



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - *Campus* SOBRAL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EDRINE VASCONCELOS FARIAS MAGALHÃES**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE *Lactobacillus paracasei***  
**ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR CONTRA ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES**

**SOBRAL**

**2024**

EDRINE VASCONCELOS FARIAS MAGALHÃES

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE *Lactobacillus paracasei*  
ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR CONTRA ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Victor A. Carneiro.

SOBRAL

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M165a Magalhães, Edrine Vasconcelos Farias.  
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE *Lactobacillus paracasei* ISOLADOS DE  
GRÃOS DE KEFIR CONTRA ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES / Edrine Vasconcelos Farias  
Magalhães. – 2024.  
50 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, , Fortaleza, 2024.  
Orientação: Prof. Dr. Victor Alves Carniero.

1. Antibiofilme. 2. Probiótico. 3. *Lactobacillus* spp.. 4. Resistência antibiótica. I. Título.  
CDD

---

EDRINE VASCONCELOS FARIAS MAGALHÃES

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE *Lactobacillus paracasei*  
ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR CONTRA ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovada em: 22/04/2024

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Orientador)  
Centro Universitário INTA - UNINTA

---

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto (Membro interno)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Livia Bordalo Tonucci (Membro externo)  
Centro Universitário INTA – UNINTA

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser presença viva no meu coração diariamente, dando-me força, coragem e determinação para correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus pais, Valdélia e Vamberto; avós, Socorro, Elmiro, Valdeci e Maria de Lourdes (*in memoriam*); e irmã (Eveline), por serem meus maiores exemplos, por me motivarem, incentivarem e acreditarem no meu potencial e, principalmente, por todo suporte, orações e por serem rede de apoio essencial para que eu conseguisse realizar meus objetivos.

Ao meu esposo, Aquylles, por todo o amor, amparo, compreensão, torcida, companheirismo, respeito dispensados e por não medir esforços para a realização dos meus sonhos.

Às minhas filhas, Lis e Lara, ambas nascidas no período de execução deste trabalho, por serem minha maior motivação e força. Por, ainda tão pequenas e totalmente dependentes de mim, precisarem conviver com minhas ausências.

Ao meu orientador, Victor Carneiro, que, mais do que isso, foi um grande amigo. Obrigada por todo o ensinamento, não só na área de microbiologia, mas de vida; por suas palavras sábias e tranquilizadoras nos momentos de angústia; pela paciência, apoio e por acreditar mais em mim do que eu mesma. Minha eterna gratidão.

À minha amiga Leilah Monte Coelho, que, pacientemente, me ensinou tudo que sabia a respeito desse mundo da microbiologia que era completamente novo pra mim e por me incentivar, ouvir e apoiar sempre.

Às minhas amigas Luma, Lídia e Ingrid, que foram rede de apoio físico e mental essenciais para esta conquista.

Ao grupo LABAM (Laboratório de Biofilmes e Antimicrobianos), de modo especial para Rafaela Bastos, Benise Ferreira, Mateus Gomes, Brendda Miranda, Paulo Adenes e Nauriana Sampaio pela presteza, amizade, contribuição e conhecimento compartilhado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, pela dedicação, ensinamentos e oportunidade de crescimento; aos técnicos de laboratório, vigilantes e serventes, pela presteza e, por muitas vezes, serem meus companheiros nos finais de semana e noites de experimentos.

À banca examinadora composta por Profa Dra. Livia Bordalo e Prof. Dr. Vicente Pinto, por aceitarem gentilmente o convite para composição da referida e por suas valiosas contribuições.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a finalização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

*“É justo que muito custe o que muito vale”*  
(Santa Teresa D’avila)

## RESUMO

A crescente resistência antimicrobiana de enterobactérias representa um desafio significativo na área da saúde, tornando-se uma preocupação global devido à limitada disponibilidade de opções terapêuticas eficazes. Nesse cenário, os probióticos isolados de diversas fontes, como cepas do gênero *Lactobacillus*, têm emergido como uma abordagem promissora para combater infecções resistentes. Neste estudo, investigou-se a atividade antibacteriana e antibiofilme de cepas de *L. paracasei* (Lpk 01) previamente isoladas de grãos de kefir contra cepas de *Escherichia coli* (C22, C27, C55 e ATCC 11303) e *Klebsiella* spp. (C17, C21, C28 e ATCC 700603). Primeiramente, foi estabelecida a sensibilidade antibiótica do Lpk 01 através da microdiluição em caldo de acordo com BrCAST. Em seguida, foi realizada a avaliação da atividade antagônica entre a cepa probiótica contra os enteropatógenos por meio da técnica de *Spot Overlay*. O sobrenadante de Lpk 01 (Lpk-cf) foi então preparado e testado quanto à atividade antimicrobiana utilizando o teste de microdiluição. Por fim, o efeito de Lpk-cf não neutralizado contra biofilmes pré-formados (24h) foi testado. O Lpk 01 se mostrou sensível à maioria dos antimicrobianos testados. Além disso, os resultados demonstraram um potente antagonismo do Lpk 01 contra as cepas de enterobactérias ( $R > 6\text{mm}$ ), com a capacidade de inibição variando de acordo com o pH do meio. Esse efeito foi confirmado com o teste de microdiluição, no qual o Lpk-cf não neutralizado exerceu inibição sobre o crescimento planctônico, demonstrando um efeito antimicrobiano variando de 20 a 50% de Lpk-cf. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle em quase todas as estirpes estudadas e em todas as porcentagens de Lpk-cf testadas, sem uma relação dose-resposta aparente, com redução de em média 50% da biomassa. Com isso, os resultados indicaram que o Lpk 01 possui potencial antibacteriano e antibiofilme promissor, sugerindo essa cepa probiótica como alternativa terapêutica contra enteropatógenos.

**Palavras-chave:** Antibiofilme, Probiótico; *Lactobacillus* spp.; Resistência antibiótica



## ABSTRACT

The increasing antimicrobial resistance of *enterobacteriaceae* poses a significant challenge in healthcare, becoming a global concern due to the limited availability of effective therapeutic options. In this context, probiotics isolated from various sources, such as strains of the *Lactobacillus* genus, have emerged as a promising approach to combat resistant infections. This study investigated the antibacterial and antibiofilm activity of *L. paracasei* strains (Lpk 01) previously isolated from kefir grains against strains of *Escherichia coli* (C22, C27, C55, and ATCC 11303) and *Klebsiella* spp. (C17, C21, C28, and ATCC 700603). Initially, the antibiotic sensitivity of Lpk 01 was established through broth microdilution according to BrCAST standards. Subsequently, the antagonistic activity of the probiotic strain against the enteropathogens was evaluated using the Spot Overlay technique. The supernatant of Lpk 01 (Lpk-cf) was then prepared and tested for antimicrobial activity using the microdilution test. Finally, the effect of non-neutralized Lpk-cf on pre-formed (24h) biofilms was tested. Lpk 01 showed sensitivity to most of the antimicrobials tested. Furthermore, the results demonstrate potent antagonism of Lpk 01 against enterobacterial strains ( $R > 6\text{mm}$ ), with the inhibitory capacity varying according to the medium's pH. This effect was confirmed with the microdilution test, in which the non-neutralized Lpk-cf inhibited planktonic growth, showing an antimicrobial effect ranging from 20 to 50% of Lpk-cf. Statistically significant differences compared to the control were observed in all studied strains, and all Lpk-cf percentages were tested without an apparent dose-response relationship, with an average reduction of 50% of biomass. Thus, the results indicate that Lpk 01 has promising antibacterial and antibiofilm potential, suggesting this probiotic strain is a therapeutic alternative against enteropathogens.

**Keywords:** Antibiofilm; Antibiotic resistance; Probiotic; *Lactobacillus* spp.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação dos principais gêneros de enterobactérias relacionados a diversos ecossistemas	21
Figura 2	Representação esquemática dos mecanismos farmacodinâmicos de resistência bacteriana	24
Figura 3	Representação esquemática da formação de biofilme.	25
Figura 4	Atividade antagônica de Lpk 01 em ágar tamponado e não tamponado contra isolados de enterobactérias através da técnica de <i>Spot Overlay</i> .	37
Figura 5	Atividade do Lpk-cf sobre a erradicação do biofilme das enterobactérias.	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil de resistência das enterobactérias	31
Tabela 2	Perfil de resistência do <i>Lactobacillus paracasei</i> frente a antimicrobianos.	36
Tabela 3	Representação esquemática dos mecanismos farmacodinâmicos de resistência bacteriana	37

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMP	Ampicilina
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAAs	Bactérias do ácido acético
BALs	Bactérias do ácido láctico
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BrCAST	Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
C17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
C21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
C22	<i>Escherichia coli</i>
C27	<i>Escherichia coli</i>
C28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
C55	<i>Escherichia coli</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLI	Clindamicida
CM	Centímetro
CV	Cristal violeta
DAEC	<i>Escherichia coli</i> Difusamente Aderente
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
DO	Densidade Óptica
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
DZI	Diâmetro da Zona de Inibição
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativo
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênico
EPS	Exopolissacarídeo
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterobacter spp</i>
et al.	Colaboradores
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>

GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
H	Hora
IgA	Imunoglobulina A
Lpk 01	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Lpk-cf	Sobrenadante de <i>Lactobacillus paracasei</i> livre de células
LPSN	Lista de Nomes Procarióticos com Posição na Nomenclatura
M	Concentração Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mg/L	Miligrama por Litro
min	Minuto
mL	Mililitro
MPM	Meropenen
MRS	<i>Man, Rogosa and Sharpe</i>
MTZ	Metronidazol
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBM	Percentual Bactericida Mínimo
PBP	Peptídeoglicano
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato
PEN	Benzilpenicilina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIM	Percentual Inibitório Mínimo
RPM	Rotações por Minuto
UBS	Unidade básica de saúde
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta
VAN	Vancomicina
VETEC	<i>Escherichia coli</i> verotoxigênica
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	18
2.1	Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) .....	18
2.2	Enterobactérias .....	20
2.2.1	<i>Enterobactérias patogênicas</i> .....	21
2.3	Resistência antibiótica .....	23
2.3.1	<i>Biofilme</i> .....	24
2.4	Probióticos .....	26
2.4.1	<i>Lactobacillus spp.</i> .....	27
3	OBJETIVOS .....	30
3.1	Objetivo Geral .....	30
3.2	Objetivos Específicos .....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
4.1	Microrganismos e condições de cultivo .....	31
4.2	Antibiograma .....	32
4.3	Teste de antagonismo .....	32
4.4	Preparo do sobrenadante de Lpk 01 .....	33
4.5	Teste de microdiluição .....	33
4.6	Atividade antibiofilme .....	34
4.7	Análise estatística .....	35
5	RESULTADOS .....	36
5.1	Perfil de resistência .....	36
5.2	Teste de antagonismo .....	36
5.3	Atividade antimicrobiana .....	37
5.4	Atividade antibiofilme .....	38
6	DISCUSSÃO .....	39
7	CONCLUSÃO .....	42
	REFERÊNCIAS .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são manifestações clínicas causadas a partir da ingestão de alimentos e/ou água contaminados por bactérias, vírus, fungos ou toxinas (BRASIL, 2017). Ainda que os sintomas mais comuns se limitem a desconfortos gastrointestinais, outros mais graves podem estar associados, o que representa uma preocupação global de saúde pública, principalmente diante dos índices de morbimortalidade pelos quais são responsáveis, especialmente nos públicos mais vulneráveis, como gestantes, crianças e idosos (BRASIL, 2017; PIRES et al, 2021). Embora a preocupação sobre esta problemática seja crescente, a segurança alimentar ainda é muito negligenciada e a subnotificação desses casos ainda é um desafio para o controle dessas infecções (LEE; YOON, 2021; PIRES et al., 2021).

