

ANTAGONISMO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS CONTRA *Staphylococcus aureus* PRODUTOR DE ENTEROTOXINA C EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL DURANTE A ESTOCAGEM

Antagonism of lactic acid bacteria against *Staphylococcus aureus* enterotoxin C producer in Minas Frescal cheese during storage

Emanuelly Gomes Alves Mariano^{1*}, Marcelo Resende de Souza², Eduardo Robson Duarte¹, Ricardo Souza Dias³

RESUMO

A avaliação dos parâmetros microbiológicos de alimentos representa indícios da qualidade e segurança de suas matrizes, que podem oferecer riscos e causar danos à saúde do consumidor quando os valores observados estão incompatíveis com os critérios apropriados. O leite e seus produtos derivados estão frequentemente relacionados à intoxicação estafilocócica, uma vez que cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp. é citado como um dos causadores de mastite bovina. Como forma de elucidar alternativas eficazes de impedir o desenvolvimento de *S. aureus* em matriz láctea, produziram-se queijos, adicionados de combinações de uma cepa padrão *S. aureus* FRI361 produtora de enterotoxina C, e duas bactérias ácido-láticas (BAL) *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* isoladas de soro-fermento de queijarias cadastradas da Canastra em Minas Gerais e identificadas proteômica e geneticamente pela técnica de MALDI-TOF. Os queijos Minas Frescal, produzidos com cepas de BAL, foram capazes de reduzir a contagem de *S. aureus* do 1º ao 14º dia após a produção, nos tratamentos que apresentaram pelo menos uma BAL junto do patógeno. A presença de bactérias ácido-láticas mostrou potencial ação inibidora frente ao *S. aureus* no queijo Minas Frescal, podendo contribuir para a melhoria da qualidade sanitária de queijos frescos.

Palavras-chave: queijo fresco, *Staphylococcus coagulase* positiva, enterotoxina estafilocócica, *Lactobacillus* spp., qualidade sanitária.

ABSTRACT

The evaluation of the microbiological parameters of food represents evidence of the quality and safety of these matrices, which can offer risks and cause damage to the health of the consumer when the observed values are incompatible with the appropriate criteria. Milk and its derived products are often related to staphylococcal intoxication since *Staphylococcus* spp. is cited as one of the causes of bovine mastitis. As a way of elucidating effective alternatives to

1 Universidade Federal de Minas Gerais, *Campus* Montes Claros, Av. Universitária, 1000, Universitário, 39404-547, Montes Claros, MG, Brasil. E-mail: manugmalves@hotmail.com.

2 Universidade Federal de Minas Gerais, *Campus* Pampulha, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

2 Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

*Autor para correspondência

Recebido / Received: 21/10/2020

Aprovado / Approved: 02/06/2021

prevent the development of *S. aureus* in a milk matrix, cheeses were produced with combinations of a standard *S. aureus* strain that produces enterotoxin C, and two lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* isolated from fermented whey from registered Canastra cheese makers in Minas Gerais and identified proteomically by the MALDI-TOF technique. Minas Frescal cheeses produced with BAL strains were able to reduce the count of *S. aureus* from the 1st to the 14th day after production, in treatments that presented at least one BAL along with the food pathogen. The presence of lactic acid bacteria showed a potential inhibitory action against *S. aureus* FRI361 in Minas Frescal cheese, which may contribute to improving the health quality of fresh cheeses.

Keywords: fresh cheese, coagulase positive *Staphylococcus*, staphylococcal enterotoxin, *Lactobacillus* spp., sanitary quality.

INTRODUÇÃO

O queijo fresco está entre as categorias de derivados lácteos de intenso consumo no Brasil. Apesar dos queijos frescos apresentarem características sensoriais mais aceitáveis pelo público, é verificado que alguns podem vir a ser produzidos sem a devida inspeção sanitária, usando práticas de fabricação inadequadas (CAVALCANTE *et al.*, 2013). O queijo fresco é altamente perecível, fornecendo condições para o desenvolvimento de diversas espécies bacterianas patogênicas incluindo o *S. aureus* (ARCURI *et al.*, 2010).

Os produtos lácteos constituem o quarto setor com distribuição dos alimentos incriminados em surtos de enfermidades veiculadas por alimentos. *Staphylococcus aureus* foi o terceiro patógeno mais comum, responsável por doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre 2009 e 2018 (BRASIL, 2019; FINGER *et al.*, 2019). Os queijos frescos ou moles estão entre os produtos que mais são acometidos por contaminação de *Staphylococcus* spp., sendo o queijo Minas Frescal um produto altamente perecível, fornecendo condições para o desenvolvimento de muitas espécies bacterianas patogênicas incluindo *S. aureus* (ARCURI *et al.*, 2010).

