <sup>b</sup>  |

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

É importante destacar que os resultados com o maior halo sugerem uma atividade inibitória mais eficiente contra a proliferação de microrganismos patogênicos (30). Essa atividade pode ser explicada por diversos compostos. Por exemplo, as bacteriocinas são peptídeos de baixo peso molecular, com mecanismos de ação bacteriostáticos ou bactericidas, com alta capacidade de atuação em diferentes espécies de bactérias patogênicas. Além disso, outros compostos antimicrobianos, incluindo ácidos, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono, álcool e aldeído funcionam como conservante naturais (31, 32).

Os resultados da capacidade antagonista para *E. coli* mostram que todas as cepas analisadas apresentaram halo. A cepa A7 demonstrou o maior resultado (9 mm), o que sugere que as substâncias produzidas por esta cepa detêm uma maior capacidade de inibição. Resultados semelhantes foram descritos por Neto *et al.* e Andrade *et al.* (30, 35), demonstrando que a similaridade estrutural da parede celular é um fator de importância para os compostos

antimicrobianos (33).

Para as análises de antagonismo realizadas contra *Listeria monocytogenes*, as cepas apresentaram potencial de inibição semelhantes com halos que variaram entre 3,05 e 3,83 mm. Apenas a cepa B2, que apresentou o menor resultado, diferiu estatisticamente entre as demais. Com relação a *L. monocytogenes* Scott A, a cepa A6 apresentou maior halo de inibição (6,53 mm), entretanto, não diferiu estatisticamente com a cepa A8. Estes resultados estão de acordo com a literatura de Filho *et al.*, Andrade *et al.* e Duarte *et al.* (30, 35, 36). Concomitante à produção de bacteriocinas e outros metabólitos antimicrobianos, a diminuição do pH também interfere na atividade metabólica de microrganismos do gênero *Listeria* (22, 23, 33).

A avaliação da capacidade antagonista das cepas de BAL contra *S. typhimurium* revelou que a cepa A3 apresentou maior halo de inibição (4,03 mm), não diferindo estatisticamente as cepas A1, A2, A4, A5, B1 e B2, demonstrando o potencial dessas cepas de inibir o crescimento do microrganismo patogênico avaliado. Estes resultados diferem do encontrados por Filho *et al.* (30), onde microrganismos probióticos não apresentaram halo de inibição contra *S. typhimurium*. Mesmo que a eficiência da inibição por bacteriocinas seja diminuída por causa da estrutura complexa de parede celular de bactérias consideradas Gram-negativas, a capacidade acidificante de algumas BAL pode ser o fator chave para inibir a proliferação de microrganismos patogênicos do gênero *Salmonella* (3, 4, 33).

Por fim, para as análises de antagonismo frente ao microrganismo *E. faecalis*, todas as dez cepas apresentaram halo de inibição. Dentre todos os isolados, a cepa A7 apresentou o maior resultado (5,75 mm), entretanto não diferiu estatisticamente com a cepa B1. Estes resultados demonstram a importância da avaliação de cepas de microrganismos probióticos como as BAL para o combate de microrganismos patogênicos com fatores de virulência e resistentes a antibióticos como o *E. faecalis* (30).

## CONCLUSÕES

Este estudo demonstra a importância da avaliação de bactérias ácido lácticas no combate de microrganismos patogênicos presentes em alimentos, principalmente em derivados lácteos fermentados, contribuindo para o aumento da vida de prateleira destes produtos. Através dos dados, foi possível determinar que as cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos coalho artesanais produzidos no Agreste Meridional de Pernambuco revelaram alto potencial de coagregação e antagonismo frente a microrganismos patogênicos relevantes para a indústria de alimentos, com potencial utilização tecnológica. Dessa forma, estudos complementares precisam ser realizados para aprofundar o entendimento desses mecanismos probióticos, e avaliar os aspectos e parâmetros para a utilização desses microrganismos na indústria de alimentos. Não obstante, os dados adquiridos reforçam e aprofundam o entendimento sobre o assunto, servindo como base para futuras pesquisas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos (LMTEB), pelo apoio técnico, científico e pela infraestrutura disponibilizada durante o desenvolvimento deste trabalho. À Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- (1) COLOMBO, M. *et al.* Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. **BMC microbiology**, v. 18, n. 1, p. 219, 2018.
- (2) ARTILHA, C. A. F. *et al.* Leites fermentados – uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 4956–4968, 2020.
- (3) GÓMEZ, N. C.; RAMIRO, J. M. P.; QUECAN, B. X. V.; FRANCO, B. D. G. M. Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- (4) LIMA, C. H. G. S.; COSTA, J. S.; CARBONERA, N.; HELBIG, E. Propriedades tecnológicas de bactérias ácido-láticas em laticínios: Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 76, n. 4, p. 243–256, 2021.
- (5) LIMA, C. P. Avaliação do potencial probiótico e tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho. 2015. 105 f. **Tese (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO)**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.
- (6) ARAUJO, L. M. Avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo coalho do sertão da Paraíba. 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2017.
- (7) ABDULLA, A. A.; ABED, T. A.; SAEED, A. M. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* strains. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 4, p. 381–391, 2014.
- (8) BREYER, G. M.; Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de leite de búfala. 2020. 66 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2020.
- (9) KATHARIOS-LANWERMEYER, S. *et al.* Mini-review: Microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development. **Biofouling**, v. 30, n. 10, p. 1235–1251, 24 nov. 2014.
- (10) TODHANAKASEM, T.; KETBUMRUNG, K. Using potential lactic acid bacteria biofilms and their compounds to control biofilms of foodborne pathogens. **Biotechnology Reports**, v. 26, p. e00477, 2020.
- (11) OLIVEIRA, G. S. *et al.* Bioprotective potential of lactic acid bacteria and their metabolites against enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 168, n. 7, p. 001216, 2022.
- (12) TODOROV, S. D. *et al.* Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 971-986, 2011.
- (13) TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 3, p. 722–756, set. 1976.

