

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Interações populacionais mediadas por *quorum sensing* na
microbiota do soro-fermento utilizado na produção do queijo
Canastra

Augusto Tiberio Figueira

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

São Paulo
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Área de Bromatologia

Interações populacionais mediadas por *quorum sensing* na
microbiota do soro-fermento utilizado na produção do queijo
Canastra

Augusto Tiberio Figueira

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F475i Figueira, Augusto Tiberio
Interações populacionais mediadas por quorum sensing na microbiota do soro-fermento utilizado na produção do queijo Canastra / Augusto Tiberio Figueira. - São Paulo, 2022.
76 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.
Orientador: Pinto, Uelinton Manoel

1. quorum sensing. 2. quorum quenching. 3. biossensores. 4. queijo canastra. I. T. II. Pinto, Uelinton Manoel, orientador.

Augusto Tiberio Figueira

Interações populacionais mediadas por *quorum sensing* na
microbiota do soro-fermento utilizado na produção do queijo
canastra

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
Orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela dádiva da vida, a presença da família e amigos, e pela chance de buscar meus objetivos.

Ao professor Uelinton Manoel Pinto, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos que levarei para sempre e pelo exemplo de cientista que almejo um dia ser.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por fornecer toda a estrutura para que tantas pessoas como eu possam materializar seus sonhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa, pela contribuição financeira por meio de auxílio – Processo 168376/2018-0.

Aos meus professores, que me permitiram aprender tanto em tão pouco tempo, sobre assuntos que antes nem imaginava conhecer.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Marcela, Catarina, Emília, Diogo, Jéssica, Gabi, Ana, Ximena e Mariana, que não apenas me ensinaram muito, mas tornaram meus dias muito mais agradáveis.

À Katia Leani e à dona Lúcia, por tantas risadas logo cedo, conversas, ensinamentos e brincadeiras.

À professora Cynthia Jurkiewicz Kunigk, por me apresentar a microbiologia e me fascinar por esta área tão incrível, além de toda a amizade, aconselhamento e paciência por todos esses anos.

À Karina Ghougassian Barrionuevo, por toda a ajuda dentro e fora do laboratório, pela cumplicidade, por tantos momentos inesquecíveis e por me ajudar a encontrar o que me faz bem.

Aos meus pais, Maria Lucia e Leonel, e a meu irmão Erico, por uma vida inteira cercada de amor e afeto.

Resumo

FIGUEIRA, Augusto Tiberio. **Interações populacionais mediadas por quorum sensing na microbiota do soro-fermento utilizado na produção do queijo canastra**: subtítulo do trabalho. 2022. 76p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, SP, 2022.

Bactérias regulam a expressão de diversos fenótipos de acordo com a sua densidade populacional, em um comportamento conhecido como *quorum sensing*. Em micro-organismos de origem alimentar, o *quorum sensing* pode influenciar na formação de biofilmes, produção de toxinas e de enzimas hidrolíticas. Em bactérias Gram-negativas a sinalização é normalmente mediada por moléculas de N-acil-homoserina lactona (AHLs), conhecidas por autoindutor 1 (AI-1). Estudos revelam a inibição do *quorum sensing* nestas bactérias por enzimas que degradam as AHLs, em um processo denominado *quorum quenching*. Tipicamente brasileiro, o queijo Canastra é um produto artesanal maturado, produzido a partir de leite cru e do “pingo”, um tipo de soro-fermento coletado e utilizado diariamente na produção. A composição microbiana do pingo é diversificada e característica da região produtora. Essa combinação de bactérias, única em cada queijaria, resulta em aroma e textura típicos. Enquanto a microbiota Gram-positiva contribui para o desenvolvimento de sabor, textura e aroma no produto, bactérias Gram-negativas nesses queijos são geralmente associadas à formação de olhaduras, aromas desagradáveis, má coagulação da massa e até à patogenicidade. Este trabalho visou analisar a interação entre a microbiota Gram-positiva e Gram-negativa presente no pingo pela detecção dos sistemas de *quorum sensing* e *quorum quenching* nas amostras. A presença de AHLs foi avaliada em 45 amostras de pingo, a partir da extração em acetato de etila acidificado e da avaliação dos extratos por meio de bioensaios com *Agrobacterium tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372) e KYC55(pJZ410)(pJZ372)(pJZ384), resultando em apenas uma amostra positiva. Em seguida, 350 isolados foram obtidos a partir de 11 amostras de pingo, sendo 200 isolados classificados como Gram-positivos e 150 Gram-negativos. Os Gram-negativos foram avaliados quanto à produção de AHLs *in vitro* através de ensaio em placa utilizando as estirpes biossensoras *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), *Chromobacterium violaceum* CV026 e *Escherichia coli* pSB403, resultando em 39 isolados produtores de AHLs, provenientes de 10 pingos diferentes. Já os isolados Gram-positivos foram analisados quanto à capacidade de inibição do QS utilizando as estirpes biossensoras *C. violaceum* CV026 e *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), em meio suplementado com C6-HSL ou 3-oxo-C12-HSL. Foi detectada a inibição total da resposta ao quórum por 78 isolados testados, enquanto a inibição parcial foi provocada por outros 63. A inibição do crescimento das estirpes biossensoras também foi observada para 24 isolados. Os isolados promotores de inibição parcial foram recultivados em meio mínimo com C6-HSL ou 3-oxo-C12-HSL como únicas fontes de carbono. Foram recuperados 28 isolados, e a ação desses sobre diferentes substratos foi avaliada, resultando em 22 isolados produtores de lactonases e 6 produtores de acilase. Os 39 isolados Gram-negativos e os 28 isolados Gram-positivos finais foram identificados por MALDI-TOF MS, resultando, segundo o conhecimento do autor, no primeiro relato de produção de AHLs por *Pseudomonas fulva*, *Enterobacter xiangfangensis* e *Lelliottia amnigena*,

bem como a produção de lactonases por *Staphylococcus xylosus* e a produção de acilase por *S. aureus*, *Microbacterium maritypicum* e *Rothia kristinae*. Este trabalho mostrou que interações populacionais mediadas por *quorum sensing* dependente de AHLs na microbiota do soro-fermento são possíveis. Porém, essas interações estão propensas a serem inibidas por meio de lactonases e acilases produzidas por parte das bactérias Gram-positivas.

Palavras-chave: *quorum sensing*; *quorum quenching*; biossensores; queijo canastra.

Abstract

FIGUEIRA, Augusto Tiberio. **Population interactions mediated by *quorum sensing* in the microbiota of the endogenous culture used in the production of canasta cheese**. 2022. 76 p. Dissertation (Master Degree) – Graduate Program in Food Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, SP, 2022.