A fabricação de queijos deve estar de acordo com os requisitos gerais de higiene e de Boas Práticas de Fabricação (BPF), previamente estabelecidos para a produção de queijos seguros ao consumo humano (BRASIL, 1997). A pasteurização do leite é realizada para inativar bactérias patogênicas que estão no substrato lácteo. Entretanto, procedimentos incorretos possibilitam a sobrevivência ou introdução de patógenos no produto, havendo recontaminação,

o que pode comprometer sua inocuidade e qualidade (FORSYTHE, 2013).

Os desafios para assegurar a ausência de patógenos nos queijos artesanais brasileiros são atribuídos ao uso de leite não pasteurizado e as interrupções na cadeia de produção/comércio devido à falha em boas práticas de higiene e de fabricação (PINEDA *et al.*, 2021). Campos *et al.* (2021) ao avaliarem a contagem microbiológica do queijo Canastra, produzido com leite cru e uma cultura endógena de pingo, verificaram que os limites microbiológicos regulatórios relacionados à contagem de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus* poderiam ser alcançados antes de 22 dias. Além disso, em estudo com queijos coletados em um pool maior de produtores (amostras com 22 dias de maturação) mostrou um elevado número de não conformidades à regulamentação brasileira (CAMPOS *et al.*, 2021). Pesquisas elucidam ausência de parâmetros microbiológicos e significativas contagens bacterianas em queijo Minas Artesanal, produzido com leite cru no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2015).

Por se tratar de microrganismo que exhibe capacidade de adaptação às condições ambientais adversas, representa um importante agente de intoxicação alimentar. A contaminação estafilocócica também é responsável pelos sinais e sintomas da doença e a produção da toxina está relacionada com o desenvolvimento e a proliferação do microrganismo nos alimentos, de modo que a contagem de colônias bacterianas é usada para determinar a segurança do produto. A intoxicação alimentar estafilocócica é causada, predominantemente, por amostras coagulase positivo (SCHELIN *et al.*, 2011). A intoxicação

estafilocócica é rotulada no grupo de risco III, sendo uma enfermidade de perigo moderado, de curta duração e sem ameaça de morte ou sequelas, mas que gera severo desconforto (ICMSF, 2018).

O uso de bactérias láticas como cultura iniciadora em produtos fermentados está relacionado ao metabolismo primário, que auxilia para a rápida acidificação do produto e conservação durante o armazenamento (HAYEK; IBRAHIM, 2013). Aragon-Alegro *et al.* (2021) ao analisarem queijos Minas Frescal, produzidos com leite pasteurizado contendo ácido láctico (> 0,3%) e *L. monocytogenes*, evidenciaram que o patógeno é sensível à concentração de ácido láctico, indicando que o ácido láctico influenciou fortemente a população de *L. monocytogenes*. O gênero *Lactobacillus* é um dos mais utilizados em alimentos e sobressai por sobreviver a ambientes e ou substratos mais ácidos, além de produzirem metabólitos com potencial antimicrobiano, importante para o tratamento e prevenção de infecção por patógenos (DUARTE *et al.*, 2016). Assim, este estudo objetivou avaliar a atividade antagonista de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*, sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em queijos Minas Frescal.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da curva de crescimento bacteriano