Dentre os enteropatógenos envolvidos na etiologia dessas doenças, estão *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, bactérias patogênicas gram-negativas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, naturalmente presentes no intestino humano, porém uma pequena parte das suas estirpes apresentam patogenicidade. Seus mecanismos de patogenicidade se dão de diversas maneiras, como a capacidade de adesão e colonização das células intestinais, produção de toxinas, bem como a formação de uma matriz polimérica, conhecida como biofilme, favorecendo o aparecimento de resistência aos antimicrobianos (PAITAN, 2018; PALETTA et al., 2020). Como consequência, as enterobactérias como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* spp. e *Enterobacter* spp. são causas comuns de pneumonias nosocomiais, infecções na corrente sanguínea, trato urinário, trato gastrointestinal e regiões intra-abdominais (MLYNARCIK; RODEROVA; KOLAR, 2016; HAMILTON et al., 2018).

A forma de tratamento mais utilizada para combater estas infecções é o uso de antimicrobianos. Dentre as classes de escolha, estão os beta-lactâmicos, que possuem um anel central de quatro membros chamado beta-lactama. Assim como em outros antimicrobianos, seu uso extensivo e indiscriminado levou a disseminação da resistência microbiana, que acontece por diversos mecanismos, dentre eles cita-se a ação da enzima beta-lactamase que hidrolisa a ligação amina do anel, diminuindo ou desativando suas propriedades antibacterianas (TOOKE et al., 2019). Além disso, a modificação da permeabilidade da membrana, bomba de efluxo, inibição da ligação do fármaco nos sítios de ligação que levam à resistência microbiana, dificultando tratamento e controle destas doenças (LIMA et al., 2020).

Adicionalmente, muitos microrganismos patogênicos possuem uma capacidade intrínseca de formação de agregados microbianos, conhecidos como biofilmes, que representam mais uma forma de resistência microbiana. Estes se unem e se transformam em comunidades

multicelulares submersas em uma matriz autoproduzida extracelular rica em exopolissacarídeos, DNA extracelular, material proteico, bem como apêndices celulares, que possui função protetora contra condições ambientais adversas como proteção contra raios ultravioletas (UV), variações de temperatura, pH, pressão, salinidade e terapias antibióticas, representando uma das principais causas de infecções resistentes e recorrentes de patógenos (VERDEROSA et al., 2019; YIN et al., 2019).

Considerando os mecanismos de resistência dos antimicrobianos, a busca de terapias alternativas está cada vez mais em evidência. Nessa perspectiva, o uso de probióticos tem se mostrado uma estratégia eficaz para controle e prevenção de infecções bacterianas, assim como prevenir ou neutralizar a formação de biofilme (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014). Estes são microrganismos que pertencem a diferentes gêneros e espécies, tanto de bactérias, como de leveduras e que, quando administrados de forma correta, conferem benefícios à saúde (BRASIL, 2021).

Dentre as classes de probióticos, destaca-se o gênero *Lactobacillus* por estar associado à modulação do sistema imunológico, perfil lipídico sanguíneo, controle do diabetes, além da sua conhecida aplicabilidade biotecnológica no controle de bactérias patogênicas (SLATTERY; COTTER; O'TOOLE, 2019). São bactérias Gram-positivas produtoras de ácido láctico (BAL's), usualmente encontradas em ambientes anaeróbicos e capazes de colonizar o mesmo compartimento intestinal (epitélio do cólon) que as enterobactérias (RUIZ et al., 2017).

Este gênero bacteriano pode ter diversas origens, dentre estas estão os grãos de Kefir, que são compostos por uma mistura simbiótica complexa de bactérias e leveduras contidas em uma matriz de polissacarídeos denominada kefirano que envolve toda a comunidade de células. Estes grãos, quando inoculados em leite ou outros substratos açucarados, agem como cultura microbiana inicial dando origem a uma bebida probiótica fermentada (FIORDA et al., 2017). Bengoa et al. (2021) asseguram em revisão, que os grãos de kefir, tanto de água quanto de leite, são fontes seguras para o isolamento de novas cepas de *L. paracasei*.

Além disso, os *lactobacillus* possuem um importante valor biotecnológico tanto para a nutrição humana, quanto para a microbiologia de alimentos, visto que algumas cepas exercem um papel de destaque na produção e conservação de alimentos (RUIZ et al., 2017). Em geral, as BAL's são consideradas GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Federal Drug Administration*), que indica que quando um microrganismo ou derivado é adicionado aos alimentos, é considerado seguro para consumo. Assim, cepas deste gênero são consideradas boas opções para desenvolvimento de produtos que atuem como adjuvantes em tratamentos de patologias (PLAVEC; BERLEC, 2020).



Portanto, este projeto busca investigar se a atividade do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei* (Lpk 01) livre de células (Lpk-cf) isolados de grãos de kefir tem a capacidade de combater enterobactérias resistentes, atuando tanto na inibição de seu crescimento, quanto na formação de biofilmes. Nessa circunstância, a presente pesquisa poderá abrir novas perspectivas para o uso de probióticos como uma abordagem terapêutica para infecções causadas por enterobactérias resistentes e biofilmes bacterianos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no tratamento dessas infecções.

Assim, torna-se necessário responder a seguinte problematização: A aplicação biotecnológica do sobrenadante de *L. paracasei* obtidos a partir dos grãos de kefir pode combater os biofilmes microbianos de enterobactérias resistentes, superando mecanismos de resistência a antimicrobianos? Então, a proposta desse trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano e antibiofilme de sobrenadante de *L. paracasei* obtidos de grãos de kefir contra isolados de enterobactérias resistentes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)

Consideradas um problema de saúde pública de cunho econômico e social em todo o mundo, as DTAs são quaisquer manifestações clínicas causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados (SORAGNI et al., 2019; PIRES et al., 2021). Estas podem ser causadas por bactérias, vírus, parasitas ou produtos químicos e se apresentam, comumente, através de sintomas gastrointestinais, podendo ter repercussões mais graves dependendo da idade e do sistema imunológico (KIM; RYU; LEE, 2018). Além disso, os sintomas variam de acordo com o microrganismo envolvido, sendo os mais comuns diarreia, vômito, cólicas, dor de cabeça e febre, embora outras manifestações como visão turva, fraqueza, icterícia e urina escura possam acontecer com menor frequência. Condições mais graves podem, ainda, envolver insuficiência renal, respiratória, bacteremia, meningite e morte (FDA, 2022).

Nos Estados Unidos, 48 milhões de novos casos são registrados a cada ano, o que equivale a 1 a cada 6 americanos (FDA, 2022). Marques e Trindade (2022) analisaram o recorte temporal de 2000 a 2021 dos surtos de DTAs no Brasil, onde encontraram 14.590 surtos registrados, com 266.247 casos confirmados, e 212 óbitos, destes 23.214 (8,72%) foram causados por *E. coli* e 112 (0,04%) por *K. pneumoniae*. O Nordeste aparece em terceiro lugar em proporção de ocorrências (18%) e em segundo lugar em mortes (24%), sendo o maior número de registros (26.486) e óbitos (18) no estado de Pernambuco. Entre os anos de 2017 e 2018, 38 surtos alimentares foram registrados no Ceará, divididos em apenas 9,7% (18/184) dos municípios, com a maior incidência em Crateús com 11 em 2017 e 2 em 2018 (CEARÁ, 2018).

Apesar do expressivo número de casos relatados, estudos demonstram que ainda há um elevado índice de subnotificações envolvendo esta problemática. Um dos fatores que contribuem para a baixa destas notificações é a falta de conhecimento da população sobre as consequências que as doenças podem trazer e a maioria apresentar sintomas leves, levando à não procura por atendimento médico (OLIVEIRA; FERREIRA, 2021). Além disso, há negligência no preenchimento das fichas oficiais pelos profissionais de saúde e falta da busca ativa na comunidade por parte das Unidades Básicas de Saúde (UBS). A subnotificação traz impacto negativo à comunidade, uma vez que a divulgação dessas informações e o conhecimento acerca das DTAs tornaria possível reduzir sua incidência e subsidiar medidas de

prevenção e controle, melhorando a qualidade de vida da população (OLIVEIRA; FERREIRA, 2021; MARQUES; TRINDADE, 2022).

Condições de saneamento básico precárias, má qualidade da água para consumo humano, más práticas de higiene pessoal e coletiva e manejo incorreto dos alimentos são fatores de risco para a propagação das DTAs. Com isso, ações que incentivem a prevenção e controle destas doenças é essencial, bem como investimento público para melhoria da infraestrutura em saneamento básico adequado para a população. Assim, órgãos públicos orientam ações de prevenção como: lavar bem as mãos com água e sabão antes de consumir ou preparar alimentos, após utilizar o banheiro, após manuseio de carnes cruas, após tocar em animais e outros; consumir carnes bem passadas, leite e derivados pasteurizados ou fervidos e alimentos com boas condições de higiene e preparo; Ensacar e manter a tampa do lixo sempre fechada; higienizar adequadamente frutas e verduras; Garantir o acesso da população aos serviços de saúde e orientar a importância de procurar o serviço no caso de infecções; e outros (BRASIL, 2021).

Embora os contaminantes de alimentos possam ter diversas origens, os principais causadores de DTAs no mundo, são os agentes biológicos, que envolvem vírus, fungos, bactérias e parasitas (BRASIL, 2021). Os vírus, embora não cresçam diretamente nos alimentos, podem contaminar os mesmos em diferentes fases da sua produção e manuseio, essas partículas podem permanecer por longos períodos nos alimentos sem perder a infectividade até atingir o consumidor. Os surtos virais registrados nos últimos anos são crescentes, especialmente por Norovírus e Rotavírus humano, sendo este último a principal causa de gastroenterites em crianças de até cinco anos em todo o mundo (PEXARA; GOVARES, 2020; LUCACCIONI; MACHADO, 2021). Já os fungos, contaminam os alimentos através da produção de metabólitos secundários chamados micotoxinas, que podem estar presentes em uma gama de alimentos básicos do dia a dia, em especial os cereais. Os fungos filamentosos que trazem maior preocupação para a saúde pública são dos gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., uma vez que as consequências destas infecções podem ir além de sintomas gastrointestinais, chegando a ter efeitos de carcinogenicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade e teratogenicidade em humanos e animais (ARRUDA; BERETTA, 2019; HAMAD et al, 2023).