Bacteria regulate the expression of different phenotypes according to their population density, in a behavior known as *quorum sensing*. In food-borne microorganisms, *quorum sensing* can influence the formation of biofilms, production of toxins and hydrolytic enzymes. In Gram-negative bacteria, signaling is normally mediated by N-acyl homoserine lactone molecules (AHLs), known as autoinducer 1 (AI-1). Studies reveal the inhibition of *quorum sensing* in these bacteria by enzymes that degrade AHLs, in a process called *quorum quenching*. Typically Brazilian, Canastra cheese is a matured artisanal product, produced from raw milk and “pingo”, a type of endogenous culture collected and used daily in production. The microbial composition of “pingo” is diverse and characteristic of the producing region. This combination of bacteria, unique in each cheese factory, results in a typical aroma and texture. While the Gram-positive microbiota contributes to the development of flavor, texture and aroma in the product, Gram-negative bacteria in these cheeses are generally associated with the formation of eyes, off-flavors, poor curd coagulation and even pathogenicity. Thus, this work aimed to analyze the interaction between the Gram-positive and Gram-negative microbiota present in this culture by detecting *quorum sensing* and *quorum quenching* systems in the samples. The presence of AHLs was evaluated in 45 samples of “pingo”, with extraction with acidified ethyl acetate and the evaluation of the extracts through bioassays with *Agrobacterium tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372) and KYC55(pJZ410)(pJZ372)(pJZ384), resulting in only one positive sample. Then, 350 isolates were obtained from 11 endogenous culture samples, with 200 being classified as Gram-positive and 150 Gram-negative. Gram-negatives were evaluated for the production of AHLs *in vitro* by plaque assay using the biosensor strains *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Escherichia coli* pSB403, resulting in 39 AHL-producing isolates from 10 different samples. Gram-positive isolates were analyzed for their ability to inhibit quorum sensing using biosensor strains *C. violaceum* CV026 and *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), in medium supplemented with N-hexanoyl-L-homoserine lactone or 3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone. Total inhibition of the quorum response was detected by 78 tested isolates, while partial inhibition was caused by 63. Growth inhibition of biosensor strains was also observed for 24 isolates. Partial inhibition promoter isolates were recultured on minimal medium with C6-HSL or 3-oxo-C12-HSL as sole carbon sources. Twenty-eight isolates were recovered, and the action of these isolates on different substrates was evaluated, resulting in 22 lactonase producers and 6 acylase producers. The 39 Gram-negative isolates and the final 28 Gram-positive isolates were identified by MALDI-TOF MS, resulting, to the best of the author's knowledge, in the first report of AHL production by *Pseudomonas fulva*, *Enterobacter xiangfangensis* and *Lelliottia amnigena*, as well as the lactonase production by *Staphylococcus xylosus* and acylase production by *S. aureus*, *Microbacterium maritopicum* and *Rothia kristinae*. This work demonstrated that

population interactions mediated by AHLs-dependent *quorum sensing* in Canastra cheese endogenous culture microbiota are possible. However, these interactions are prone to inhibition by lactonases and acylases produced by Gram-positive bacteria.

Keywords: *quorum sensing*; *quorum quenching*; biosensors; canastra cheese.

Lista de figuras

Figura 1(a – c) – Estirpes biossensoras utilizadas neste projeto.	19
Figura 2 – Representação esquemática de triagem de isolados Gram-positivos inibidores de <i>quorum sensing</i>	28
Figura 3 - Número de isolados produtores e não produtores de AHLs.	33
Figura 4 - Estratificação dos isolados Gram-positivos quanto à capacidade de inibir o <i>quorum sensing</i> em bactérias biossensoras.....	40
Figura 5 - Resultados dos ensaios com estirpes biossensoras.....	42
Figura 6 - Distribuição das diferentes formas de inibição do <i>quorum sensing</i> nas estirpes biossensoras.	43

Lista de tabelas

Tabela 1 – Distribuição dos isolados produtores de AHL nas amostras de soro-fermento provenientes de 11 propriedades.....	33
Tabela 2– Identificação dos isolados Gram-negativos produtores de AHL e suas respectivas capacidades de indução do quorum sensing nas estirpes biossensoras utilizadas.....	34
Tabela 3– Distribuição dos isolados sem ação inibitória do <i>quorum sensing</i> nas amostras de soro-fermento	45
Tabela 4–Identificação dos isolados Gram-positivos produtores de enzimas inibidoras do <i>quorum sensing</i> e suas respectivas capacidades de inibição de AHLs selecionadas, bem como a possibilidade de relactonização dessas após a ação enzimática..	47

Lista de abreviaturas e siglas

AHL	N-acil-homoserina lactona
C4-HSL	N-butiril-L-homoserina lactona
C6-HSL	N-hexanoil-L-Homoserina lactona
3-oxo-C6-HSL	N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona
C7-HSL	N-heptanoil-L-homoserina lactona
C8-HSL	N-octanoil-L-homoserina lactona
3-oxo-C8-HSL	N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona
3-oxo-C10-HSL	3-oxo-decanoil-L-homoserina lactona
3-oxo-C12-HSL	3-oxo-Dodecanoil-L-Homoserina lactona

Sumário

1	Introdução	13
1.1	<i>Quorum sensing e quorum quenching</i>	13
1.1.1	Estirpes biossensoras	17
1.2	<i>Leite e Queijo Canastra</i>	20
2	Objetivos	23
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	23
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	23
3	Material e Métodos	24
3.1	<i>Material</i>	24
3.1.1	Soro-Fermento	24
3.2	<i>Métodos</i>	24
3.2.1	Obtenção de isolados provenientes do soro fermento	24
3.2.2	Armazenagem e cultivo de amostras e estirpes biossensoras	24
3.2.3	Extração de AHLs das amostras de soro-fermento	25
3.2.4	Verificação da produção de AHLs pelos isolados Gram-negativos do soro-fermento.	25
3.2.5	Verificação da presença de AHLs nas amostras de soro-fermento	26
3.2.6	Triagem de isolados Gram-positivos inibidores de <i>quorum sensing</i>	26
3.2.7	Verificação da capacidade de degradação de AHLs por isolados selecionados	29
3.2.8	Validação da capacidade de degradação de AHLs dos isolados obtidos e verificação da natureza da inibição por re-lactonização.....	29
3.2.9	Identificação de Isolados por MALDI-TOF.....	30
4	Resultados e Discussão	32
4.1	<i>Identificação de atividade relacionada à presença de AHLs nas amostras de soro-fermento</i>	32
4.2	<i>Identificação de atividade relacionada à presença de AHLs nos isolados Gram-negativos</i>	32
4.3	<i>Identificação de Isolados Gram-negativos por MALDI-TOF MS</i>	34
4.4	<i>Triagem de isolados Gram-positivos quanto à inibição do quorum sensing</i> ..	40

4.5 *Confirmação da degradação de moléculas sinalizadoras do quorum sensing por via enzimática nos isolados Gram-positivos e sua identificação por MALDI-TOF MS* 45

5 Conclusão56

Referências57

1 Introdução

1.1 *Quorum sensing* e *quorum quenching*

Diversos comportamentos bacterianos como formação de biofilme, bioluminescência e secreção de fatores de virulência são realizados eficientemente quando existe uma população suficientemente grande de bactérias. Essa unidade comportamental mínima é designada como um *quorum* de bactérias, e a capacidade de detectar e responder a essa densidade populacional é denominada *quorum sensing* (FUQUA, WINANS e GREENBERG, 1994; MILLER e BASSLER, 2001; YANG et al., 2022).

Com o aumento da resistência a antibióticos em micro-organismos patogênicos tanto a saúde humana quanto a animal, a interferência no *quorum sensing* para o controle da expressão de fatores de virulência surgiu como uma estratégia alternativa. Dessa forma, processos que visam à inibição da comunicação por *quorum sensing* são denominados *quorum quenching* (CHEN et al., 2013). Diferentemente da terapia antibiótica tradicional, onde as bactérias são inativadas ou possuem seu crescimento inibido, a terapia por *quorum quenching* visa suprimir os fatores de virulência através de interferência na síntese de moléculas sinalizadoras, na degradação das mesmas, ou no bloqueio dos receptores dessas moléculas (GESKE, O'NEILL e BLACKWELL, 2008; GALLOWAY et al., 2011; DELSHAD et al., 2018; WANG et al., 2022).