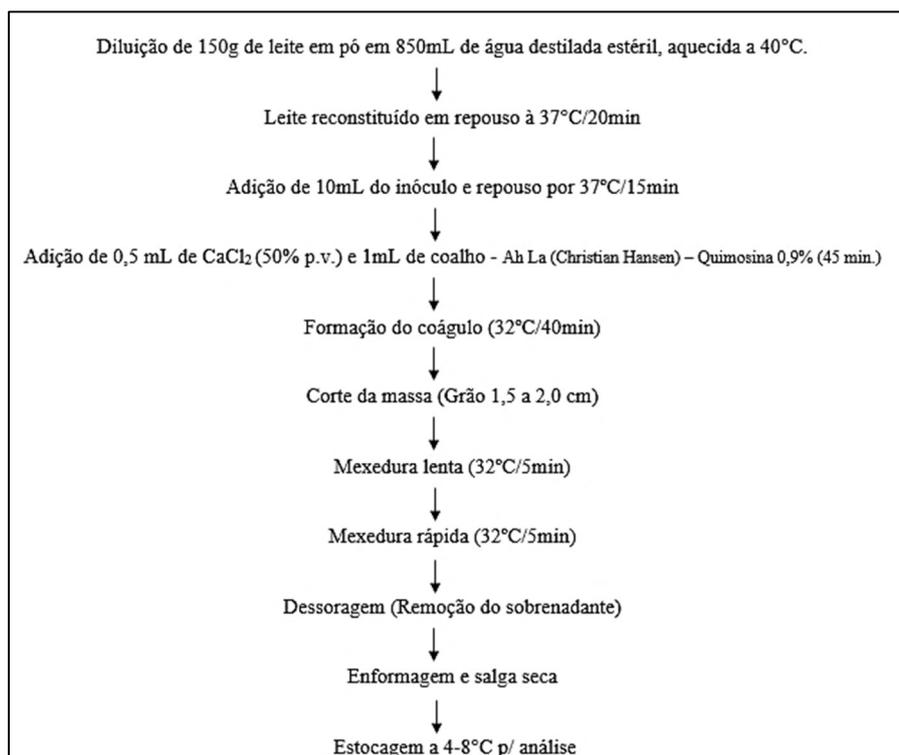
Os inóculos bacterianos foram adicionados ao leite em pó, reconstituído a 10%, através de combinações de duas culturas de bactérias ácido-láticas, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*, bem como uma cepa padrão de *S. aureus* produtor da enterotoxina C (FRI 361). As cepas bacterianas foram obtidas através do banco de cultura do Departamento de Tecnologia e Inspeção, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As bactérias ácido-láticas (BAL) foram isoladas de soro-fermento de queijarias cadastradas da Canastra e identificadas por análise proteômica adaptada de Freiwald; Sauer (2009), analisadas por *Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectroscopy* (MALDI-TOF MS), Bruker Daltonics, modelo UltrafleXtreme. A estirpe produtora da toxina C,

foi selecionada, uma vez que a literatura evidencia a incidência em alimentos relacionados em surtos de intoxicação estafilocócica (CARVALHO *et al.*, 2013; SILVA, 2013). Os inóculos bacterianos foram padronizados por enumeração de microrganismos viáveis do cultivo, a 35-37°C após 26 horas, mediante a obtenção da curva de crescimento de cada bactéria. A curva obtida para cada microrganismo foi realizada em três repetições e construída em Log de número de colônias (UFC) em função do tempo em horas. Concomitante, foram determinados o pH e acidez, durante a fermentação bacteriana, em leite em pó desnatado reconstituído a 10%. Os testes foram realizados em três diferentes lotes, configurando as três repetições experimentais.

Elaboração do queijo tipo Minas Frescal

O leite utilizado para a produção dos queijos foi avaliado quanto a presença de inibidores de crescimento microbiano, segundo a metodologia descrita por Neal; Calbert (1955), utilizando o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). Para o controle microbiológico foram realizadas análises de determinação de coliformes totais e termotolerantes (NMP/mL) (KORNACKI *et al.*, 2015), contagem de *Staphylococcus* spp. (UFC/mL) (BENNETT *et al.*, 2015), bactérias láticas (UFC/mL) em ágar MRS – de Man Rogosa e Sharpe de acordo com Mac Fadin (1980). Foram elaborados queijos frescos a partir de três lotes distintos de leite em pó desnatado Itambé® reconstituído a 15%. Cada lote de leite em pó configurou uma repetição. Os queijos foram produzidos em distintas combinações entre os inóculos bacterianos, a partir de uma cultura de *S. aureus* e duas culturas de BAL e grupo controle.

Um total de 63 queijos de 200 g cada, foram produzidos em laboratório sob condições de esterilidade após a confirmação de ausência de inibidores de crescimento microbiano e dos microrganismos. Para cada repetição, os queijos foram produzidos seguindo o fluxograma (Figura 1). Após o processamento, os queijos foram armazenados em B.O.D à temperatura de refrigeração (8°C ± 2°C) por 1, 7 e 14 dias, períodos em que os queijos foram analisados.

Figura 1. Fluxograma de produção do queijo tipo Minas Frescal

O processo de salga do queijo tipo Minas Frescal, além de conferir sabor ao produto contribui com a dessoragem do produto. Este procedimento consistiu na aplicação de sal na superfície externa do queijo, durante a etapa de enformagem. O sal adicionado se dissolve lentamente em função da umidade do produto.

Análises físico-químicas e microbiológicas do queijo tipo Minas Frescal

Para a amostra controle, nos dias 1, 7 e 14, foram determinados a acidez titulável (gramas de ácido láctico/100 g) segundo a metodologia descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995). O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber (BRASIL, 2006), e o de proteínas pelo método micro Kjeldahl, segundo IDF (1993). Por fim, os teores de umidade, extrato seco total (EST) foram determinados pelo método gravimétrico (IDF, 1982) e cinzas por dessecação em estufa e pela calcinação em mufla (BRASIL, 2006).