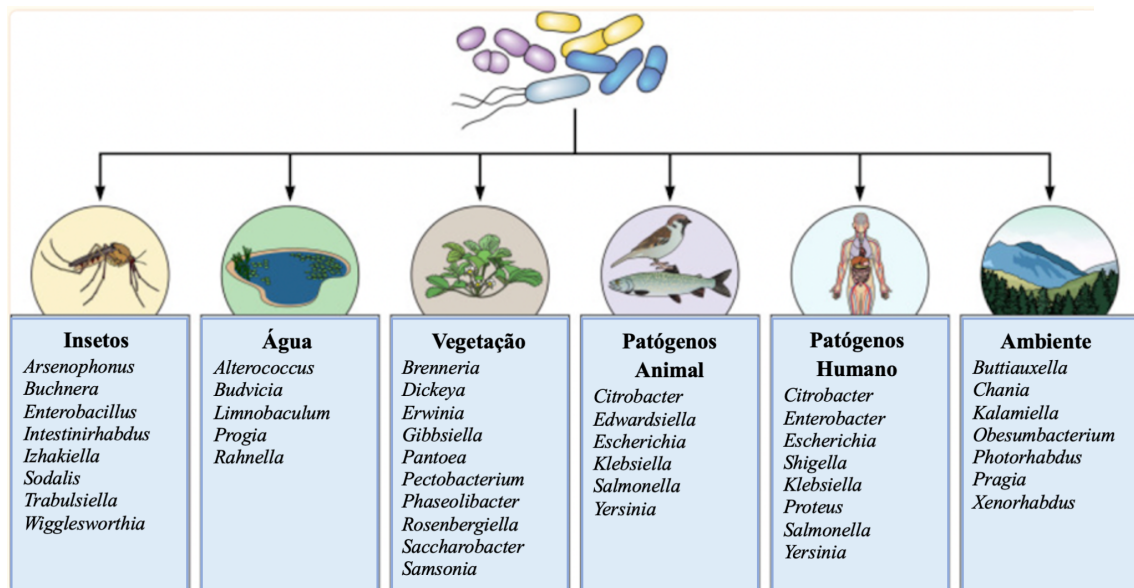
Entretanto, dentre os perigos biológicos, destacam-se as bactérias, atuando tanto diretamente no organismo, quanto através da produção de toxinas (MELO et al., 2018; AMARAL et al., 2021). Estas são responsáveis por dois terços das DTAs em todo o mundo, com alta carga nos países em desenvolvimento (ABEBE; GUGSA; AHMED, 2020). Neste

contexto, as DTAs são consideradas um processo infeccioso e se manifesta após a ingestão de água ou alimento contaminado com a bactéria patogênica viva e apta a crescer em condições do trato gastrointestinal (BERNARDES et al., 2018). Com isso, tanto espécies Gram-negativas quanto Gram-positivas estão associadas ao desenvolvimento de DTAs. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *K. pneumoniae* e *E. coli* são os principais patógenos bacterianos zoonóticos envolvidos (ABEBE, GUGSA, AHMED, 2020). Dentre estas, destacam-se as Gram-negativas, chegando a causar 69% das infecções registradas, especialmente as pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, a exemplo de espécies de *Salmonella*, *E. coli* e *K. pneumoniae* (OLIVEIRA et al., 2015; HARTANTYO et al., 2020; KIM; KIM, 2021).

## 2.2 Enterobactérias

As enterobactérias são bactérias Gram-negativas, em formato de bastonete, anaeróbias facultativas, possuem motilidade variável, são fermentadoras de glicose e produtoras de catalase, além disso, metabolizam diversas substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Estas compõem naturalmente a microbiota intestinal de humanos e animais, embora possam ser consideradas agentes infecciosos e serem associadas a diversas patologias. (JENKINS et al., 2017). Com mais de 85 anos de estudos, *Enterobacteriaceae*, pertencente à ordem *Enterobacterales*, é a família com maior diversidade taxonômica conhecida atualmente. Um estudo realizado mostra uma expansão de gêneros e espécies no período de 1974 a 2020, com relevante aumento após 2005, devido ao avanço tecnológico em estudos de taxonomia de procariotas. De acordo com o LPSN (Lista de Nomes Procarióticos com Posição na Nomenclatura), o número de gêneros conhecidos desta família aumentou de 12 para 68, com 355 espécies cadastradas em 2020. Estas podem ser encontradas em um grande nicho de ecossistemas ambientais que incluem trato gastrointestinal de vertebrados, vegetação, água, insetos e outros (Figura 1) (JANDA; ABBOTT, 2021).

Figura 1 - Representação dos principais gêneros de enterobactérias relacionados a diversos ecossistemas.



Fonte: Modificado de JANDA e ABBOTT, 2021.

### 2.2.1 Enterobactérias patogênicas

Comumente, as enterobactérias são encontradas em alimentos, tornando-os uma das principais formas de contaminação humana por estas. Estudos realizados em diversos países demonstram contaminação por espécies de *E. coli* e *K.pneumoniae* em carnes, filé de peixe, frango, iogurte, cottage, queijo fresco e vegetais cru, fígado de frango e porco e outros (HARTANTYO et al., 2020; KHATER et al., 2021; KURITTU et al., 2021). De forma geral, estas infecções se apresentam através de sintomas gastrointestinais, entretanto, estão associados também a manifestações extraintestinais, especialmente as infecções por *E. coli* e *K. pneumoniae*, que podem causar infecções do trato urinário e da corrente sanguínea, respectivamente (RILEY, 2020).

*E. coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, mesófilo, tendo como temperatura ótima de crescimento 37 °C, não esporulado, que pode ser móvel ou imóvel, capaz de fermentar glicose, lactose e outros açúcares, é catalase positivo e oxidase negativo. É comensal da flora intestinal de humanos e animais, coexistindo sem causar danos, entretanto, pode se tornar oportunista, adquirindo genes de virulência e tornando-se um patógeno capaz de gerar variadas doenças intestinais e extra intestinais que vão desde infecções gastrointestinais até infecções urinárias. Além disso, esta bactéria pode ser responsável pela infecção de

dispositivos médicos, gerando infecções hospitalares (WINN et al., 2018; RILEY, 2020; PAKBIN, BRÜCK, ROSSEN, 2021).

Desta forma, suas cepas patogênicas podem ser classificadas em *E. coli* enterotoxigênico (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), sendo esta última a mais relatada em surtos alimentares, responsável por cerca de 250.000 casos de infecções nos Estados Unidos, seguida da ETEC, com cerca de 80.000 casos. (FLECKENSTEIN, KUHLMANN, SHEIKH, 2021; CDC, 2022). Também conhecida como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* verotoxigênica (VETEC), a STEC produz uma citotoxina potente chamada Shiga (stx) que possui dois subgrupos, stx1 e stx2, e é a principal responsável pelas repercussões patológicas. É transmitida para humanos através do consumo de água e alimentos contaminados, sendo os bovinos e caprinos seus principais reservatórios de infecção, respectivamente (MENGE, C., 2020; THOMAS et al., 2012).

Por outro lado, o gênero *Klebsiella* se caracteriza por ser um bacilo Gram negativo, anaeróbico facultativo, imóvel, medindo 0,3 a 1 µm de diâmetro e de 0,6 a 6 µm de comprimento e encapsulado, produz colônias grandes e viscosas quando cultivadas em placas com nutrientes. São oxidase negativos, fermentam glicose e lactose, reduzem nitrato, lisina positivos, citrato e indol negativos, utilizam o citrato como fonte de carbono e hidrolisam a ureia, formando ou não gás (BRISSE; GRIMONT; GRIMONT, 2006; ZHAO et al., 2010). A espécie a *K. pneumoniae* merece destaque, uma vez que é a de maior relevância clínica com ampla distribuição no meio ambiente e microbiota intestinal de animais homeotérmicos, além de ser considerada um patógeno oportunista associado a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (HENRIKSEN, SMART, HAMED, 2018; WYRES; LAM; HOLT, 2020). Embora esteja muito associada a infecções nosocomiais, esta vem sendo cada vez mais isolada de alguns alimentos como pescados, frango, vegetais crus, leite materno e sua infecção está relacionada à má manipulação de alimentos (RETTEDAL et al., 2012; ALMEIDA et al., 2017; KHALIFA et al., 2020).

As infecções por estas bactérias representam um problema de saúde pública, uma vez que ambos os gêneros têm apresentado uma crescente prevalência de resistência antimicrobiana, dificultando as formas de tratamento e aumentando a disseminação desta resistência. A *K. pneumoniae*, por exemplo, integra os microrganismos ESKAPE, um acrônimo formado pelo nome de seis microrganismos com elevado poder de multirresistência e virulência, são eles: *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter*

*baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp (ROSA et al., 2020). Além disso, a multirresistência da *E. coli* tornou-se uma questão preocupante, pois embora esta seja intrinsecamente susceptível a quase todos os agentes antimicrobianos clinicamente relevantes, possui grande capacidade de acumular genes de resistência, principalmente por meio de transferência horizontal. (POIREL et al., 2018).

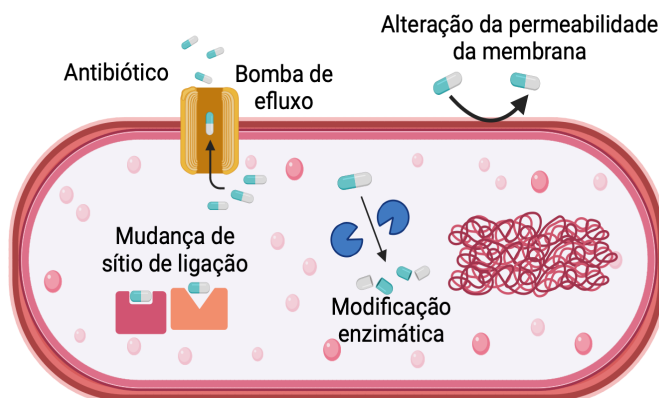
### 2.3 Resistencia antibiótica

A OMS define resistência como a habilidade dos microrganismos resistirem à ação dos antimicrobianos através da produção de diversos fatores que possam interferir diretamente na atividade do fármaco, principalmente fatores genéticos. Essa condição se tornou um grande problema de saúde pública, visto que os microrganismos passaram a ser resistentes a uma vasta classe de antibióticos, tornando os medicamentos ineficazes, aumentando os quadros de infecções, dificultando seu tratamento (OMS, 2023).

No contexto do tratamento de enfermidades ocasionadas pela presença das enterobactérias, as principais classes de antibióticos utilizadas são os beta-lactâmicos, cefalosporinas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (CISSE et al., 2019; VAZOURAS et al., 2020; TOMPKINS; DUIN, 2021). Entretanto, o uso de forma indevida e excessiva desses medicamentos, tanto em pessoas como em animais, sem auxílio de um profissional, está acelerando o aparecimento de resistência (OMS, 2023).

Os principais mecanismos farmacodinâmicos de resistência bacteriana são produção de enzimas, modificação da permeabilidade da membrana, bomba de efluxo e inibição da ligação do fármaco nos sítios de ligação (Figura 2). As bactérias podem produzir enzimas que degradam o fármaco e consequentemente inativam-no, como é o caso dos beta-lactâmicos. Os fármacos dessa classe, irão atuar diretamente inibindo as enzimas produtoras de peptidoglicano, conhecidas como PBP, entretanto, as bactérias podem produzir enzimas chamadas de beta-lactamases que irão degradar o anel aromático do fármaco, inibindo sua chegada ao sítio de ligação do fármaco. Outra forma de resistir à ação destes fármacos é alterando a conformidade da membrana, impedindo a entrada de medicamentos por canais de proteínas. Essas proteínas facilitam a entrada de antibióticos de baixo peso molecular (LIMA et al., 2020).

Figura 2 - Representação esquemática dos mecanismos farmacodinâmicos de resistência bacteriana.



Fonte: Autoria própria (2023). 1. Bomba de efluxo: expulsa o fármaco para o meio extracelular; 2. Mudança de sítio de ligação: impede a ligação e ação do fármaco; 3. Modificação enzimática: produção de enzimas que degradam o fármaco; 4. Alteração da permeabilidade de membrana: impede a entrada do fármaco pelos canais de proteína.

Os fármacos também podem ser expulsos do meio intracelular, através do mecanismo chamado de bomba de efluxo. As bactérias possuem proteínas especiais chamadas de bomba de efluxo que executam as atividades de seleção e expulsão de componentes tóxicos do meio intracelular para o meio extracelular (SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2019). Além disso, pode ocorrer também a mudança do sítio de ligação do antimicrobiano impedindo sua ligação e consequentemente sua ação (BLAIR et al., 2015). Outra grande preocupação mundial, é a capacidade das bactérias produzirem uma matriz polimérica extracelular (EPS), denominada de biofilme, conferindo-lhe maior proteção aos agentes externos (HADADI-FISHANI; KHALEDI; FATEMI-NASAB, 2020).