O *quorum sensing* é possível a partir da produção, liberação e detecção de moléculas de sinalização extracelular, denominadas autoindutores, que se acumulam no meio à medida que a densidade populacional bacteriana aumenta. As bactérias são sensíveis às mudanças na concentração de autoindutores, permitindo que identifiquem variações em sua densidade populacional e acionem coletivamente padrões de expressão gênica específicos (PAPENFORT e BASSLER, 2016; ZHANG et al., 2022).

Certos peptídeos servem como moléculas sinalizadoras em muitas bactérias Gram-positivas, enquanto nas Gram-negativas, os sinais mais comuns são as N-acil-homoserina lactonas, conhecidas como AHLs ou autoindutor-1 (AI-1) (FUQUA, WINANS e GREENBERG, 1996; KLEEREBEZEM et al., 1997).

As AHLs são compostos sintetizados a partir dos substratos S-adenosilmetionina (SAM) e grupos acil carregados por proteínas denominadas *acyl carrier proteins* (ACP) (MORÉ et al., 1996). As AHLs são formadas por um anel lactona invariante (anel homoserina lactona - HSL) ligado a uma cadeia acil que pode variar em comprimento de 4 a 18 átomos de carbono. Além disso, as AHLs também podem diferir no estado de saturação dessa cadeia e em seu estado de oxidação (PARSEK et al., 1999).

As proteínas receptoras de AHL demonstram certo grau de especificidade quanto à saturação, oxidação ou comprimento das cadeias acil das AHLs correspondentes. Conseqüentemente, a comunicação bacteriana em várias espécies depende de uma enzima sintase e um proteína receptora (ou ativador transcricional) correspondente, que responde a uma molécula de AHL específica (LASARRE e FEDERLE, 2013; LIMA et al., 2020).

Os sistemas de detecção baseados nas moléculas de AHL geralmente são homólogos dos genes *luxI/luxR*. Para ativação desses sistemas, são necessários: uma molécula sinalizadora (AHL) difusível sintetizada por uma enzima (homóloga de LuxI); um receptor de AHL (homólogo de LuxR), cuja ligação ao DNA é alterada em resposta à ligação à molécula de AHL e; uma sequência de DNA tipicamente referida como *box lux*, localizada na região promotora dos genes alvo. Assim, o sistema permite que o homólogo de LuxR atue como um regulador transcricional e um conjunto de genes alvo que resulta num fenótipo particular (GRAM et al., 2002; AYUBA, UMENO e KAWAI-NOMA, 2022).

As moléculas de AHLs são difusíveis pela membrana celular e a proteína reguladora LuxR requer uma concentração mínima de AHLs para ser ativada. Assim, embora as AHLs estejam presentes em baixos níveis em culturas diluídas, a ligação à proteína receptora e a ativação transcricional dos genes-alvo só ocorrem em altas densidades celulares (DICKEY et al., 2017; LI et al., 2022a).

Em alimentos, muitas enzimas extracelulares microbianas como celulases, lipases, quitinases, nucleases e proteases, já foram relatadas como sendo reguladas por *quorum sensing*, sugerindo que um dos meios potenciais de prevenir ou retardar a deterioração pode se dar pelo controle da comunicação celular (SKANDAMIS e NYCHAS, 2012).

De acordo com Pinto et al. (2007), a produção de AHL é comum entre bactérias psicrotróficas isoladas do leite cru refrigerado, o que indica que a

comunicação por *quorum sensing* pode desempenhar um papel importante na deterioração deste produto.

AHLs presentes em sistemas alimentares como leite, carne e vegetais, são majoritariamente provenientes de micro-organismos deterioradores ou patogênicos, geralmente pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. e aos membros da família Enterobacteriaceae (GRAM et al., 2002; LU, HUME e PILLAI, 2004; MARTINS et al. 2018; KIM et al., 2022).

Nesses sistemas, diversos fatores influenciam a concentração de autoindutores, como a distribuição espacial das bactérias no meio, geralmente de forma não homogênea, a difusão e a degradação dos indutores por compostos presentes e mesmo a produção de outros autoindutores por bactérias diferentes, afetando a resposta bacteriana (AMMOR, MICHAELIDIS e NYCHAS, 2008).

Dessa forma, o uso de compostos inibidores do *quorum sensing* poderia ser empregado para gerar diferentes efeitos e confundir as bactérias, promovendo a interrupção de sua atividade metabólica, numa abordagem conhecida como *quorum quenching* (SKANDAMIS e NYCHAS, 2012).

O principal meio de ação do *quorum quenching* é o enzimático. Na inativação das AHLs são conhecidas as enzimas lactonases, acilases e oxidoredutases.

As lactonases são metaloproteínas que hidrolisam a ligação éster do anel de lactona das AHLs, produzindo uma molécula de acil-homoserina (DONG et al., 2000; DONG et al., 2001). Elas normalmente são pouco seletivas em relação à inativação de AHLs devido ao fato de que o anel de lactona alvo é majoritariamente idêntico entre os mais diversos tipos de AHLs (LIU et al., 2008; SIKDAR e ELIAS, 2020).

As acilases, por sua vez, hidrolisam a ligação acil-amida entre a cadeia de acil e o anel de lactona, resultando na libertação de uma cadeia de ácido graxo e do anel de lactona (LEADBETTER e GREENBERG, 2000; LIN et al., 2003). Ao contrário das lactonases, as acilases podem apresentar especificidade de substrato com base no comprimento da cadeia acil (BOKHOVE et al., 2010; SIKDAR e ELIAS, 2020).

Já as oxidoredutases oxidam ou reduzem a cadeia lateral acil, inativando a molécula de AHL sem que haja degradação da mesma. São as menos abundantes dentre as três (UROZ et al., 2005).

Além da adição de moléculas isoladas, diversos estudos comprovam a eficácia da inibição de *quorum sensing* através de bactérias produtoras de enzimas inibidoras. Dong et al. (2001) isolaram e caracterizaram uma lactonase, extraída de

uma cultura de *Bacillus*, que inativou moléculas de AHL produzidas por bactérias Gram-negativas, enquanto Delshad et al. (2018) reportaram degradação de AHLs por diferentes estirpes de *Bacillus*, *Pseudomonas* e bactérias entéricas. Baseado na capacidade de uma estirpe inibir a produção de violaceína em *Chromobacterium violaceum*, Park et al. (2005) relataram a identificação e isolamento de uma nova variante de *Streptomyces*.

Extratos bacterianos Gram-positivos preparados por Dong et al. (2002) demonstraram grande atividade inibidora de AHLs. As bactérias identificadas como inibidoras foram *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycooides*, enquanto *B. fusiformis* e *B. sphaericus*, não exibiram atividade de inativação detectável.

Utilizadas usualmente como uma ferramenta eficaz para o controle da dinâmica da microbiota intestinal, bactérias lácticas e probióticas também se mostram capazes de provocar *quorum quenching* (NHAN et al., 2010; YUN; GRIFFITHS, 2014; SONG et al., 2015; PALUCH et al., 2020).

Boopathi, Selvakumar e Sivakumar (2017) demonstraram que uma cepa de *Enterococcus sp.* isolada de leite bovino não pasteurizado, além de possuir teor probiótico, possuía a capacidade de inibir sistemas de *quorum sensing*, sem apresentar ação antimicrobiana. A inibição, a princípio, seria pela inativação das moléculas sinalizadoras ou pela competição com as proteínas receptoras.

Um estudo realizado por Kim et al. (2018) mostrou que a bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* 30SC reduziu especificamente as populações de coliformes, enquanto estimulou a comunidade probiótica, incluindo os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, em leitões desmamados. Sua utilização não alterou de forma significativa o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 43894, mas propiciou forte inibição do *quorum sensing* mediado por AI-2 e conseqüentemente a formação de biofilme pela estirpe. Isso demonstra sua capacidade de utilização como propiciadora de *quorum quenching*, inibindo virulência e formação de biofilme, sem que haja ação antimicrobiana.