As análises microbiológicas foram realizadas com os queijos nos dias 1, 7 e 14 de estoca-

gem, sob refrigeração. Os queijos de todos os tratamentos foram pesados (25 g), triturados e diluídos em 225 mL de solução salina peptonada (0,1%), correspondendo à diluição 10^{-1} . Em seguida, foram realizadas diluições até 10^{-7} e o plaqueamento por semeadura em superfície em placas de Petri contendo ágar Baird Parker para contagem de *Staphylococcus* (UFC/g) (BENNETT *et al.*, 2015). Em placas contendo ágar MRS foram realizadas a contagem das bactérias ácido-láticas (UFC/g) de acordo com Mac Fadin (1980) e a determinação de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g) (KORNACKI *et al.*, 2015).

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi elaborado segundo esquema fatorial 7×3 , sendo sete combinações dos microrganismos (Tabela 1) e três tempos de estocagem dos queijos, em três repetições. As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância com o teste Scott-Knott, para comparação das contagens de BAL e *S. aureus*, considerando nível de significância de 5%.

Tabela 1. Combinação e contagem dos inóculos de *S. aureus* (FRI 361) produtor de SEC e bactérias ácido-láticas para elaboração dos queijos Minas Frescal

Queijo	Inóculo	Contagem média (UFC/mL)
A (Controle)	Sem adição de bactérias	-
B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	10 ⁸
C	<i>Lactobacillus plantarum</i>	10 ⁸
D	<i>Staphylococcus aureus</i> SEC (FRI 361)	10 ⁶
E	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> + <i>Staphylococcus aureus</i> SEC (FRI 361)	10 ⁸ / 10 ⁸
F	<i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Staphylococcus aureus</i> SEC (FRI 361)	10 ⁸ / 10 ⁸
G	<i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁸ / 10 ⁸ / 10 ⁶

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curva de crescimento

A curva de crescimento (Log do número de colônias em função do tempo em horas) para os diferentes microrganismos, pH e acidez estão representadas na Figura 2.

Como observado na Figura 2, os microrganismos *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *S. aureus* apresentaram um comportamento semelhante quanto aos parâmetros de multiplicação celular, acidez e pH, ao longo do tempo avaliado. A análise dos resultados indica que a partir de 4h de incubação à 37°C, a cepa de *S. aureus* atingiu a concentração de 10⁶ UFC/mL e as BAL alcançaram 10⁸ UFC/mL após 12 horas de incubação. Após 26 horas de fermentação, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *S. aureus*, apresentaram valores médios de pH 4,28; 4,08; 4,87 e acidez de 0,912; 0,894; 0,573, respectivamente. Análises físico-químicas e microbiológicas do queijo tipo Minas Frescal.

O tratamento controle (A), quanto aos parâmetros físico-químicos nos dias 1, 7 e 14, apresentou valores médios de 72,19; 72,35; 70,85% de umidade, 15,15; 15,92; 15,45% de

proteína, 4,11; 3,89; 3,74% de cinzas e 0% de gordura, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira para o queijo de muito alta umidade (BRASIL, 1996). Os inóculos utilizados na produção dos queijos apresentaram contagens satisfatórias de acordo com o preconizado experimentalmente (Tabela 2).

Os queijos produzidos com três lotes distintos de leite em pó, foram analisados. Embora os queijos tenham sido produzidos adotando-se todos os critérios assépticos, observou-se crescimento bacteriano com contagem de colônias típicas de BAL e *S. aureus* (Tabelas 3 e 4) nos queijos pertencentes ao tratamento A (controle), no qual não houve a inoculação destas mesmas bactérias. A contagem de BAL nos queijos pertencentes a esse tratamento, nos dias 1 e 7 foi inferior à contagem encontrada nos queijos dos demais tratamentos em que houve a inoculação de BAL na sua produção ($p < 0,05$). Porém, no dia 14, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), da contagem de BAL entre o controle (A) e o tratamento (C) (*L. plantarum*). O restante diferiu-se significativamente.