### 2.3.1 Biofilme

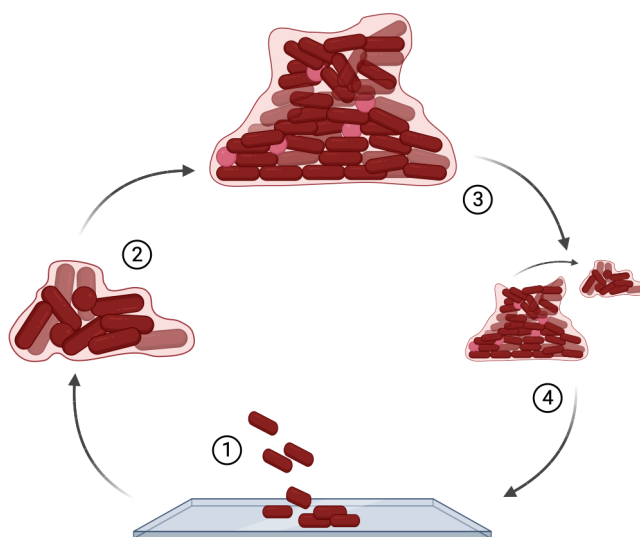
A formação de biofilme está envolvida em 60% dos casos de infecções humanas, dificultando o processo terapêutico. É considerado biofilme, uma comunidade mono ou multimicrobiana com alta capacidade de colonizar superfícies bióticas ou abióticas, conferindo maior resistência às ações dos fármacos antimicrobianos (GAROUSI et al., 2022). Essa combinação de células pode formar uma matriz polimérica extracelular a partir de água, exopolissacarídeos, DNA extracelular e material proteico, conferindo uma barreira em toda a



colônia, fornecendo um ambiente rico em nutrientes, promovendo o crescimento e persistência de microrganismos no local da infecção (TABASI et al., 2015). Além da proteção aos fármacos, essa matriz confere proteção a luzes UV, variações de pH, temperatura, escassez de nutrientes, como também à fagocitose mediada pelo hospedeiro (HADADI-FISHANI; KHALEDI; FATEMI-NASAB, 2020).

A colonização de biofilmes ocorre através de várias etapas, reportado na literatura por adesão inicial, proliferação, maturação e dispersão (Figura 3). A adesão inicial se trata da fase em que células microbianas, se aderem a superfícies bióticas e abióticas, de forma reversível, em que podem está ainda suscetível a ação de antibióticos. Seguidamente ocorre a proliferação microbiana, onde há multiplicação de células para formação de microcolônias através da formação da EPS, que servirá como cola para estabilizar as interações microbianas, tornando o processo irreversível. Posteriormente, ocorre a maturação e dispersão celular na forma de biofilme, para posterior adesão a outras superfícies, reiniciando o ciclo (URUÉN et al., 2020).

Figura 3 - Representação esquemática da formação de biofilme.



Fonte: Autoria própria (2023). 1: Adesão inicial do microrganismo; 2: Formação de microcolônias e EPS; 3: Biofilme maduro; 4: Dispersão de microcolônias em biofilme.

A formação desses aglomerados, se tornou uma ameaça global crescente para o tratamento de infecções, visto que, os fármacos atuais apresentam pouco efeito benéfico na erradicação desses microrganismos (MIQUEL et al., 2016; CIOFU et al., 2017). Por isso, a comunidade científica tem investigado novas substâncias e formulações capazes de combater microrganismos de maneira mais eficiente e seletiva (WANG; SHEN; HAAPASALO, 2017; KWASI et al., 2022; QUEIROGA et al., 2023). Para tal, os probióticos têm ganhado um espaço na pesquisa, como possível alternativa no combate dessa ameaça (SHANGGUAN et al., 2021; FERNANDES et al., 2023).

## **2.4 Probióticos**

Há séculos o conceito de probióticos vem sendo disseminado e aperfeiçoado entre os estudiosos, porém, foi apenas em 1954 que Ferdinand Vergin introduziu pela primeira vez o termo “probióticos” na medicina, enfatizando, ainda, a consequência adversa dos antibióticos na microflora intestinal e os benefícios destas bactérias boas trazendo efeitos positivos para a saúde humana (SAROWSKA et al., 2013). Atualmente, sabe-se que probióticos são microrganismos vivos que, uma vez ingeridos em quantidades convenientes, proporcionam diversos benefícios à saúde do consumidor (WHO, 2002; ESPGHAN, 2023). Além disso, os probióticos, em sua maioria, são classificados como suplementos alimentares, portanto, precisam cumprir critérios e procedimentos de controle de qualidade para que possam ser comercializados e aptos ao consumo humano, a exemplo: ter propriedades não patogênicas, ser resistentes aos processos tecnológicos, ter boa adesão aos tecidos epiteliais, estabilidade na presença de ácido e bile, ser capaz de sobreviver no ambiente gastrointestinal, de influenciar atividades metabólicas e outras (FAO/WHO, 2001; KECHAGIA et al., 2013; DE SIMONE, 2019).

A microbiota humana é composta por trilhões de microrganismos que colonizam o corpo humano de forma dinâmica, que muda de um local para o outro e é influenciada diretamente pela dieta, estilo de vida, exposição a bactérias do meio externo e outros. Desta forma, sabe-se que a microbiota luminal, composta por micróbios que vivem nos alimentos em trânsito e nas fezes, é influenciada pelo consumo de probióticos, que devem ser capazes de sobreviver ao trânsito intestinal (ZHANG et al., 2016; WIEËRS et al., 2020). O impacto positivo desse consumo se dá na capacidade do compartilhamento de genes e metabólitos com a microbiota hospedeira, melhorando a mesma e exercendo influência sobre células epiteliais e imunológicas associadas (WIEËRS et al., 2020).

Com isso, os benefícios dos probióticos são inúmeros, como melhoria do sistema imunológico, atuando na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e na estimulação de citocinas anti-inflamatórias e IgA secretora, que protege o epitélio intestinal de patógenos e toxinas; atuação nas doenças inflamatórias intestinais, coronavírus, câncer e outros (YADAV et al., 2023). Além disso, a principal alegação do seu uso e crescente interesse é pelo seu impacto na microbiota intestinal, favorecendo seu equilíbrio, processo de digestão, aumento da absorção de vitaminas e minerais e fortalecimento da barreira intestinal contra patógenos (ASPRI, PAPADEMAS, TSALTAS, 2020). Entretanto, dados clínicos são claros quanto aos benefícios associados às patologias, principalmente, quando se trata de infecções intestinais, doença inflamatória intestinal e síndrome do intestino irritável (GAGLIARDI et al., 2018).

A maioria dos microrganismos probióticos aptos e utilizados para o consumo humano pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL), especialmente os *Lactobacillus* e ao gênero *Bifidobacterium*. Entretanto, outros gêneros como *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Escherichia* e algumas cepas de levedura não bacteriana de *Saccharomyces* também são utilizados (KOUTSOUMANIS et al., 2020).

#### 2.4.1 *Lactobacillus* spp.

Considerados os maiores gêneros da família *Lactobacillaceae*, os *Lactobacillus* são caracterizados como bactérias Gram-positivas, em forma de bastonete, anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, tolerantes a ácidos, catalase-negativas e facultativamente heterofermentativos (GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015; SHUHADHA et al., 2017; HUANG et al., 2018). Representantes dessas espécies podem ser isoladas de alimentos fermentados, como laticínios, frutas, carne, massa fermentada, vegetais e vinho (HUANG et al., 2018). De acordo com Stiemsma et al. (2020) os alimentos fermentados, como kefir e iogurte possuem ecossistemas microbianos compostos principalmente por bactérias do ácido láctico (BAL), alguns destes são classificados como probióticos, por exemplo, *Lactobacillus* spp. Estes alimentos possuem uma variedade de microrganismos benéficos que podem ser integrados na alimentação, contribuindo com a microbiota intestinal. Salienta-se que, apesar de compor parte da flora gastrointestinal e vaginal humana, esses microrganismos podem ser patógenos oportunistas (SHUHADHA et al., 2017).

O kefir, especificamente, trata-se de uma bebida láctea fermentada e probiótica produzida através de seus grãos, os quais são compostos por BAL's, Bactérias do Ácido Acético (BAA's) e leveduras (AJAM; KOOHSARI, 2021). O efeito probiótico e antimicrobiano está

atribuído ao fato de sua microbiota diversificada produzir metabólitos antimicrobianos, como: peróxido de hidrogênio, peptídeos (bacteriocinas), ácidos orgânicos (ácido láctico e acético), que auxiliam na inibição de microrganismos patogênicos, principalmente da mucosa intestinal (AZIZI et al., 2021). É oportuno frisar que, para sua aplicabilidade na indústria, os microrganismos necessitam ser preservados por congelamento ou liofilização, processos que reduzem a atividade de água e podem acometer danos nas estruturas celulares, como membrana, superfície celular e proteínas (BRAVO-FERRADA et al., 2018).

Considerando sua aplicabilidade, os *Lactobacillus* são vastamente utilizados em áreas relacionadas a alimentos, rações, produtos farmacêuticos e biotecnologia, como por exemplo, na fermentação de produtos lácteos e probióticos (HUANG et al., 2018). Sua utilização está associada à proteção contra bactérias patogênicas, modulação do sistema imunológico, ação antioxidante, além de redução dos níveis glicêmicos e de colesterol (SLATTERY; COTTER; O'TOOLE, 2019). Como todo microrganismo, os lactobacilos precisam suportar as condições impostas pelo trato gastrointestinal para posterior colonização no cólon. Para isso, esses isolados desenvolveram diferentes mecanismos de sobrevivência, como a manutenção do pH intracelular, preservação da funcionalidade da membrana celular e a indução de proteínas de resposta ao estresse (BENGOA et al., 2017).

Especificamente, de acordo com *World Gastroenterology Organization* (2017), a utilização do *L. paracasei* está indicada para o tratamento de diarreia aguda em adultos, constipação intestinal e doença diverticular sintomática não complicada. Por esse motivo, essa espécie é comumente utilizada em produtos comerciais, como iogurtes, bebidas lácteas e suplementos dietéticos (MINJ et al., 2020). Bengoa et al. (2017) avaliaram a capacidade de adesão *in vitro* de cepas de *L. paracasei* isoladas de grãos de kefir após estresse ácido e biliar e evidenciaram que após passagem gastrointestinal, esses microrganismos aumentaram sua capacidade de adesão à mucina e células epiteliais *in vitro*, sendo este fator de relevância para a manutenção da cepa no ambiente intestinal para exercer sua ação probiótica.

Além disso, Plessas et al. (2020) afirmam que o *L. paracasei* exibe propriedades probióticas e a determinação de propriedades tecnológicas da cepa pode contribuir para o desenvolvimento de novos produtos funcionais lácteos ou não lácteos, confirmando seu potencial probiótico. Este destaca-se por seu potencial probiótico, capacidade de inibição do biofilme e atividade antibacteriana. Também foram avaliadas as propriedades probióticas desse isolado e verificada uma tolerância às condições gástricas e intestinais simuladas, além da significativa ação antimicrobiana, antifúngica e antioxidante. Dado o exposto, evidencia-se o papel antimicrobiano desse isolado frente a cepas patogênicas (ROMERO-LUNA et al., 2020).