Valdéz et al. (2005) estudaram a ação de *Lactobacillus plantarum* sobre o sistema de *quorum sensing* de *P. aeruginosa*, em especial a formação de biofilme e a produção de elastase. Ambos os fenótipos foram inibidos diretamente pela cultura e por filtrados, mas não demonstraram alteração mediante exposição a células lavadas, indicando a secreção de moléculas inibidoras por parte da *L. plantarum*.

1.1.1 Estirpes biossensoras

Com a evolução da compreensão a respeito dos mecanismos relacionados ao *quorum sensing*, novas estratégias para a identificação da comunicação bacteriana foram desenvolvidas. Dentre elas, a criação de bactérias geneticamente alteradas a fim de facilitar a observação da expressão fenotípica por *quorum sensing* se destacou como uma das mais importantes. Estirpes bacterianas previamente conhecidas que possuem seu sistema de *quorum sensing* elucidado foram utilizadas para a geração de mutantes capazes de responderem apenas em situações específicas, ajudando assim a compreender as interações populacionais de bactérias menos estudadas (RAI, RAI e VENKATESH, 2015). As estirpes biossensoras utilizadas neste trabalho são descritas a seguir e ilustradas na Figura 1.

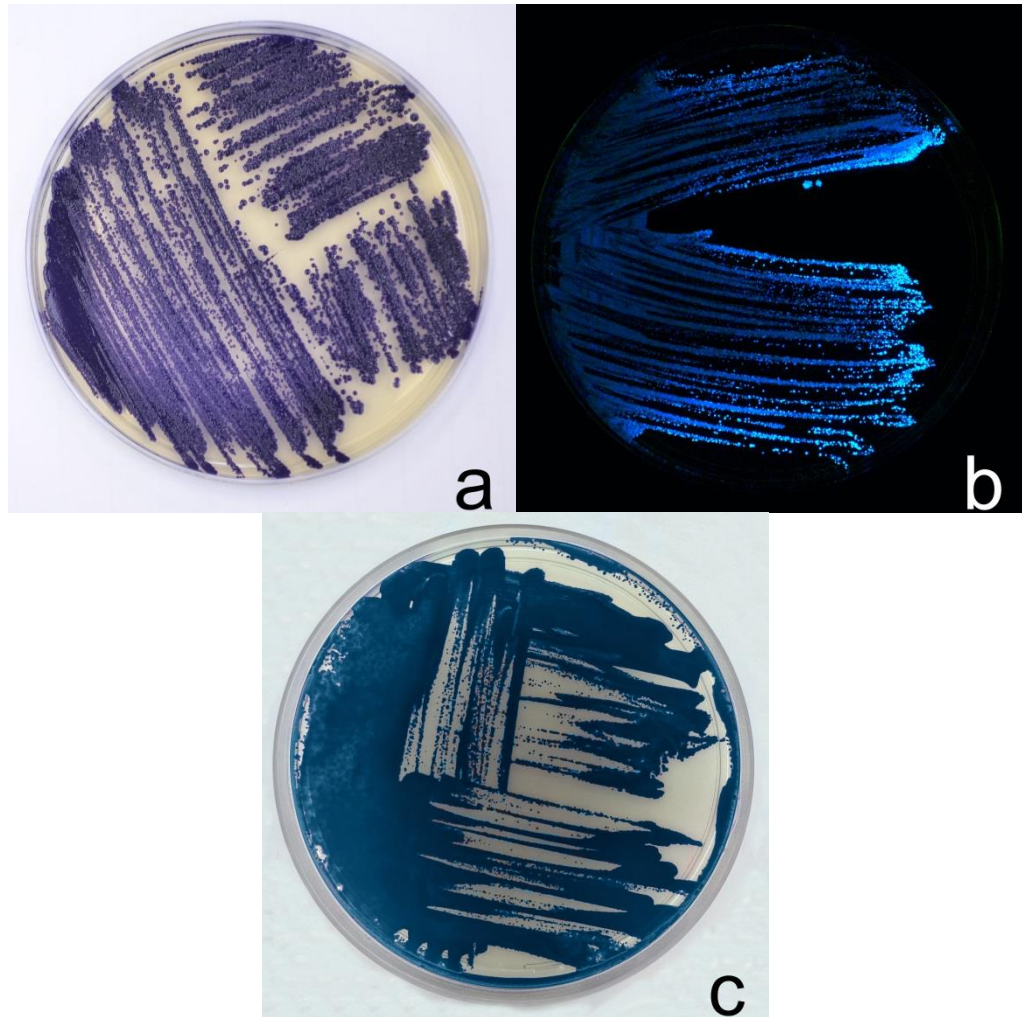
Uma das primeiras estirpes biossensoras criadas, a *Chromobacterium violaceum* CV026, se mantém até hoje como uma das mais importantes. Produzida a partir de uma inserção dupla de transposons, o gene da variante selvagem responsável pela produção de uma homoserina lactona com cadeia de 6 carbonos foi interrompido. Dessa forma, a produção de violaceína na estirpe é inibida, sendo ativada apenas a partir do fornecimento de moléculas de homoserina lactona de cadeia de 4 a 8 carbonos de forma exógena (MCCLEAN et al, 1997).

Baseada no primeiro sistema de *quorum sensing* descoberto, a estirpe de *Escherichia coli* pSB403 é resultado da inserção de um plasmídeo contendo o sistema de genes *lux* derivados da bactéria marinha *Alivibrio fischeri* (anteriormente *Vibrio fischeri*), com exceção do gene *luxI*. Assim, respondendo a AHLs exógenas de seis a oito carbonos, com ou sem substituição oxo, a estirpe produz bioluminescência observável em sala escura ou com auxílio de luminômetro (WINSON et al., 1998).

Capaz de detectar uma alta gama de AHLs, com ou sem substituição oxo, a estirpe *Agrobacterium tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372) é proveniente de uma cepa selvagem com a deleção do gene *tral*, impedindo a produção de AHLs por essa estirpe. O plasmídeo pCF218 expressa TraR, homólogo de LuxR, portanto o controlador do fenótipo a ser expresso, e o plasmídeo pCF372 contém uma fusão de *P_{tral}-lacZ*, permitindo a expressão de β -galactosidase ativada por *quorum sensing* pela estirpe (FUQUA e WINANS, 1996; ZHU et al., 1998).

Com uma gama de detecção comparável à *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), mas com sensibilidade maior, a estirpe biossensora *A. tumefaciens* KYC55(pJZ410)(pJZ372)(pJZ384) foi construída de forma semelhante à anterior. Porém, o novo promotor do gene *traR*, *PtetR*, permite uma expressão muito maior de TraR, aumentando em até 100 vezes a sensibilidade da estirpe e expandindo ainda mais o leque de AHLs identificáveis. Por outro lado, certos compostos podem levar a falsos positivos, não sendo indicada para uso exclusivo (ZHU et al., 2003)

Figura 1(a – c) – Estirpes biossensoras utilizadas neste projeto.



Fonte: o autor (2022)

(a) *Chromobacterium violaceum* CV026 sob efeito de C6-HSL exógeno. (b) *Escherichia coli* pSB403 sob efeito de 3-oxo-C6-HSL exógeno observado em sala escura. (c) *Agrobacterium tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372) sob efeito de C12-HSL exógeno em meio adicionado de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal). A estirpe biossensora KYC55(pJZ410)(pJZ372)(pJZ384) apresenta o mesmo fenótipo.