Figura 2. Resultados obtidos durante a obtenção da curva de crescimento à 37°C no leite em pó reconstituído a 10%. Acidez e pH dos inóculos utilizados na produção dos queijos no substrato de leite em pó desnatado reconstituído a 10%

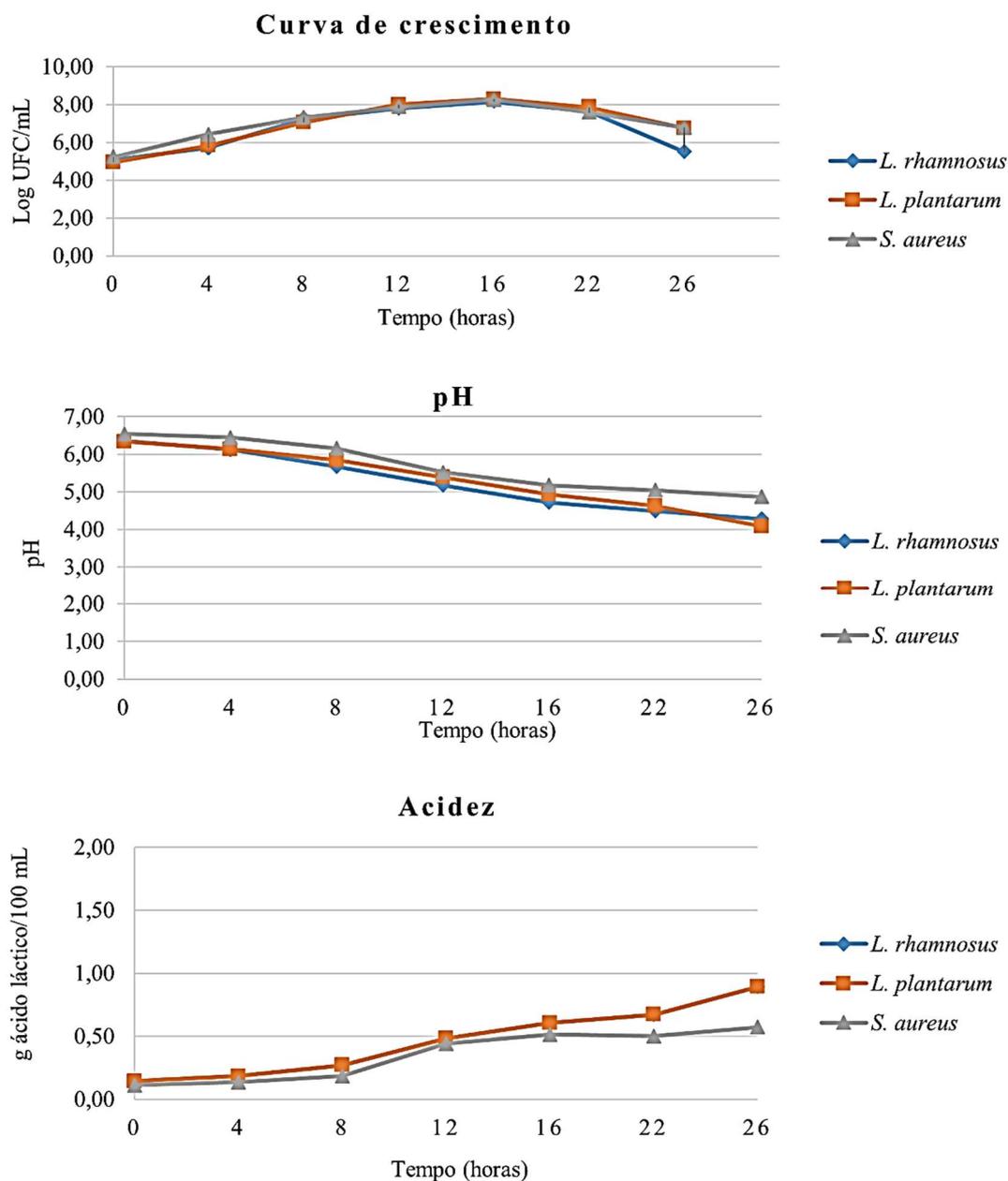


Tabela 2. Médias de contagens em Log UFC/mL de BAL e *S. aureus* nos inóculos utilizados na produção dos queijos

Microrganismo (inóculo)	Contagem (Log UFC/mL)
<i>L. rhamnosus</i>	8,31
<i>L. plantarum</i>	8,18
<i>S. aureus</i> (FRI 361)	6,85

Tabela 3. Médias das contagens de BAL (*L. rhamnosus*, *L. plantarum*) (Log UFC/g) em queijos elaborados com BAL e *S. aureus*, nos tempos 1, 7 e 14 dias e estocagem à 8°C ± 2°C