É importante destacar que estudos realizados com uma série de ensaios *in vitro* avaliaram a viabilidade da cepa de *L. paracasei* em condições que simulam o trato gastrointestinal. A forte ação antimicrobiana do *L. paracasei* contra *E. coli* e *K. pneumoniae* sugere sua capacidade de estabelecer uma barreira intestinal contra patógenos. No entanto, esses isolados devem ser submetidos à validação experimental em modelos animais e posterior ensaio clínico em seres humanos para confirmação de seu potencial probiótico (LOURENÇO, 2021).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme do *Lactobacillus paracasei* (Lpk 01) isolados de grãos de kefir e do seu sobrenadante contra enterobactérias resistentes.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o perfil de sensibilidade antibiótica do Lpk 01;
- Avaliar a atividade antagônica de Lpk 01 sobre o crescimento de diferentes cepas de *E. coli* e *Klebsiella* spp.;
- Determinar o percentual inibitório/bactericida mínimo do sobrenadante livre de células do Lpk-01 (Lpk-cf) contra as enterobactérias testadas;
- Investigar o efeito do Lpk-cf sobre a biomassa de biofilme pré-formado de cepas de *E. coli* e *Klebsiella* spp.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos e condições de cultivo

As cepas das enterobactérias resistentes, *E. coli* (C22, C27 e C55) e *K. pneumoniae* (C17, C21, C28) isoladas por Almeida et al. (2017) foram cedidas pelo Núcleo de Bioprospecção e Experimentação Molecular Aplicada (NUBEM) do Centro Universitário INTA. As cepas de *E. coli* ATCC 11303 e *K. quasipneumoniae* ATCC 700603, assim como o *Lactobacillus paracasei* (Lpk 01, LOURENÇO, 2021) isolados de Kefir de leite, foram adquiridas através da bacterioteca do Laboratório de Biofilmes e Agentes Antimicrobianos (LaBAM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) localizada na cidade de Sobral/CE.

Tabela 01 – Perfil de resistência das enterobactérias

Cepas	Código	Resistência
<i>Escherichia coli</i>	C22	OXA, PEN
	C27	OXA, PEN
	C55	AMP, OXA, PEN
	C17	CFL, CFO, OXA, PEN
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	C21	OXA, PEN
	C28	OXA, PEN

Fonte: AMP: Ampicilina; CFL: Cefalotina; CFO: Cefoxitina; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina

As estirpes foram estocadas em diferentes meios de cultivo, sendo BHI (*Brain Heart Infusion*, Kasvi®, Itália) para enterobactérias e MRS (*de Man, Rogosa and Sharpe*, Merck®, Darmstadt, Germany) para Lpk 01, em alíquotas de 200 µL com 20 % de glicerol a -80° C. Para a ativação das cepas, 50 µL foram inoculados em 5 mL de meio específico em caldo estéril e incubados por 24 h a 37° C. Em seguida, a cultura foi renovada, mantendo as mesmas condições de cultivo por mais 18 h até a fase exponencial tardia. Posteriormente, as culturas bacterianas foram ajustadas de acordo com escala 0,5 McFarland ( $\sim 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>), e diluído em BHI estéril até a concentração celular apropriada para cada método experimental.

## 4.2 Antibiograma

O perfil de sensibilidade antibiótica foi determinado de acordo com o método de microdiluição em caldo utilizando placas de 96 poços, conforme preconizado pelo Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos – BrCAST (BRCAST, 2019). Os antimicrobianos benzilpenicilina (PEN), ampicilina (AMP), meropenem (MPM), vancomicina (VAN), clindamicina (CLI) e metronidazol (MTZ) foram preparados na concentração de 64 µg/mL. A suspensão bacteriana de *L. paracasei* foi ajustada em solução salina 0,85%, na concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, conforme escala 0,5 de McFarland para posterior ajuste a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Resumidamente, 100 µL de meio de cultura MRS foram adicionados em todos os poços da placa. Em seguida, 100 µL dos antimicrobianos foram adicionados na linha A e transferidos por diluição seriada, com movimentos updown, em concentrações que variaram de 16 até 0,25 µg/mL. Logo em seguida, 100 µL do inóculo ajustado foi adicionado em todos os poços obtendo-se um volume final de 200 µL em cada poço. Para a viabilidade do ensaio, foram realizados os seguintes controles: negativo (meio MRS + inóculo) e contaminação (meio MRS). Seguidamente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h para posterior avaliação do crescimento bacteriano através da visualização de turbidez nos poços, considerando a Concentração Inibitória Mínima (CIM), a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano. Os pontos de corte da concentração para serem considerados resistentes foram >0,5mg/L para PEN; >8 para AMP e MPM; >2 para VAN; >4 para CLI e MTZ (BRCAST, 2019).

## 4.3 Teste de antagonismo

A atividade antagonica entre o probiótico em questão e os isolados de enterobactérias foi avaliada pela técnica de *Spot Overlay* descrita por Chew et al. (2015) com algumas modificações. Inicialmente, 5 µL de uma suspensão ( $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) de Lpk 01 foram inoculados no centro de uma placa de MRS agar e submetidos a incubação por 48 horas a 37° C. Foram utilizados MRS agar tamponado com PBS (fosfato de sódio 0,01M com cloreto de sódio 0,15 M, pH 7,2) e não tamponado a fim de averiguar a influência do efeito acidogênico do probiótico sobre o crescimento das enterobactérias testadas. Em seguida, as placas contendo as colônias de Lpk 01 foram sobrepostas com uma suspensão de enterobactéria a  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> em BHI semi-sólido (0,8 % agar) e mantidos a 37 °C por mais 24 h. Por fim, foi



realizada a medida do diâmetro da zona de inibição (DZI) de crescimento das enterobactérias envolta das colônias de Lpk 01. Os resultados foram interpretados de acordo com o score de inibição (R) calculado através da fórmula sugerida por Halder e Mandal (2016).

$$R = \frac{(dinib - dspot)}{2}$$

Onde, 'dinib' representa o DZI, e 'dspot' se refere ao diâmetro da colônia de Lpk 01. Os escores de inibição foram considerados como: sem capacidade de inibição  $R < 2$  mm; baixa capacidade de inibição  $R = 2$  a 5 mm; e alta capacidade de inibição  $R > 6$  mm (HALDER; MANDAL, 2016).

#### 4.4 Preparo do sobrenadante de Lpk 01

O preparo do sobrenadante de Lpk 01 livre de células (Lpk-cf) foi realizado seguindo a metodologia de Chew et al. (2015). Uma cultura primária de Lpk 01 foi inoculada (1:100 v/v) em 20 ml de caldo MRS por 48 h a 37° C. Em seguida, as células foram removidas por centrifugação a 5.000 g por 10 min a 4° C e o sobrenadante filtrado em membrana millipore de 0,22 µm de diâmetro. Para anular efeitos de pH sobre a atividade antagônica, o Lpk-cf obtido teve seu pH ajustado para ~7.0 com adição de NaOH (hidróxido de sódio 1M) imediatamente antes da filtração. Em seguida, as amostras foram separadas em alíquotas e armazenadas a – 80° C.

#### 4.5 Atividade antimicrobiana - teste de microdiluição

A atividade antimicrobiana do Lpk-cf contra cepas planctônicas das enterobactérias foi avaliada através do percentual inibitório mínimo (PIM) e percentual bactericida mínimo (PBM) através do teste de microdiluição em placas de 96 poços (CHEN et al., 2019). Inicialmente, foram adicionados 100 µL Lpk-cf, neutralizado e não neutralizado, diluídos de caldo BHI em concentrações decrescentes (50, 40, 30, 10, 5, 2,5 e 1 %) de cada Lpk-cf. Em seguida, foram adicionados à placa 100 µL de suspensão bacteriana ( $\sim 2 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>), obtendo-se um volume final de 200 µL. Após 24 h de incubação a 37° C em condições aeróbicas, foi considerado PIM a menor concentração da substância capaz de inibir visualmente o

crescimento bacteriano. Para o controle foram utilizados 100 µL do inóculo e 100 µL de meio BHI caldo estéril.

Para a determinação da PIM uma alíquota de 10 µL foi retirada dos poços que não houveram crescimento bacteriano visível, e inoculados em BHI ágar por 24h a 37° C em condições aeróbicas. Após, as placas foram analisadas e considerado como PBM o menor percentual capaz de reduzir 99,9% da quantidade de células do inóculo individual. Percentuais do Lpk-01 em que houveram crescimento na placa, não foi considerado PBM. Nesse ensaio foram consideradas seis repetições de cada grupo em pelo menos 3 ensaios independentes.

#### 4.6 Atividade antibiofilme

Para avaliar a influência do Lpk-cf sobre o biofilme pré-formado das cepas das enterobactérias foram utilizados testes em placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços. Para a formação do biofilme, foram adicionados 200 µL do inóculo bacteriano previamente ajustado a uma concentração de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> em cada poço, incubados a 37° C por 24 h. Após esse período, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS 0,05 M com NaCl 0,15 M) estéril para retirada das células fracamente aderidas através de movimentos de *up-down*. Posteriormente, foram adicionados 200 µL do Lpk-cf em diferentes percentuais (40, 60, 80 e 100 %), e as placas incubadas por 24 h a 37° C. Foi considerado apenas caldo BHI estéril no grupo controle. Após incubação os poços foram lavados novamente, e submetidas a quantificação de biomassa residual por coloração com cristal violeta (CV), seguindo metodologia proposta por O'Toole (2011).

Resumidamente, após secagem foram adicionados aos poços contendo biofilme 200 µL de metanol a 95 % por 15 minutos para fixação das células aderidas. Após a remoção do metanol, 200 µL de CV 0,1 % foram adicionados por 10 minutos para permitir uma quantificação indireta da biomassa através da coloração. Em seguida o CV foi removido e repetido o processo de lavagem e secagem, seguido pela adição de 200 µL de ácido acético 33 % por 10 min para dissolução do corante fixado ao biofilme. A suspensão obtida em cada poço foi transferida para uma nova placa de 96 poços onde foi realizada a medição da absorbância em um leitor de microplacas a 590 nm (BioTrak II, Amersham Biosciences, Alemanha).

#### **4.7 Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata em dias independentes com os respectivos resultados tabulados e categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows). Posteriormente os dados foram analisados no software GraphPad Prism (Versão 9.0 para Windows, San Diego, California USA), e as diferenças entre os grupos foram verificadas através do teste One-way ANOVA com pós-teste de Dunnett's. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,01$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Perfil de resistência

Para análise do perfil de sensibilidade antibiótica, o lactobacilo em questão foi exposto a seis antimicrobianos, e se mostrou sensível a maior parte deles, com CIM < 0,25 µg/mL para PEN, AMP, MPM e 4 µg/mL para CLI. Já na exposição à VAN e MTZ, demonstrou resistência, com CIM de 16 µg/mL, uma vez que o ponto de corte da VAN é > 2 µg/mL e do MTZ é > 4 µg/mL, conforme demonstrado na tabela 02 (BRCAST, 2019).

Tabela 02 – Perfil de resistência do *Lactobacillus paracasei* frente a antimicrobianos.