1.2 Leite e Queijo Canastra

O leite, devido ao seu alto valor nutricional, pode sustentar uma rica microbiota, sendo documentada a ocorrência de mais de 400 espécies de bactérias, distribuídas em mais de 100 gêneros distintos (MONTEL et al., 2014). Por serem extremamente variadas, desempenham diversos papéis como facilitadores de fermentação, a exemplo das bactérias lácticas, micro-organismos deterioradores e até mesmo os patogênicos (HAUG, HOSTMARK e HARSTAD, 2007; MANTHANI, KEERTHI, e RAO, 2022). O grupo das bactérias lácticas é majoritariamente considerado benéfico, uma vez que propicia, além do desenvolvimento de aromas e sabores agradáveis aos alimentos nos quais atuam, como embutidos, queijos e conservas vegetais, um aumento significativo na segurança do mesmo (NASROLLAHZADEH et al., 2022).

Os gêneros mais comuns de bactérias lácticas presentes no leite são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, enquanto populações de micro-organismos psicrotóxicos, que normalmente se estabelecem durante a refrigeração do leite, também são um componente relevante, tendo como principais representantes *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Acinetobacter* spp. (QUIGLEY et al., 2011; KIELISZEK et al., 2021).

Em leite cru, a microbiota tende a ser muito diversa, uma vez que, por conta de seu alto valor nutricional, ele se torna um excelente meio para o estabelecimento de praticamente qualquer micro-organismo que venha a entrar em contato com ele (MLADENOVIC et al., 2021). Dessa forma, produtos obtidos a partir dessa matéria prima *in natura* necessitam de rigoroso controle, uma vez que a proliferação de patógenos pode ocorrer livremente (BROOKS et al., 2012).

A microbiota do leite também é fundamental no desenvolvimento de produtos lácteos. São os principais responsáveis pela alteração do leite para a elaboração dos mais diversos produtos, aumentando consideravelmente a variedade de impactos nas propriedades sensoriais, como textura, sabor e aroma. Além disso, parte dos micro-organismos sobrevive às etapas de produção, podendo estar presentes no produto final (WOUTERS et al., 2002; QUIGLEY et al., 2013).

Dentre os diversos tipos de produtos lácteos existentes, o queijo se destaca como o mais difundido de todos. Em queijos elaborados a partir de leite cru, a microbiota do produto final tende a se assemelhar à microbiota do leite utilizado

durante os primeiros dias após a produção, mas sofrendo mudanças drásticas ao longo do processo de maturação que tais queijos muitas vezes necessitam. Porém, dentre a microbiota láctea desejada, diversos micro-organismos patogênicos podem estar presentes, sendo os principais *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Brucella melitensis*, *Campylobacter* spp., *Coxiella burnetii* e *Mycobacterium bovis* (VERNOZY-ROZAND et al., 2005; OZTURKOGLU-BUDAK e DE VRIES, 2017; HAMMAD et al., 2021; LOBACZ e ZULEWSKA, 2021).

Queijos produzidos a partir de leite cru eram historicamente unânimes até meados do século XX, onde foram sendo modificados ou substituídos por queijos produzidos a partir de leite pasteurizado, devido à sua maior segurança, previsibilidade, reprodutibilidade e vida de prateleira. Porém, até os dias de hoje, as técnicas tradicionais de produção queijeira ainda são aplicadas de forma global, resultando em produtos muitas vezes até superiores quanto à sua aceitação sensorial (HOLSINGER, RAJKOWSKI e STABEL, 1997; WEISBECKER, 2007; LUCEY, 2015). Por esses fatores, o estudo da microbiota desses alimentos é de grande interesse, levando não apenas a uma melhor caracterização dos produtos, mas desenvolvimentos substanciais tanto na detecção e controle da microbiota indesejada como na produção de novas tecnologias. Estas visam desde a criação de fermentos lácteos que preservam a microbiota láctica original do produto até o pré-tratamento do leite cru com tecnologias que eliminem a microbiota contaminante sem o uso de aquecimento, mantendo assim as características organolépticas do leite cru estáveis (GAGLIO, TODARO e SETTANNI, 2021; PINHEIRO et al., 2021; RASHTCHI et al., 2021; INÁCIO et al., 2022).

Tipicamente brasileiro, o queijo Minas artesanal da Serra da Canastra é um queijo artesanal maturado, semi-duro e de baixa tiragem, produzido a partir de leite cru, elaborado exclusivamente na região da Serra da Canastra, estado de Minas Gerais (DORES, NOBREGA, FERREIRA, 2013; NOGUEIRA et al., 2021). Devido à sua produção essencialmente artesanal, baseada quase que integralmente em técnicas tradicionais, estes queijos possuem grande variação tanto sensorial quanto de composição, podendo estas ser originárias da alimentação do gado, da incidência de chuva no ano, dos instrumentos utilizados e do tempo total de maturação, dentre diversos outros fatores. Sua elaboração requer a utilização de um soro-fermento, conhecido popularmente como “pingo”, originário da dessora da massa de queijo da

produção anterior (RESENDE et al., 2011; FERRAR et al., 2021; FILHO et al., 2021; PINEDA et al., 2021).

Devido a utilização do leite cru, a composição microbiana do pingo se assemelha muito à do leite, contendo majoritariamente bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus* (LEITE et al., 1995; NÓBREGA, 2007; LIMA et al., 2009). Essa combinação de bactérias, única em cada queijaria, resulta em aroma e textura únicos do produto. No entanto, bactérias que apresentam risco à saúde humana também foram identificadas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, conhecidas por possuírem diversos fatores de virulência e a capacidade de formação biofilme (LIMA et al., 2009; BERARDI et al., 2015; CAMPOS et al. 2021). Estudos recentes indicam também a presença de micro-organismos contaminantes, como coliformes de origem fecal, em níveis acima dos permitidos por legislação em boa parte dos produtos finalizados ainda dentro das queijarias, embora uma diminuição significativa na contagem tenha sido observada durante o período de maturação (CAMPOS et al, 2021; PINEDA et al. 2021).

Devido à grande variedade de bactérias presentes no soro-fermento utilizado na fabricação do queijo Canastra e por estas poderem apresentar sistemas de *quorum sensing* e/ou *quorum quenching*, torna-se interessante o estudo da interação entre esta microbiota. Dessa forma, este estudo visa identificar as possíveis relações de competição entre a microbiota Gram-positiva e Gram-negativa, por meio da identificação dos mecanismos de comunicação e de interferência, além do levantamento de hipóteses relativas à qualidade e segurança do queijo, uma vez que o pingo tem influência direta na produção deste alimento.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Detectar a comunicação por *quorum sensing* e a sua interferência na microbiota do soro-fermento do queijo Canastra.

2.2 Objetivos Específicos

- Detectar moléculas sinalizadoras (AHLs) no soro-fermento por ensaios fenotípicos em estirpes biossensoras, a fim de indicar a comunicação por *quorum sensing* em bactérias Gram-negativas *in situ*;
- Verificar nos isolados Gram-positivos do soro-fermento a capacidade de inibir o *quorum sensing* dependente de AHLs, bem como identificar o mecanismo de inibição;
- Verificar nos isolados Gram-negativos a capacidade de produzir AHLs *in vitro*;
- Identificar taxonomicamente bactérias de interesse que produzam enzimas promotoras de *quorum quenching*.