Tratamentos		Dia 1	Dia 7	Dia 14
A	Controle	4,40 ^{Cf}	5,90 ^{Bf}	7,40 ^{Ad}
B	<i>L. rhamnosus</i>	7,49 ^{Bc}	8,49 ^{Bd}	8,86 ^{Ab}
C	<i>L. plantarum</i>	7,43 ^{Cd}	8,19 ^{Be}	8,42 ^{Ad}
D	<i>S. aureus</i>	< 1* ^{Ag}	< 1* ^{Ag}	< 1* ^{Ae}
E	<i>L. rhamnosus</i> + <i>S. aureus</i>	7,76 ^{Cb}	8,62 ^{Bc}	9,35 ^{Aa}
F	<i>L. plantarum</i> + <i>S. aureus</i>	7,42 ^{Ce}	8,51 ^{Bb}	8,65 ^{Ac}
G	<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>S. aureus</i>	8,10 ^{Ca}	9,04 ^{Aa}	8,82 ^{Bb}

Nota: Médias seguidas por letras maiúsculas na mesma linha, e letras minúsculas na mesma coluna, indicam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott, considerando 5% de significância. *<1 Log UFC/g: Valor estimado, menor valor detectável.

Tabela 4. Médias das contagens de *Staphylococcus aureus* (Log UFC/g), em queijos elaborados com BAL e *S. aureus*, nos tempos 1, 7 e 14 dias e estocagem à 8°C ± 2°C

Tratamentos		Dia 1	Dia 7	Dia 14
A	Controle	4,56 ^{Be}	6,68 ^{Ad}	7,39 ^{Ab}
B	<i>L. rhamnosus</i>	< 1* ^{Af}	< 1* ^{Af}	< 1* ^{Af}
C	<i>L. plantarum</i>	< 1* ^{Af}	< 1* ^{Af}	< 1* ^{Af}
D	<i>S. aureus</i>	8,71 ^{Ba}	7,99 ^{Ba}	8,9 ^{Aa}
E	<i>L. rhamnosus</i> + <i>S. aureus</i>	7,55 ^{Ac}	6,64 ^{Bc}	6,23 ^{Cd}
F	<i>L. plantarum</i> + <i>S. aureus</i>	7,49 ^{Ad}	6,83 ^{Bc}	6,28 ^{Cc}
G	<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>S. aureus</i>	7,67 ^{Ab}	7,01 ^{Bb}	6,21 ^{Ce}

Nota: Médias seguidas por letras maiúsculas na mesma linha, e letras minúsculas na mesma coluna, indicam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott, considerando 5% de significância (3 repetições). *<1 Log UFC/g: Valor estimado, menor valor detectável.

Quanto à contagem de colônias características de *Staphylococcus* no tratamento A, somente o dia 1 diferiu-se ($p < 0,05$) dos demais tempos de armazenamento sob refrigeração. As contagens do patógeno nos queijos, foram inferiores às contagens encontradas nos queijos dos demais tratamentos em que houve a inoculação do mesmo em sua produção ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram observados por Silva (2018), ao avaliar queijos produzidos em laboratório adicionados de *S. aureus* (FRI361), produtores de SEC e TSST-1 (N315) e *Lactobacillus rhamnosus* (D1) isolada

de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra e *Weissella paramesenteroides* (GIR16L4*), isolada de leite cru, verificou também a contagem de BAL e *S. aureus* nos queijos pertencentes ao tratamento controle e nos queijos que estes microrganismos não foram adicionados. O mesmo comportamento foi verificado em estudo realizado por Seridan *et al.* (2012).

A estirpe bacteriana que apresentou crescimento em ágar MRS e Baird Parker no presente estudo, foi isolada e identificada por MALDITOF como *Enterococcus faecium* e *E. faecalis*, que são

espécies predominantes encontradas nos alimentos e principalmente em diversos tipos de queijos, com contagens de até 10^7 UFC/g (GOMES *et al.*, 2008), representando um contaminante externo presente unicamente no queijo controle, em que não houve inoculação de nenhum microrganismo. Perri (2012), corrobora que o processo de salga favorece o crescimento das bactérias do gênero *Enterococcus* de modo seletivo, além do período de armazenamento refrigerado possibilitar o aumento nas contagens para bactérias deste mesmo gênero.

Nas tabelas 3 e 4 mostra-se o efeito da presença das BAL no comportamento de *S. aureus*, ao comparar seu crescimento nos tratamentos E, F e G. Verificou-se uma crescente contagem de BAL entre o 1º e 14º dia de armazenamento nos tratamentos em que estas cepas foram inoculadas, em contrapartida, a contagem de *S. aureus* foi decrescente (Tabela 4). A contagem média dos tratamentos (E, F e G), após o 14º dia de produção, foram de 8,94 Log UFC/g para BAL e para o *S. aureus*, a média observada foi de 6,24 Log UFC/g, corroborando a diminuição da contagem do patógeno em virtude do aumento de bactérias ácido-láticas. A redução na contagem bacteriana destes tratamentos, durante a estocagem dos queijos sob temperatura de refrigeração, foi significativa entre os dias 1, 7 e 14 ($p > 0,05$).