Antimicrobianos	CIM (µg/mL) <sup>1</sup>	Interpretação <sup>2</sup>
PEN	<0,25	S
AMP	<0,25	S
MPM	<0,25	S
VAN	>16	R
CLI	4	S
MTZ	>16	R

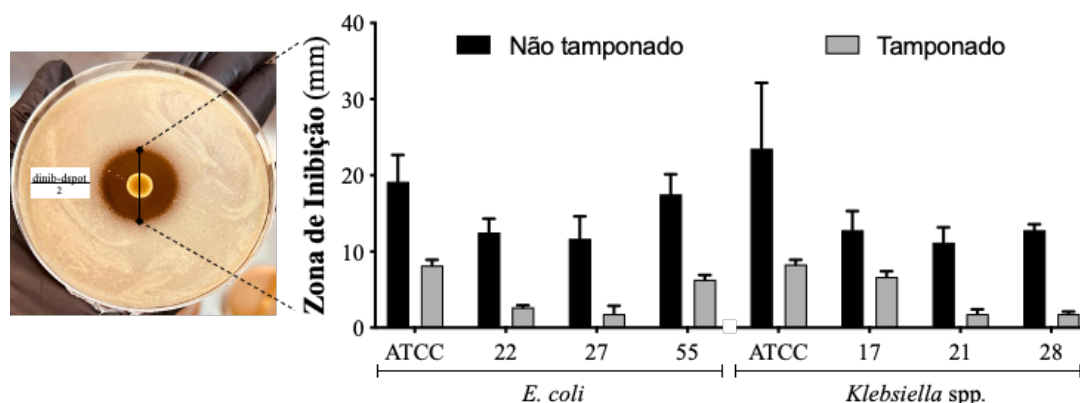
<sup>1</sup>CIM: Concentração Inibitória Mínima; PEN: Benzilpenicilina; AMP: Ampicilina; MPM: Meropenem; VEN: Vancomicina; CLI: Clindamicida; MTZ: Metronidazol.

<sup>2</sup> Interpretação conforme preconiza BrCAST, 2019 (S: sensível. R: resistente).

### 5.2 Teste de antagonismo

Os resultados demonstram antagonismo entre Lpk 01 e as demais cepas testadas. Embora Lpk 01 tenha demonstrado um elevado *score* de inibição (R) para a maioria das cepas testadas, é possível perceber, a partir da figura 4, que o valor observado de "R" varia bastante de acordo com a condição de pH do ágar. Lpk 01 em ágar não tamponado teve alto poder de inibição (R > 6 mm) contra todas as cepas avaliadas, apresentando valores superiores a 15 mm em alguns casos. Entretanto, a capacidade de inibição foi reduzida drasticamente utilizando ágar tamponado, em especial para cepas *E. coli* (C27), *K. pneumoniae* (C21 e C28) que não apresentaram capacidade de inibição (R < 2 mm).

Figura 4 - Atividade antagônica de *L. paracasei* (Lpk 01) em ágar tamponado e não tamponado contra isolados de enterobactérias através da técnica de *Spot Overlay*.



Fonte: Próprio autor (2023).

### 5.3 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana do Lpk-cf foi conduzida pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas de poliestireno de 96 poços, segundo Chen et al. (2019). Os resultados obtidos mostraram que o crescimento planctônico das cepas de enterobactérias testadas foi influenciado apenas pelo sobrenadante de Lpk 01 não neutralizado, o que demonstra que as cepas têm seu crescimento comprometido pela presença de Lpk-cf. Quanto ao PBM, todas as cepas apresentaram um valor de 50 %, com exceção da cepa C28, que apresentou valor superior a 50% (Tabela 03).

Tabela 03- Percentual Inibitório Mínimo (PIM) e Percentual Bactericida Mínimo (PBM) dos LPCf não neutralizados sobre enterobactérias resistentes.

Cepas	Código	Lpk-cf não neutralizado		Lpk-cf neutralizado	
		PIM	PBM	PIM	PBM
<i>E. coli</i>	ATCC 11303	30	50		
	C22	40	50		
	C27	40	50		
	C55	40	50		

	ATCC 700603	40	50	
				>50
	C17	20	50	
<i>Klebsiella</i> spp.	C21	30	50	
	C28	50	> 50	

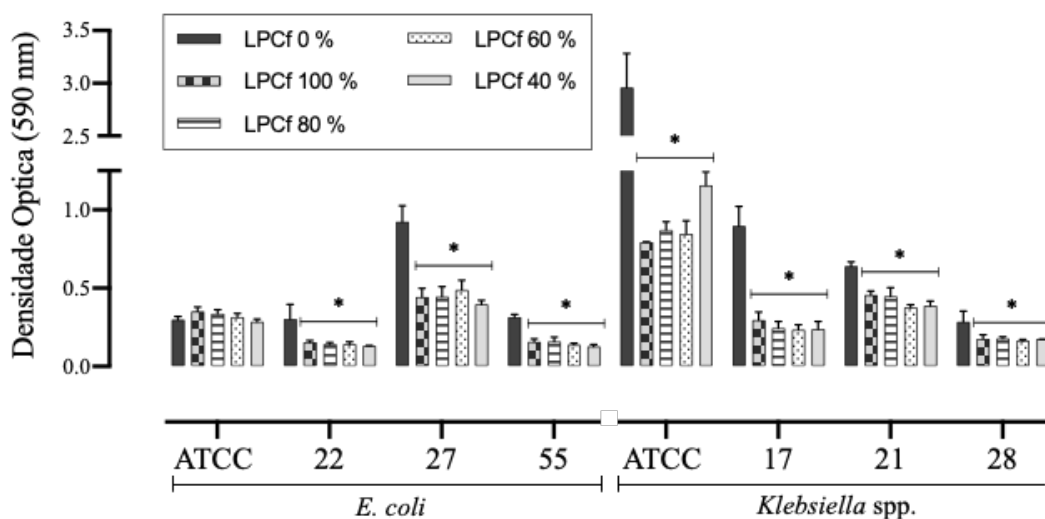
Fonte: Próprio autor (2023). Todos os valores são apresentados em porcentagem (%).

Devido a ausência de atividade antibacteriana detectável a partir da determinação de PIM e PBM, os testes abordando efeito de Lpk-cf sobre biofilmes pré-formados das enterobactérias foram realizados utilizando apenas o grupo não neutralizado.

#### 5.4 Atividade antibiofilme

Para a avaliação do efeito de Lpk-cf sobre biofilmes pré-formados (24h) optou-se por utilizar percentuais de 100, 80, 60 e 40 % de Lpk-cf não neutralizado. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle em todas as estirpes estudadas e em todas as porcentagens de Lpk-cf testadas sem uma relação dose-resposta aparente (Figura 5). Apenas na *E. coli* ATCC 11303 o contato com o sobrenadante não apresentou diminuição da biomassa do biofilme quando comparado ao grupo controle.

Figura 5 - Atividade do Lpk-cf sobre a erradicação do biofilme das enterobactérias.



Fonte: Próprio autor (2023). \*Diferença estatisticamente relevante do grupo tratado com Lpk-cf em relação ao controle não tratado ( $p < 0,01$ )

## 6 DISCUSSÃO

As DTAs, especialmente as de origem bacteriana, têm importante impacto na saúde pública mundial, com sintomas que englobam vômitos, diarreia, cólicas, dores de cabeça, febre, desidratação e outros (SWITAJ et al., 2015). A evolução dos patógenos envolvidos no sentido de resistência a antimicrobianos apresenta desafios para as terapias conservadoras, tornando necessário o desenvolvimento de alternativas coadjuvantes nesse processo (FLECKENSTEIN et al., 2021). Nesse contexto, destaca-se a utilização dos lactobacilos no combate a bactérias patogênicas, além de sua atuação na modulação do sistema imunológico e ação antioxidante (SLATTERY; COTTER; O'TOOLE, 2019). Talib et al. (2019), ao analisarem as propriedades das bactérias lácticas predominantes nos grãos de Kefir da Malásia, observaram que todos os *Lactobacillus* são candidatos promissores para alimentos e bebidas probióticos, uma vez que exibem propriedades probióticas e potencial antioxidante.

A sensibilidade destes microrganismos frente aos antibióticos é uma característica importante, uma vez que a resistência antimicrobiana é um problema global e diminui consideravelmente a eficácia da antibioticoterapia. Isso ocorre, pois, os microrganismos quando ingeridos, caso contenham genes de resistência, podem favorecer um reservatório destes no organismo humano, resultando em transferência para bactérias comensais e patogênicas ali instaladas, aumentando a disseminação da resistência antibiótica entre patógenos (ZHENG et al., 2017; ERGINKAYA, TURHAN, TATLI, 2018).

A cepa avaliada no presente estudo se mostrou sensível à maior parte dos antimicrobianos testados, contribuindo para a segurança da sua utilização como probiótico. Em contrapartida, apresentou resistência à vancomicina e ao metronidazol, sendo a primeira reportada como resistência intrínseca dos lactobacilos, característica essa natural do gênero que os diferencia de outros bacilos gram positivos, corroborando com estudos que analisaram essa resistência e segurança (GOLDSTEIN, TYRREL, CITRON, 2015; ERGINKAYA, TURHAN, TATLI, 2018; DAS et al., 2019; COLAUTTI et al., 2022; LIU et al., 2023; SHAHVERDE et al., 2023). Contudo, a avaliação da resistência antibiótica dos lactobacilos enfrenta desafios pela variabilidade de métodos utilizados nos diferentes estudos e, consequentemente, a falta de padronização na análise dos resultados.

Os resultados do teste de antagonismo revelaram uma atividade promissora entre Lpk 01 e as cepas de enterobactérias testadas. Essa capacidade inibitória pode ser atribuída à produção de metabólitos secundários, como ácidos orgânicos, bacteriocinas e outros peptídeos, os quais serão produzidos na fermentação bacteriana dos lactobacilos. Um estudo de Yang et

al. (2023) explorou o sobrenadante de *L. paracasei* e identificaram sete peptídeos com ação antibacteriana, capazes de tornar o ambiente desfavorável para o crescimento das enterobactérias. Diferentes mecanismos de ação foram propostos, como a capacidade de se ligar à proteína de membrana e à DNA polimerase, o que o torna hábil para interagir com o conteúdo intracelular e impedir o crescimento bacteriano. Em adição, a variação do score de inibição (R) com base no pH do meio sugere que a acidificação do ambiente pode ser um fator crucial na atividade antagônica, como demonstrado anteriormente em outros estudos (SHARMA et al., 2017; HU et al., 2019; ZHANG et al, 2021). Com isso, a diferença na capacidade de inibição entre o ágar tamponado e não tamponado, utilizado nas amostras do presente estudo, pode estar associada à maior habilidade do Lpk 01 de acidificar o meio não tamponado, resultando em uma atividade inibitória mais eficaz.

O protagonismo acidogênico do probiótico testado ganha mais atenção quando se observa a tabela 2, na qual o efeito bacteriostático e bactericida é observado somente quando o sobrenadante não passou por neutralização. Chen et al. (2019), testaram 31 isolados de *Lactobacillus* spp. contra cepas de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (CRE), incluindo *E.coli* e *K. pneumoniae*, onde identificaram que algumas cepas de *Lactobacillus*, como *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, apresentaram boa atividade antibacteriana contra CRE. No teste de microdiluição em caldo os efeitos inibitórios dos lactobacilos não mudaram após o aquecimento até 80°C por 10 min, no entanto, o efeito inibitório desapareceu assim que o pH aumentou para 7,0, ou seja, foi neutralizado, evidenciando a atividade acidogênica, corroborando com o presente estudo (Chen et al., 2019).

Em concordância, Hu et al. (2019) desenvolveram um estudo no qual analisaram o conteúdo de ácidos orgânicos durante o crescimento de *L. plantarum* e estudaram com sua capacidade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Salmonella typhimurium*. Seus achados mostram que, dos tratamentos utilizados na metodologia (aquecimento, catalase, proteinase K, pepsina, tripsina e ajuste de PH), o mais importante foi o ajuste de pH que diminuiu consideravelmente a zona de inibição na metodologia de difusão em ágar, indicando que a atividade antimicrobiana das três cepas testadas se deve principalmente aos ácidos orgânicos produzidos. Em contraste, um estudo de Poppi, et al (2015), avaliou o efeito antagônico de oito isolados de *Lactobacillus* contra *E. coli* O157:H7 e observaram que, embora todas as cepas testadas tenham produzido ácidos láctico e acético, a quantidade de ácido láctico produzida não teve influência na inibição da cepa patogênica, já que os sobrenadantes com as maiores concentrações deste não conseguiram exercer um efeito bactericida mais importante nas bactérias patogênicas do que as outras cepas.