- (14) MERCIER-BONIN, M.; CHAPOT-CHARTIER, M-P. Surface proteins of *Lactococcus lactis*: bacterial resources for muco-adhesion in the gastrointestinal tract. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2247, 2017.
- (15) KRASOWSKA, A.; SIGLER, K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 112, 2014.
- (16) LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. CJ. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 171-184, 2010.
- (17) FOX, J. W. When should we expect microbial phenotypic traits to predict microbial abundances?. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 268, 2012.
- (18) COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S.. Medição das propriedades de agregação entre probióticos e patógenos: avaliação in vitro de diferentes métodos. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 1, p. 71-74, 2007.
- (19) BAGEL, A.; SERGENTET, D. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and milk fat globules. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 496, 2022.
- (20) WEINSTEIN, E. Outbreak of *Salmonella* Typhimurium Infections Linked to Commercially Distributed Raw Milk—California and Four Other States, September 2023–March 2024. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 74, 2025.
- (21) ABDEL TAWAB, F. I. *et al.* Probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from Egyptian fermented food. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 16601, 2023.
- (22) DIAKOGIANNIS, I. *et al.* Growth and membrane fluidity of food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* in the presence of weak acid preservatives and hydrochloric acid. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 152, 2013.
- (23) ARCARI, T. *et al.* Comparative review of the responses of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* to low pH stress. **Genes**, v. 11, n. 11, p. 1330, 2020.
- (24) JARA, J. *et al.* Role of *Lactobacillus* biofilms in *Listeria monocytogenes* adhesion to glass surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 334, p. 108804, 2020.
- (25) MELO, J.; ANDREW, P. W.; FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food Research International**, v. 67, p. 75-90, 2015.
- (26) NOWAK, J. *et al.* Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* 15G01, a persistent isolate from a seafood-processing plant, is influenced by inactivation of multiple genes belonging to different functional groups. **Applied and environmental microbiology**, v. 87, n. 10, p. e02349-20, 2021.
- (27) TODOROV, S. D. *et al.* Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 465–477, 2008.
- (28) GOŁAŚ-PRĄDZYŃSKA, M.; ŁUSZCZYŃSKA, M.; ROLA, J. G.. Dairy Products: a potential source of Multidrug-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains. **Foods**, v. 11, n. 24, p. 4116, 2022.
- (29) STĘPIEŃ-PYŚNIAK, D. *et al.* Biofilm formation capacity and presence of virulence factors among commensal *Enterococcus* spp. from wild birds. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11204, 2019.
- (30) NETO, L. G., *et al.* Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 245–250, 1 set. 2005.

- (31) FILHO, A. S. C. Identificação de bactérias ácido-láticas de leite bovino do estado da paraíba com capacidade antagonista contra patógenos de relevância para o setor agropecuário. **Tese de mestrado (Programa de pós-graduação em Zootecnia) em Zootecnia**, Universidade Federal da Paraíba – Campus Areia, 2023.
- (32) RODRÍGUEZ, E. *et al.* Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1–2, p. 7–15, jan. 2000.
- (33) BROMBERG, R. *et al.* Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 135–144, mar. 2006
- (34) DEEGAN, L. H. *et al.* Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1058–1071, set. 2006.
- (35) ANDRADE, C. R. G. *et al.* Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus spp.* isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1592–1600, 1 out. 2014.
- (36) DUARTE, M. C. K. H. *et al.* Ação antagonista de *lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of bioenergy and food science**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2016.