A redução da contagem de *Staphylococcus aureus* associada à uma das culturas láticas pode ser devido à diminuição do pH, na amostra analisada. Esse valor não foi reduzido o suficiente para impedir a produção de enterotoxina C, uma vez que a contagem do patógeno se manteve superior a 10^5 UFC/g, concentração mínima para a produção de metabólitos secundários de caráter tóxico.

Resultados semelhantes foram encontrados por Seridan *et al.* 2012, que avaliaram tratamentos combinando estirpes de *S. aureus* produtor de enterotoxina “B” e *L. rhamnosus* em relação a distintos dias de armazenamento em temperatura de refrigeração. A contagem de *S. aureus* foi decrescente, e a de *L. rhamnosus* crescente. Além disso, as contagens médias após 15 dias de produção foram 10^6 UFC/g para *S. aureus* e 10^7 UFC/g para *L. rhamnosus*. Esse decréscimo do número do microrganismo patogênico sugere a presença de fatores antagonistas ao crescimento de *S. aureus*,

produzidos por *L. rhamnosus* e *L. plantarum* (JAY, 1996).

Quando as cepas bacterianas de *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e *S. aureus* estavam presentes no queijo separadamente (tratamentos 2, 3 e 4, respectivamente) até o 14º dia de análise, verificou-se comportamentos distintos para cada cepa bacteriana. No tratamento 2 (*L. rhamnosus*), ao comparar os dias 1 e 7, a viabilidade não diferiu ($p > 0,05$), distinguindo apenas no 14º dia após a produção, aumentando a contagem bacteriana para 8,86 Log UFC/g. Entretanto, a viabilidade de *L. plantarum* (tratamento 3) manteve-se crescente até o 14º dia de avaliação e diferiu ($p > 0,05$) nos três tempos avaliados (dias 1, 7 e 14). Por fim, a contagem de *S. aureus* no tratamento 4 (Tabela 4), no qual a cepa patogênica foi inoculada, a contagem entre o 1º e o 7º dia, diminuiu sem diferença significativa, porém aumentou estatisticamente ($p > 0,05$) no 14º dia de observação da viabilidade bacteriana.

Ao comparar a viabilidade de BAL (Tabela 3) entre os tratamentos, todos diferiram entre si ($p > 0,05$) nos dias 1 e 7. Com exceção do dia 14, onde os tratamentos 2 e 7 apresentaram semelhança na contagem bacteriana de *Lactobacillus*. A viabilidade de *S. aureus* diferiu-se em todos os tratamentos ($p > 0,05$) ao compará-los entre si, exceto nos tratamentos 2 e 3 que não foram inoculadas o patógeno. Valores de contagem de BAL (*L. rhamnosus*) nos tratamentos 2 e 5, foram mais elevados que a contagem obtida de bactérias láticas (*L. plantarum*) nos tratamentos 3 e 6, esse comportamento pode ser justificado através de adaptação entre amostras em um mesmo ambiente (RESENDE *et al.*, 2011).

Em um recente estudo realizado por Silva (2018), o antagonismo de cepas bacterianas láticas contra a cepa patogênica de *Staphylococcus* não foi satisfatório. Com queijos produzidos em laboratório, adicionados de combinações entre *S. aureus*, produtor de enterotoxina “C” e toxina da síndrome do choque tóxico TSST-1 e *Lactobacillus rhamnosus* e *Weissella paramesenteroides*, verificou-se a viabilidade de *S. aureus* e a sua capacidade produtora de toxinas na presença de BAL. Ao longo dos 14 dias, observou-se que a presença de BAL não alterou o crescimento da bactéria patogênica.

CONCLUSÃO

A presença simultânea de uma BAL no queijo, alterou o comportamento de crescimento de *Staphylococcus aureus* ao final do 14º dia de armazenamento, na presença de *Lactobacillus rhamnosus* e de *Lactobacillus plantarum*. Houve antagonismo entre as cepas testadas e ambas apresentaram potencial para a inibição, através de discreta redução nas contagens de *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina “C” nos queijos. Futuros estudos são necessários para que verifiquem quais os mecanismos de BAL são capazes de atuar na atividade inibitória e viabilidade do patógeno alimentar e quanto a expressão das toxinas estafilocócicas ao longo da estocagem de queijos para elucidar a interação entre esses microrganismos. É importante ressaltar que, estudos com diferentes concentrações iniciais de *S. aureus*, também deverão ser realizados, com o objetivo de observar o crescimento microbiano e de toxinas ao longo do tempo de estocagem de queijos frescos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro e a FUNED pelo apoio e colaboração na presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

ARAGON-ALEGRO, L. C. *et al.* *Listeria monocytogenes* inhibition by lactic acid bacteria and coliforms in Brazilian fresh white cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 847-858, 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00431-4

ARCURI, E. F. *et al.* Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 12, p. 2225-2231, 2010. DOI: 10.4315/0362-028x-73.12.2225

CUNNIFF, P. A. (ed.). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995.