Sabe-se que o sobrenadante das BALs contém uma variedade de compostos com propriedades antimicrobianas que afetam os patógenos ou constituintes da matriz de biofilme, tais como peróxido de hidrogênio, metabólitos de oxigênio, exopolissacarídeos, bacteriocinas e ácidos graxos saturados que atuam como biossurfactantes, exercendo uma função antibiofilme (MORADI et al., 2019; LEE, LEE, PAIK, 2021). Portanto, a ação do Lpk-cf na erradicação de biofilmes reforça a possibilidade de que os metabólitos produzidos por Lpk 01 tenham um impacto direto nas propriedades adesivas e na estrutura do biofilme, podendo romper a matriz extracelular, diminuindo sua coesão e estabilidade, como citado por Moradi et al. (2019). Além disso, a capacidade do Lpk-cf de reduzir a biomassa do biofilme pode estar associada com a inibição do crescimento bacteriano, afetando a formação contínua da matriz do biofilme.

Sob outra óptica, achados de Lee et al. (2022), identificaram que os efeitos inibitórios de BALs contra bactérias patogênicas são, possivelmente, afetados pelos genes de regulação negativa responsáveis pela formação de biofilme, bem como pelas habilidades adesivas e invasivas extracelular do biofilme. Em estudo semelhante, Koohestani et al. (2018), investigaram as propriedades antibacterianas e o potencial de remoção de biofilme do sobrenadante livre de células de *L. acidophilus* LA5 e *L. casei* 431 contra *S. aureus* ATCC 25923 que demonstraram uma boa atividade antibacteriana e antibiofilme, sugerindo que a aplicação de *Lactobacillus* pode ser bem aproveitada para controlar o crescimento de patógenos transmitidos por alimentos. Vale ressaltar que o uso de sobrenadantes livre de células é interessante visto que, *in vivo*, podem entrar em contato diretamente com as células imunes e sua concentração é fixa (WILSON; WALKER; YIN, 2021).

Em uma revisão detalhada conduzida por Bengoa et al. (2021) sobre *L. paracasei* isolados de grãos de kefir, foi concluído que o sobrenadante dessas cepas possui propriedades imunomoduladoras, gastroprotetoras e inibitórias contra microrganismos patogênicos. Essas características são atribuídas à presença de ácidos orgânicos, à produção de bacteriocinas e, possivelmente, à produção de exopolissacarídeos (EPS). No entanto, é crucial ressaltar que ainda existe uma lacuna significativa em relação ao conhecimento das moléculas efetoras e dos mecanismos de ação que culminam nesses efeitos benéficos. Isso ressalta a necessidade de mais investigações para desvendar as vias moleculares por meio das quais essas bactérias manifestam seu potencial terapêutico. Avanços nessa área não apenas enriqueceriam nosso entendimento científico, mas também poderiam ampliar significativamente as aplicações clínicas deste probiótico.

## 7 CONCLUSÃO

O Lpk 01 e o Lpk-cf demonstraram um potencial antibacteriano e antibiofilme promissor, o que sugere uma eficácia consistente na sua ação antagônica contra os microrganismos testados, possivelmente através da produção de ácidos orgânicos que interfere no crescimento planctônico e na estruturação do biofilme pré-formado desses patógenos. Embora estudos adicionais sejam necessários para identificar os metabólitos específicos do Lpk 01 responsáveis pelas atividades antagônicas observadas, os resultados deste estudo sugerem que a aplicação biotecnológica do Lpk 01 pode oferecer uma estratégia eficaz para reduzir os riscos à saúde impostos por enterobactérias resistentes.

## REFERÊNCIAS

- ABEBE E., GUGSA G., AHMED M. Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *J Trop Med*, v. 2020; 2020.
- AJAM, F.; KOOHSARI, H. The Effect of Some Fermentation Conditions on the Production of Kefiran by Kefir Grains in Fermented Milk. **Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology**, v. 9, p. 399–410, 2021
- ALMEIDA, M. V. A. de, et al. Drug resistance, AmpC- $\beta$ -lactamase and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from fish and shrimp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017.
- AMARAL, S. M. B, et al. Panorama dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 2009 a 2019. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar** - ISSN 2675-6218, 2(11), e211935, 2021.
- ARRUDA, A. D.; BERETTA, A. L. R. Z. Micotoxinas e seus efeitos à saúde humana: revisão de literatura. **RBAC**. Araras, São Paulo. ;51(4):286-9. 2019
- ASPRI, M; PAPADEMAS, P.; TSALTAS, D. Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products. **Fermentation**, v. 6, n. 1, 2020.
- AZIZI, Nor Farahin et al. Kefir and Its Biological Activities. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1210, 2021.
- BENGOA A.A., et al. Health-Promoting Properties of *Lactocaseibacillus paracasei*: A Focus on Kefir Isolates and Exopolysaccharide-Producing Strains. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2239, 2021.
- BENGOA, A. A. et al. Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. **Food Research International**, v. 103, p. 462–467, 2017.
- BERNARDES, N. B; et al. Intoxicação Alimentar um Problema de Saúde Pública. **Rev. Mult. Psic.** V.12, N. 42, p.894-906, 2018
- BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. SUS – MS, p. 17, 2017
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunizações e Doenças Transmissíveis. **Vigilância epidemiológica das doenças de transmissão hídrica e alimentar: manual de treinamento** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021.
- BRAVO-FERRADA, BÁRBARA M. et al. Cell surface damage and morphological changes in *Oenococcus oeni* after freeze-drying and incubation in synthetic wine. **Cryobiology**, v. 82, p. 15-21, 2018.

BrCAST, BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Tabela de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetro de halos.** Versão 9.0, 2019 do EUCAST. <http://brcast.org.br> Acesso em: Mar./2024

BRISSE, S. GRIMONT, F. GRIMONT, P. A. D. The Genus *Klebsiella* Taxonomic History and Structure. **The Prokaryotes**, p. 159-196, 2006

BLAIR JM, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol.** 13(1):42-51, 2015

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *E. coli (Escherichia coli)*. 2022. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>>. Acesso em Jul./2023.

CEARÁ. Secretaria de Saúde. **Boletim Epidemiológico.** Doenças diarreicas agudas – DAA e Doenças de transmissão hídrica e alimentar - DTHA, 2018.

CHEN, C. C. et al. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Front Microbiol.** ;10:789, 2019.

CHEW, S.Y., et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis-causing *Candida glabrata* isolates. **Journal of applied Microbiology**, v. 118, p.1180-1190. 2015.

CIOFU O, et al. Antibiotic treatment of biofilm infections. **APMIS.** 125(4):304-319, 2017.

CISSE H, et al. Treatment of bone and joint infections caused by *Enterobacter cloacae* with a fluoroquinolone-cotrimoxazole combination. **Int J Antimicrob Agents.** V. 54, n. 2, p. 245-248, 2019.

COLAUTTI A., et al. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. **Food Microbiol**, v. 103:103934, 2021.

DAS, D. J., et al. Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. **Nutrition**, 110567. 2019.

DE SIMONE C. The Unregulated Probiotic Market. **Clin Gastroenterol Hepatol.** Abr;17(5):809-817, 2019.

ERGINKAYA Z., TURHAN E.U., TATLI D. Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish fermented dairy products. **Iran J Vet Res.**, v. 19, n. 1, p. 53-56. 2018

ESPGHAN Special Interest Group on Gut Microbiota and Modifications. Probiotics for the Management of Pediatric Gastrointestinal Disorders: Position Paper of the ESPGHAN Special Interest Group on Gut Microbiota and Modifications. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** Fev 1;76(2):232-247. 2023

FAN Q., et al. Antimicrobial and anti-biofilm activity of thymoquinone against *Shigella flexneri*. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 105, n. 11, p.: 709-4718, 2021.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United States of America. **Guidelines for the evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**, v. 85, p. 1-4. 2001.

FDA. US. FOOD & DRUG. Foodborne Pathogens. USA, 2022. **What You Need to Know about Foodborne Illnesses.** < <https://www.fda.gov/food/consumers/what-you-need-know-about-foodborne-illnesses>> Acesso em: Mar./2023

FERNANDES M.S.M., et al. Effect of *Lactobacillus* spp. cell-free supernatant against planktonic growth and biofilm formation of foodborne *Escherichia coli* isolates. **Lett Appl Microbiol.** 76(1): ovac006, 2023.

FIORDA, F. A. et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - **A review. Food Microbiology**, v. 66, p. 86-95. 2017.

FLECKENSTEIN J.M., MATTHEW K. F., SHEIKH A. Gastroenterite Bacteriana Aguda. **Gastroenterol Clin North Am.**;50(2):283-304. Jun. 2021.

GAGLIARDI, A., et al. Rebuilding gut microbiota ecosystem. **Environ Res and Public Health**, v. 15, n. 1679, p. 1-24. 2018.

GAROUSI M., et al. A global systematic review and meta-analysis on correlation between biofilm producers and non-biofilm producers with antibiotic resistance in Uropathogenic *Escherichia coli*. **Microb Pathog.** v.164, p. 105412, 2022.

GOLDSTEIN E.J., TYRRELL K.L., CITRON D.M. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clin Infect Dis.** ;60 Suppl 2:S98-107, 2015.

HADADI-FISHANI M., KHALEDI A., FATEMI-NASAB Z.S. Correlation between biofilm formation and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a meta-analysis. **Infez Med.** V. 28, n. 1, p. 47-54. 2020

HALDER, D.; MANDAL, S. Antibacterial potentiality of commercially available probiotic *Lactobacilli* and curd *Lactobacilli* strains, alone and in combination, against human pathogenic bacteria. **Translational Biomedicine**, v. 7, n. 2, p. 1-7. 2016.

HAMAD, G. M., et al. A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. **Food Control.** v.144, 2023.

HAMILTON, A. L.; et al. *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v, 31, n. 3, p. 17-85, 2018.

HARTANTYO S.H.P., et al. Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Potential, Antibiotic Resistance, and Risks to Food Safety. **J Food Prot**, v. 83, n. 7, p. 1096-1103, 2020.

HENRIKSEN A.S., SMART J.I., HAMED K. Susceptibility to ceftobiprole of respiratory-tract pathogens collected in the United Kingdom and Ireland during 2014-2015. **Infect Drug Resist**, v.11, p.1309-1320, 2018

HU, C.H., et al. Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. **Food Sci Nutr.** V. 7, n. 6, p. 1997-2005, 2019.

HUANG, SHIH-YI et al. *Lactobacillus paracasei* PS23 delays progression of age-related cognitive decline in senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 894, 2018.

JANDA JM, ABBOTT SL. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: "Enterobacterales"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Clin Microbiol Rev**, v. 34, n. 2, 2021.

JENKINS, C., et al. Infectious Diseases. **Elsevier**, Fourth edition. 2017.

KWASI D.A., et al. Antibiofilm agents with therapeutic potential against enteroaggregative *Escherichia coli*. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 16, n.10, :e0010809, 2022.

KHALIFA, H. O. et al. First report of foodborne *Klebsiella pneumoniae* coharboring bla VIM-1, bla NDM-1, and mcr-9. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 9, p. e00882-20, 2020.

KHATER, DALIA F. et al. Detection of harmful foodborne pathogens in food samples at the points of sale by MALDT-TOF MS in Egypt. **BMC Research Notes**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2021.

KECHAGIA, M. et al. Health Benefits of Probiotics: A Review. **ISRN Nutrition**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

KIM, SANG-OH; KIM, SANG-SOON. Recent (2011–2017) foodborne outbreak cases in the Republic of Korea compared to the United States: a review. **Food Science and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 185-194, 2021.