3 Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Soro-Fermento

Foram analisadas 45 amostras de soro-fermento, obtidas de diferentes produtores localizados na Serra da Canastra-MG, mantidas congeladas a -20 °C até o momento de uso.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de isolados provenientes do soro fermento

Culturas bacterianas obtidas através de uma pré-seleção em amostras de soro-fermento de 11 produtores foram utilizadas para a obtenção dos isolados, em conjunto com a equipe de pesquisadores do Food Research Center da FCF/USP que conduz o projeto “Caracterização funcional genômica dos micro-organismos predominantes no fermento endógeno “pingo” do queijo da Serra da Canastra”. Para tal, foi utilizado o meio Tryptone Soy Agar (TSA) (Difco, Estados Unidos), e as bactérias foram classificadas com a utilização do método de coloração de Gram. Foram selecionados 200 isolados correspondentes a bactérias Gram-positivas e 150 Gram-negativas para a continuidade deste estudo.

3.2.2 Armazenagem e cultivo de amostras e estirpes biossensoras

Os micro-organismos isolados do soro-fermento foram cultivados em meio caldo Luria-Bertani (LB) (Difco, Estados Unidos). *Chromobacterium violaceum* CV026 e *Escherichia coli* pSB403 foram cultivadas em meio LB, com a adição dos antibióticos Canamicina (20 µg/ml) e Tetraciclina (20 µg/ml), respectivamente (RAVN et al., 2001; REKHA; YOUNG; ARUN, 2011). Para o cultivo das estirpes biossensoras de *Agrobacterium tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372) e KYC55(pJZ410)(pJZ372)(pJZ384) foi utilizado o meio AT, com a adição de tetraciclina (2 µg/ml) e canamicina (100 µg/ml) para a primeira e espectinomomicina

(100 µg/ml), tetraciclina (2 µg/ml) e gentamicina (100 µg/ml) para a segunda (ZHU et al. 1998; ZHU et al., 2003).

3.2.3 Extração de AHLs das amostras de soro-fermento

A extração de AHL foi realizada como proposto por Shaw et al. (1997) e Ravn et al. (2001), adotando modificações propostas por Pinto (2005) e adaptações propostas pelos autores. Uma amostra de 15 mL de soro-fermento foi centrifugada a 5000 g, por 10 min, a 10 °C. O sobrenadante foi coletado e esterilizado por filtração.

O volume de filtrado obtido foi misturado com igual volume de acetato de etila acidificado com 0,5 % de ácido fórmico, seguido de agitação vigorosa por 30 segundos. A mistura foi então centrifugada a 5000 g por 10 min a fim de permitir a separação das fases. A fração contendo o acetato de etila foi retirada e adicionada de outro igual volume de acetato de etila. O processo foi repetido por três vezes. O volume final obtido foi evaporado em capela de exaustão, à temperatura ambiente e ressuspendido em 3 mL de acetato de etila, seguido de filtração. O solvente foi mais uma vez evaporado em fluxo laminar, e o conteúdo final foi ressuspendido em 1 ml de acetonitrila e estocado a -20 °C.

3.2.4 Verificação da produção de AHLs pelos isolados Gram-negativos do soro-fermento.

Para a detecção de moléculas de AHL nos isolados Gram-negativos obtidos do soro-fermento, foi utilizada a metodologia descrita por Ravn et al. (2001) com modificações. Foram utilizadas as estirpe biossensoras *Agrobacterium tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), *Chromobacterium violaceum* CV026 e *Escherichia coli* pSB403.

Foram avaliados 150 isolados Gram-negativos obtidos como descrito no item 3.2.1. Tanto os isolados quanto a estirpe biossensora foram ativados em caldo LB a 25 °C por 18 horas, como descrito no item 3.2.2. Posteriormente, o caldo contendo o isolado a ser avaliado foi estriado em ágar sólido (0,8%) LB e incubado por 24 horas a 25 °C. As placas avaliadas com a utilização da estirpe de *A. tumefaciens* foram

também suplementadas com substrato 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal) adicionado ao meio em quantidade equivalente a 50 μ g/ml. A seguir, a estirpe monitora foi estriada em paralelo e reincubada por mais 24 h a 25 °C. A produção de autoindutores foi avaliada conforme a resposta fenotípica induzida na estirpe biossensora após a incubação final, a saber: produção de pigmento azul para a estirpe de *A. tumefaciens*, pigmento roxo para *C. violaceum* CV026 e bioluminescência para *E. coli* pSB403.

3.2.5 Verificação da presença de AHLs nas amostras de soro-fermento

Para a verificação da atividade de autoindutores nos extratos do soro-fermento obtidos no item 3.2.3., a metodologia descrita por Ravn e al. (2001) foi empregada com modificações.

Para o teste, 100 μ L do extrato foram adicionados a um tubo de ensaio. A acetoneitrila, utilizada como solvente do extrato foi evaporada em fluxo laminar e em seguida foram adicionados 2 mL de caldo LB. Uma das estirpes biossensoras *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), *A. tumefaciens* KYC55(pJZ410)(pJZ372)(pJZ384), *C. violaceum* CV026 ou *E. coli* pSB403 foi inoculada, e os tubos foram incubados sob agitação por 36 horas a 28 °C. Quando uma das estirpes de *A. tumefaciens* foi utilizada, o meio foi suplementado com 50 μ g/ml de X-Gal. A presença de autoindutores nas amostras foi confirmada pela observação da expressão fenotípica característica no meio de cultura, a saber: produção de pigmento azul para estirpes de *A. tumefaciens*, pigmento roxo para *C. violaceum* CV026 e bioluminescência para *E. coli* pSB403.

3.2.6 Triagem de isolados Gram-positivos inibidores de *quorum sensing*

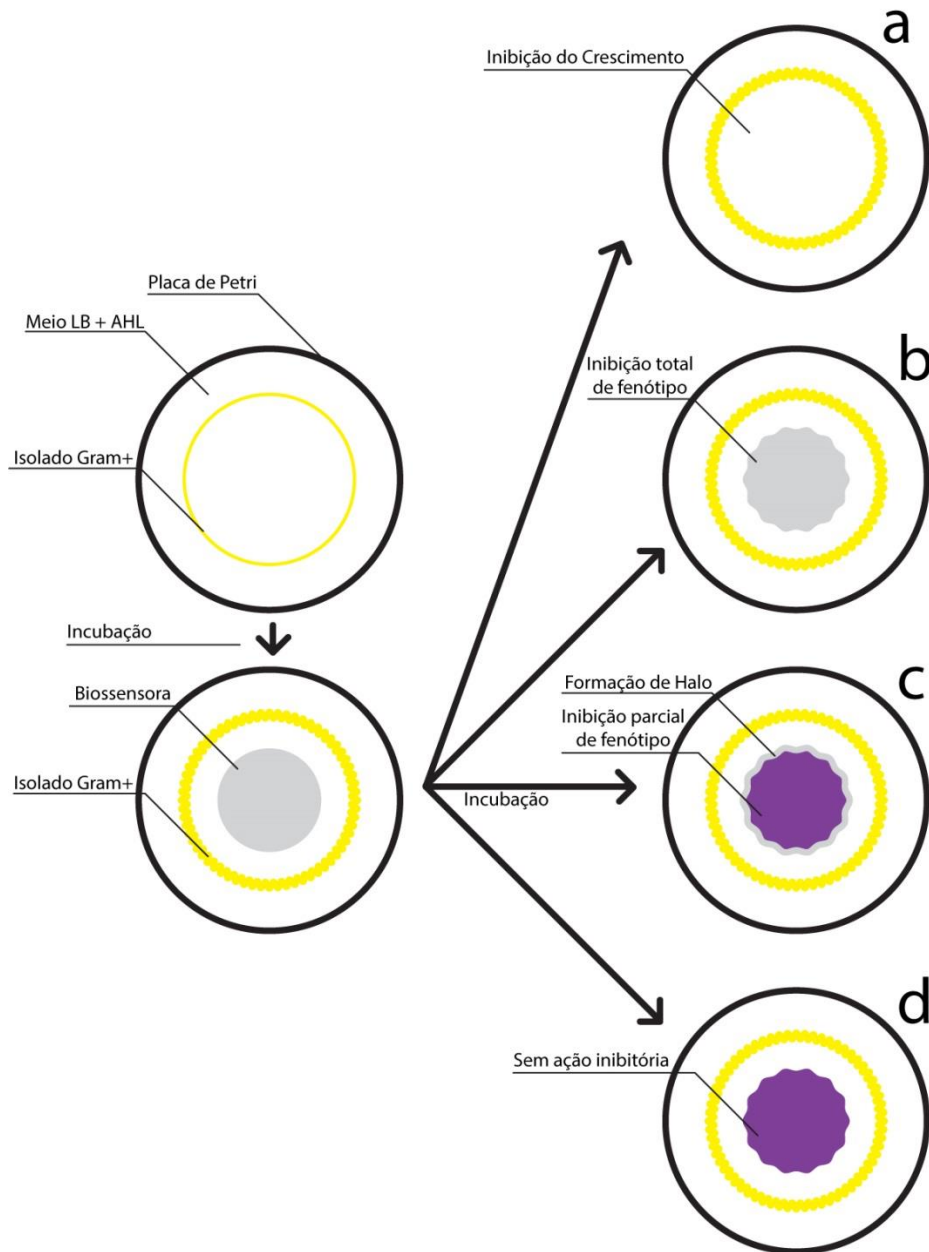
A fim de verificar a capacidade de inibição à comunicação por *quorum sensing* por parte de bactérias Gram-positivas presentes no soro-fermento, foram avaliados 200 isolados obtidos segundo o item 3.2.1., a partir de uma metodologia desenvolvida pelo autor, baseada na descrita por Linthorne et al. (2015).