BENNETT, R. W.; HAIT, J. M.; TALLENTT, S. M. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: FINGER, Y.; TORTORELLO,

M. L. (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: Association of Public Health Laboratories, 2015. cap. 39, p. 375-390.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, DF, n. 172, p. 19.697, 08 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 239, p. 8, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2019. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta---o-Surtos-DTA--Fevereiro-2019.pdf> Acesso em: 20 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Aprova a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, DF, n. 16, p. 1070, 23 jan. 1996.

CAMPOS, G. Z. *et al.* Microbiological characteristics of Canastra cheese during manufacturing and ripening. **Food Control**, v.121, 2021. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107598

CARVALHO, S. A. *et al.* TSST-1, enterotoxin and bacteriocin-like substance production by *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1537-1544, 2013. DOI: 10.1590/S0102-09352013000500035

- CAVALCANTE, D. A. *et al.* Microbiological quality of Minas Frescal cheese treated with ozonated water. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 5, p. 2911-2915, 2013.
- 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. DOI: 0.18067/jbfs.v3i1.79
- IDF - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Standard 4A: 1982**. Cheese and processed cheese: Determination of total solids content. Brussels: IDF, 1982. 2 p.
- IDF - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Standard 20B:1993**. Determination of milk proteins. Brussels: IDF, 1993. 6 p.
- FINGER, J. A. F. *et al.* Overview of food-borne disease outbreaks in Brazil from 2000 to 2018. **Foods**, v. 8, n. 10, p. 434, 2019. DOI: 10.3390/foods8100434
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 602 p.
- FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 4, p. 732-742, 2009. DOI: 10.1038/nprot.-2009.37
- GOMES, B. C. *et al.* Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008. DOI: 10.1016/j.fm.2008.03.008
- HAYEK, S. A.; IBRAHIM, S. A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, p. 73-87, 2013. DOI: 10.4236/fns.2013.411A010
- ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in food: characterization of microbial pathogens**. London: Blackie Academic & Professional. 2018.
- JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5. ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 661 p.
- KORNACKI, J. L.; GURTLER, J. B.; STAWICK, B. A. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: SALFINGER, Y; TORTORELLO, M. L. (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. ed. Washington: APHA, 2015. cap. 9.
- MAC FADDIN, J. F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527 p.
- NEAL, C. E.; CALBERT, H. E. The use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 38, n. 6, p. 629-633, 1955. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(55)95015-3
- OLIVEIRA, K. M. L. *et al.* Presença de *Staphylococcus aureus* em queijos artesanais comercializados na cidade de Uruaçu-Goiás, **Revista de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia**, v. 2, n. 8, p. 63-71, 2015.
- PERRI, J. M. **Bactérias do gênero *Enterococcus* em queijo de Coalho: influência do processamento na seleção microbiana, perfil tecnológico e implicações em segurança de alimentos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2010.
- PINEDA, A. P. A. *et al.* Brazilian artisanal cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.666922
- RESENDE, M. F. S. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido-láticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011. DOI: 10.1590/S0102-09352011000600039

SCHELIN, J. *et al.* The formation de *S. aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 580-592, 2011. DOI: 10.4161/viru.2.6.18122

SERIDAN, B. *et al.* Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 465-470, 2012. DOI: 10.1590/S0102-09352012000200029

SILVA, G. O. **Viabilidade de *Staphylococcus aureus* (FRI361 e N315) e modulação da expressão de suas toxinas (SEC e TSST-1) em queijo tipo Frescal adicionado de *Lactobacillus rhamnosus* (D1) e *Weissella paramesenteroides***

(GIR1604*). 2018. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina Veterinária, Belo Horizonte, 2018.

SILVA, G. O. **Estudo genotípico e fenotípico de estafilococos coagulase positiva potencialmente enterotoxigênicos isolados de linhas de produção de queijo Minas frescal no estado de São Paulo**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2013.

SOUZA, V. *et al.* Estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo Minas artesanal de Araxá. **Ars Veterinária**, v. 31, n. 1, p. 19-23, 2015. DOI: 10.15361/2175-0106.2015v31n1p19-23