KIM J.J., RYU S., LEE H. Foodborne Illness Outbreaks in Gyeonggi Province, Korea, Following Seafood Consumption Potentially Caused by *Kudoa septempunctata* between 2015 and 2016. **Osong Public Health Res Perspect**, v. 9, p.66–72. 2018.

KOOHESTANI M., et al. Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus*. **Vet Res Forum**. 2018 Fall;9(4):301-306, 2018.

KOUTSOUMANIS K., et al Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. **EFSA J**. 18(7): e06174, 2020.

KURITTU, P. et al. Plasmid-borne and chromosomal ESBL/AmpC genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in global food products. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 592291, 2021.

LEE H.B., et al Antibiofilm, AntiAdhesive and Anti-Invasive Activities of Bacterial Lysates Extracted from *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes*. **Foods**, v. 11, n. 19, p. 2948. 2022.

LEE J.E., LEE N.K., PAIK H.D. Antimicrobial and anti-biofilm effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU200656 isolated from kimchi. **Food Sci Biotechnol.**, v. 30, n. 1, p. 97-106. 2020.

LEE, H.; YOOU, Y. Etiological agents implicated in foodborne illness world wide. **Food Science of Animal Resources**, v. 41, n. 1, p. 1, 2021.

LIMA L.M., et al.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **Eur J Med Chem**. v. 208, p. 112829, 2020

LIU Z, et al. Isolamento e caracterização de potenciais cepas de *Lactobacillus acidophilus* isoladas de fezes de porco. **Anim Sci J.**, v. 94, n. 1 p. e13869. 2023.

LOURENÇO, M. L. M. C. Potencial probiótico de microrganismos isolados de grãos de kefir: uma análise in vitro. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** – Universidade Federal do Ceará (UFC). Sobral, Ceará, 2021.

LUCACCIONI H., SÁ MACHADO R. Burden and Trends of Severe Rotavirus Infections and Allcause Acute Gastroenteritis Hospital Episodes in Children Under Five Years Old in Mainland Portugal. **Acta Med Port.** 34(10):669-676, 2021

MARQUES, P. R. C.; TRINDADE, R. V. R. Panorama epidemiológico dos surtos de doenças transmitidas por alimentos entre 2000 e 2021 no Brasil. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 3, n. 3, 2022.

MELO, E.S., et al. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. **Pubvet**, v. 12, n. 10, 2018.

MENGE, C. Molecular Biology of *Escherichia Coli* Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. **Toxins (Basel)**, v. 12, n. 5, p.345, 2020.

MINJ J., et al. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: current applications and research perspectives. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v. 61, n. 13, p. 2207-2224, 2021

MIQUEL, S., et al. Anti-biofilm Activity as a Health. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 592, p.1-14. 2016.

MLYNARCIK P.; RODEROVA M.;KOLAR M. Primer Evaluation for PCR and its Application for Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **Jundishapur J Microbiol**, v. 9, n. 1, 2016.

MORADI M, MARDANI K, TAJIK H. Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* *in vitro* and in food models . **LWT-Food Sci. Technol.**, v. 111, p. 457–464. 2019.

OLIVEIRA, J. A. S; FERREIRA, L. C. Subnotificação de doenças transmitidas por alimentos em Januária-MG. **Uniciencias**, v.25, n.2, p.77-79. 2021.

OLIVEIRA, M.A., et al. *Enterobacteriaceae*: Bactérias intestinais de organismos aquáticos, um risco à saúde pública – Revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. Ano XIII, n 25. 2015.

OMS. Organização Mundial de Saúde. OPAS. Organização Pan Americana de Saúde. **Resistencia antimicrobiana**. 2023. Disponível em:

<<https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>>. Acesso em Set./ 2023.

O'TOOLE, G.A.; Microtiter dish biofilm formation assay. **JoVE**, v. 47. 2011.

PAITAN, Yossi. Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. In: FRANKEL, G.; RON, E. Z. **Escherichia Coli: A versatile pathogen**. Curr Top Microbiol Immunol. Springer, p.181 – 211, 2018

PAKBIN B., BRÜCK W.M., ROSSEN J.W.A. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. **Int J Mol Sci**. Sep 14;22(18):9922. 2021.

- PALETTA, A. C. C; CASTRO, V. S.; CONTE-JUNIOR, A. A. Shiga Toxin-Producing and Enteroaggregative *Escherichia coli* in Animal, Foods, and Humans: Pathogenicity Mechanisms, Detection Methods, and Epidemiology. **Current Microbiology**, v.77, n. 4. 2020
- PEXARA A, GOVARIS A. Foodborne Viruses and Innovative Non-Thermal Food-Processing Technologies. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1520, 2020.
- PIRES, S. M. et al. Burden of foodborne diseases: think global, act local. **Current Opinion in Food Science**, v. 39, p. 152-159, june 2021.
- PLAVEC T.V., BERLEC A. Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. **Microorganisms**. 8(2):297, 2020.
- PLESSAS S., et al. Isolation of a *Lactobacillus paracasei* Strain with Probiotic Attributes from Kefir Grains. **Biomedicines**. 8(12):594, 2020.
- POPPI L.B., et al. Efeito do sobrenadante de isolados de *Lactobacillus sp.* sobre *Escherichia coli* O157: H7 reforça o papel da produção de ácidos orgânicos como fator de controle patogênico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 353-359, 2015.
- POIREL L., et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiol Spectr**, v. 6, n. 4, 2018.
- QUEIROGA M.C, et al. Antimicrobial, Antibiofilm and Toxicological Assessment of Propolis. **Antibiotics (Basel)**. v.12, n.2, p. 347, 2023.
- RETTEDAL S., et al. First outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Norwegian neonatal intensive care unit; associated with contaminated breast milk and resolved by strict cohorting. **APMIS**, v. 120, n. 8, p. 612-21, 2012
- RILEY, L.W. Extraintestinal Foodborne Pathogens. **Annu Rev Food Sci Technol**. 25;11:275-294. Mar 2020.
- ROMERO-LUNA H.E., et al. Probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* CT12 isolated from water kefir grains (Tibicos) **Curr. Microbiol**. 77:2584–2592, 2020.
- ROSA, T. F. da, et al. (2020). Estratégias emergentes para tratamento de ESKAPE. **Saúde (Santa Maria)**, 46(1), 2020.
- RUIZ, M.J., et al. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus spp.* sobre bacterias implicadas em enfermedades transmitidas por alimentos. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 49, n.2, p. 174-177. 2017.
- SAROWSKA. J., et al. The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. **Adv Clin Exp Med.**; v. 22, p. 759–766. 2013
- SHAHVERDI .S, et al. *In-vitro* and *in-vivo* antibacterial activity of potential probiotic *Lactobacillus paracasei* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Heliyon**, v. 9, n. 4, p. e14641. 2023.
- SHARMA C, et al. Antibacterial effects of *Lactobacillus* isolates of curd and human milk origin against food-borne and human pathogens. **3 Biotech**. v. 7, n. 1, p. 31, 2017.



- SHUHADHA, M.F., et al. Evaluation of probiotic attributes of *Lactobacillus sp.* isolated from cow and buffalo curd samples collected from Kandy. **Ceylon Med J.** v. 62, n. 3, p. 159-166, 2017.
- SHANGGUAN W., et al. Anti-biofilm potential of kefir-derived *Lactobacillus paracasei* L10 against *Vibrio parahaemolyticus*. **Lett Appl Microbiol.** v. 73, n. 6, p. 750-758, 2021.
- SHARMA A., GUPTA V.K., PATHANIA R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian J Med Res.** v. 149, n. 2, p. 129-145, 2019.
- SLATTERY, C.; COTTER, P. D.; O'TOOLE, P. W. Analysis of Health Benefits Conferred by *Lactobacillus* Species from Kefir. **Nutrients**, v.11. 2019
- SORAGNI, L.; BARNABE, A. S.; MELLO, T. R. C. Doenças transmitidas por alimentos e participação da manipulação inadequada para sua ocorrência: uma revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v. 9, n. 2, p. 19-31, abr./jun. 2019.
- STIEMSMA, LT, et al. Does Consumption of Fermented Foods Modify the Human Gut Microbiota? **J Nutr.** 150(7):1680-1692, jul. 2020.
- SWITAJ T.L., WINTER K.J., CHRISTENSEN S.R. Diagnosis and Management of Foodborne Illness. **Am. Família. Phys.** 92:358–365, 2015.
- TABASI M., et al. Phenotypic Assays to Determine Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Isolates and their Correlation with Antibiotic Resistance Pattern. **Osong Public Health Res Perspect.** 6(4):261-8, 2015.
- TALIB N, et al. Isolation and Characterization of *Lactobacillus spp.* from Kefir Samples in Malaysia. **Molecules**.;v. 24, n. 14, p. 2606, 2019.
- THOMAS, K. M. et al. Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, 026, 0111, 0103 and 145 in Irish cattle. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 288-296, 2012.
- TOMPKINS K.; VAN DUIN D. Treatment for carbapenem-resistant Enterobacterales infections: recent advances and future directions. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** V. 40, n. 10, p. 2053-2068, 2021.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- TOOKE, C. L. et al.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **J Mol Biol.** , v. 431, n. 18. 2019
- URUÉN C., et al. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. **Antibiotics (Basel).** v. 10, n. 1, p. 3, 2020.
- VAZOURAS K., et al. Antibiotic treatment and antimicrobial resistance in children with urinary tract infections. **J glob antimicrob resist.** V. 20, p. 4-10, 2020.
- VERDEROSA, A. D.; TOTSIKA, M.; FAIRFULL-SMITH, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 1-17, 2019.

- VUOTTO, C.; LONGO, F.; DONELLI, G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *International Journal of Oral Science*, v. 6, p. 189-194. 2014.
- WANG Z., SHEN Y., HAAPASALO M. Antibiofilm peptides against oral biofilms. *J Oral Microbiol.* v. 9, n. 1, p. 1327308, 2017
- WIEËRS G, et al. How Probiotics Affect the Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* v. 9, p. 454, 2020.
- WILSON, R. M; WALKER, J. M.; YIN, K. Different Concentrations of *Lactobacillus acidophilus* Cell Free Filtrate Have Differing Anti-Biofilm and Immunomodulatory Effects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v. 11, 2021.
- WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION. **World Gastroenterology Organization World Guidelines - Probiotics and Prebiotics**, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Londres, 2002. Disponível em: < <http://fanus.com.ar/posgrado/10-09-25/fao%20probiotics.pdf>>. Acesso em Ago./2023.
- WYRES K.L., LAM M.M.C., HOLT, K.E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol.* v. 18, n. 6, p. 344-359, 2020.
- YADAV M.K., et al. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 106, n. 2, p. 505-521, 2022
- YANG S., et al. Lacticaseibacillus paracasei fermentation broth identified peptide, Y2Fr, and its antibacterial activity on *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb Pathog.*, v. 182:106260. 2023.
- YIN, W., et al. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 14, p. 20. 2019
- ZHANG C., et al. Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. *ISME J.* v. 10, p. 2235–2245. 2016.
- ZHANG H., et al. Antibacterial Activity of Lactic Acid Producing *Leuconostoc mesenteroides* QZ1178 Against Pathogenic *Gallibacterium anatis*. *Front Vet Sci.* 8:630294, 2021.
- ZHAO F., et al. Sequencing and Genetic Variation of Multidrug Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS ONE* v. 5, n. 4: e10141, 2010.
- ZHENG M., et al. Assessing the Risk of Probiotic Dietary Supplements in the Context of Antibiotic Resistance. *Front Microbiol.* V. 19, n. 8, p. 908. 2017.