Tanto os isolados quanto as estirpes biossensoras foram previamente ativados e incubados em caldo LB por 18 h a 25 °C. A seguir, quatro isolados a serem avaliados foram estriados de forma circular individualmente em ágar sólido (0,8%) LB suplementado com C6-HSL ou 3-oxo-C12-HSL, dependendo da estirpe biossensora a ser utilizada, na concentração de 100 nM. O ensaio é representado na Figura 2(a). O meio foi incubado por 24 h a 30 °C.

A seguir, uma estria de *C. violaceum* CV026 ou *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372) foi feita de forma a preencher parte da área interior delimitada pela estria anterior, em cada quadrante, como representado na Figura 2(b) pelas estrias cinzas.

Por fim, as placas foram incubadas novamente nas mesmas condições, e foi verificada a formação de violaceína nas estrias de *C. violaceum* CV026, ou a formação de pigmento azul nas colônias de *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), após 24 h. Os diferentes resultados possíveis são indicados na Figura 2(c).

Figura 2 – Representação esquemática de triagem de isolados Gram-positivos inibidores de *quorum sensing*.



Fonte: o autor (2022)

Representação esquemática da triagem de isolados Gram-positivos quanto à sua capacidade de inibição do *quorum sensing*. As letras (a – d) ilustram os quatro possíveis resultados da análise. (a) inibição do crescimento da estirpe biossensoras pela ação do isolado estudado. (b) Inibição total do fenótipo de *quorum sensing* da estirpe biossensora sem inibição do crescimento. (c) Inibição parcial do fenótipo de *quorum sensing* da estirpe biossensora, com formação de halo nas imediações da área próxima ao isolado estudado. (d) Nenhuma inibição detectada.

3.2.7 Verificação da capacidade de degradação de AHLs por isolados selecionados

Isolados Gram-positivos de interesse foram cultivados em meio mínimo KG, adicionado de uma AHL, de forma que esta represente a única fonte de carbono do meio (CHAN et al., 2009). Dessa forma, o crescimento do isolado alvo é dependente da capacidade deste de degradar a AHL, permitindo inferir a natureza enzimática de inibição do *quorum sensing* destes (CHAN et al., 2009; CHRISTIAEN, et al., 2011).

Assim, 10 mL de caldo LB foram inoculados com o isolado a ser avaliado, seguido por incubação a 30 °C por 24 h. A seguir, o caldo foi centrifugado a 2500 go sobrenadante foi descartado, e o pellet obtido foi lavado em solução salina duas vezes. A seguir, o pellet lavado foi novamente ressuspendido em solução salina, e 250 µL dela foram adicionados a um poço de uma placa de 96 poços. A cada poço foi também adicionado 250 µL de meio KG contendo C6-HSL ou 3-oxo-C12-HSL de forma a obter uma concentração final de 500 µg/ml do composto.

Os isolados foram incubados por 48 horas a 28 °C sob agitação constante. A seguir, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um tubo contendo 1 mL de meio KG suplementado com a mesma AHL usada inicialmente, a fim de promover o enriquecimento. Após seis etapas idênticas de enriquecimento, 100 µL da cultura final foram plaqueados em meio LB. Quando houve a formação de colônias, estas foram re-isoladas em meio LB e prosseguiram para análises descritas nos itens subsequentes.

3.2.8 Validação da capacidade de degradação de AHLs dos isolados obtidos e verificação da natureza da inibição por re-lactonização

A partir dos isolados obtidos no item 3.2.7, prosseguiu-se com a verificação da capacidade de inibição dos mesmos, a fim de garantir que tal capacidade não tivesse sido influenciada pela escassez de nutrientes a que foram submetidas na análise de meio mínimo.

Para tanto, eles foram cultivados em 20 mL de caldo LB suplementado com C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL ou 3-oxo-C12-HSL, em concentração de 100 nM durante 24

horas. A seguir, o caldo foi centrifugado a 5000 g, por 10 min, a 10 °C, e o sobrenadante foi coletado.

Para auxiliar na determinação do caráter enzimático empregado pelo isolado, foi utilizado o procedimento de re-lactonização, como descrito por Mukherji e Prabhune (2015). Nele, a partir da acidificação do meio, caso a clivagem da AHL avaliada tenha ocorrido por meio de quebra do seu anel lactona, a molécula regenera sua capacidade biológica de induzir o *quorum sensing*, uma vez que o pH baixo força a reconstrução da ligação rompida. Para isso, o sobrenadante foi dividido em duas alíquotas de 10 mL. Uma das alíquotas foi acidificada com HCl 1 M até pH 2,0, seguida de agitação e incubação por 1 hora, enquanto a outra permaneceu inalterada.

A seguir, procedeu-se a extração e concentração das AHLs das alíquotas da mesma forma descrita no item 3.2.3, e a presença das AHLs no extrato foi avaliada seguindo a mesma metodologia apresentada no item 3.2.5, com a utilização de *C. violaceum* CV026 para a validação de C6-HSL, *E. coli* pSB403 para 3-oxo-C8-HSL e *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372) para 3-oxo-C12-HSL.

Foi também elaborado um teste controle, no qual 20 mL de caldo LB suplementados com 100 nM das mesmas AHLs correspondentes, mas sem a inoculação de nenhum micro-organismo, foi submetido ao mesmo processo, a fim de garantir que uma possível inibição do *quorum sensing* observado nas estirpes biossensoras se devesse exclusivamente à degradação das moléculas sinalizadoras, e não ao processo a que foram submetidas.

3.2.9 Identificação de Isolados por MALDI-TOF

Para a identificação dos isolados de interesse, procedeu-se com a utilização da técnica de Espectrometria de Massas por Ionização Dessorção à Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS), realizado no Laboratório de Espectrometria de Massas - Dempster MS Lab, do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil.

Os isolados a serem identificados foram estriados em ágar Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C por 24 horas. A seguir, uma alíquota das colônias formadas foi transferida para um tubo de centrífuga de 2 mL, sendo dispersada em 100 µL de água ultrapura. Foi então adicionado 300 µL de álcool etílico absoluto, e o tubo foi

agitado em vortex por 10 segundos, seguido de centrifugação a 25000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o tubo foi deixado por 30 minutos aberto dentro de capela de fluxo laminar para secagem do pellet. Esse pellet foi ressuscitado em 30 μ L de ácido fórmico 70%, seguido de agitação em vortex por 10 segundos. Foram adicionados 30 μ L de acetonitrila P. A., seguida de nova agitação em vortex por 10 segundos, sendo posteriormente centrifugado por dois minutos a 13.400 RPM. O sobrenadante resultante foi utilizado para o prosseguimento da análise.

A seguir, alíquotas de 0,5 μ L desse sobrenadante foram transferidas para pontos individuais em placa de aço inox polido de 96 pontos. O líquido foi evaporado a temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de adição de 0,5 μ L da matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA). Após mais uma etapa de evaporação de 5 minutos, a placa foi inserida no MALDI-TOF MS para a análise, que se procedeu no modo íon positivo linear. Cada amostra foi avaliada em duplicata.

Os espectros de massa gerados foram comparados a um banco de dados com referência de 7.588 espectros, obtendo scores de confiança numa faixa de 0,0 a 3,0. Foram considerados scores de pontuação 2,0 ou mais para a identificação de alta confiança a nível de espécie, enquanto resultados entre 1,7 e 1,9 foram utilizados para determinação segura do gênero. Scores menores que 1,7 foram desconsiderados (BUCHAN, RIEBE e LEDEBOER, 2011; ALVES et al., 2016; FINGER et al., 2020; SANTOS et al., 2020).

4 Resultados e Discussão

4.1 Identificação de atividade relacionada à presença de AHLs nas amostras de soro-fermento

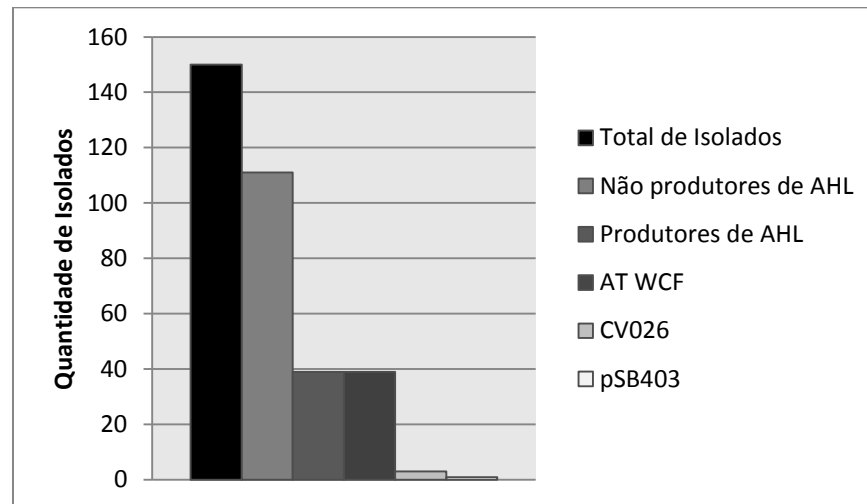
Das 45 amostras de soro-fermento analisadas, apenas uma apresentou o fenótipo característico em ambas as estirpes de *A. tumefaciens* utilizadas, não produzindo resposta discernível em nenhuma das outras estirpes biossensoras. Este resultado indica a presença de AHLs na amostra, e, portanto, comunicação por *quorum sensing* ativa dependente destas moléculas. Esta amostra, denominada de P11, corresponde a um fermento descartado pelo controle de qualidade da queijaria produtora, uma vez que apresentou baixo teor de acidez, além de alta contagem de coliformes totais e presença de *Escherichia coli* (resultados não mostrados).

A utilização em paralelo das diversas estirpes permite a identificação de uma alta gama de AHLs, em concentrações de até 5 nM (ZHU et al., 2003; PINTO et al., 2007; ZHAO et al., 2021). Dessa forma, a alta sensibilidade do método utilizado aliada a um fator de concentração de 15 vezes obtido durante a etapa de extração indica que tais compostos não se encontram presentes em sua forma ativa em nenhuma das demais amostras, mas não elimina a possibilidade que estes, antes presentes, tenham sido degradados pela ação de enzimas ou outras substâncias secretadas por micro-organismos presentes no soro-fermento.

4.2 Identificação de atividade relacionada à presença de AHLs nos isolados Gram-negativos

A Figura 3 indica a presença de isolados produtores de AHL obtidos.

Figura 3 - Número de isolados produtores e não produtores de AHLs.



Fonte: o autor (2022)

AT WCF, CV026 e pSB403 referem-se às respostas obtidas pelas estirpes biossensoras *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), *C. violaceum* CV026 e *E. coli* pSB403, respectivamente.

Dos 150 isolados analisados, 39 (26%) induziram o fenótipo regulado por *quorum sensing* em *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372). Dentre eles, três (2%) também induziram a produção de violaceína em *C. violaceum* CV026 e um (0,67%) induziu a formação de bioluminescência em *E. coli* pSB403.

A Tabela 1 mostra a distribuição dos isolados Gram-negativos produtores de AHLs nos pingos utilizados.

Tabela 1 – Distribuição dos isolados produtores de AHL nas amostras de soro-fermento provenientes de 11 propriedades.

Amostra	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	Total
Número de isolados positivos	2/13	4/13	7/13	3/13	2/13	4/13	0/13	3/13	3/13	6/13	5/20	39/150

Fonte: o autor (2022)

Isolados com respostas positivas foram obtidos em 10 das 11 amostras de soro-fermento utilizadas, sendo 5 (12,8%) provenientes do soro-fermento com presença de AHLs, descrito no item 4.1.

Embora isolados produtores de AHLs tenham sido encontrados em quase todas as amostras, o ensaio de identificação de AHLs diretamente no soro-fermento não permitiu que sua presença fosse atestada em 10 das 11 amostras avaliadas, não sendo possível sustentar uma correlação entre a presença destes isolados e a presença de moléculas sinalizadoras do *quorum*.

4.3 Identificação de Isolados Gram-negativos por MALDI-TOF MS

Dos 39 isolados Gram-negativos obtidos com respostas positivas para a produção de AHL, 9 foram identificados com segurança a nível de gênero por MALDI-TOF MS, e outros 10 a nível de espécie. A Tabela 2 abaixo mostra a identificação dos isolados obtidos e quais estirpes biossensoras responderam positivamente às suas comunicações.

Tabela 2– Identificação dos isolados Gram-negativos produtores de AHL e suas respectivas capacidades de indução do quorum sensing nas estirpes biossensoras utilizadas.

Identificação	Resposta a <i>A. tumefaciens</i> WCF47(pCF218) (pCF372)	Resposta a <i>C. violaceum</i> CV026	Resposta a <i>E. coli</i> pSB403
<i>Pseudomonas fulva</i>	X		
<i>Enterobacter</i> sp.	X	X	
<i>Pseudomonas</i> sp.	X		
<i>Enterobacter</i> sp.	X		
<i>Enterobacter</i> sp.	X		
<i>Lelliottia amnigena</i>	X		
<i>Serratia marcescens</i>	X	X	
<i>Pseudomonas</i> sp.	X		

<i>Pseudomonas putida</i>	X		
<i>Serratia marcescens</i>	X	X	
<i>Hafnia alvei</i>	X		X
<i>Enterobacter sp.</i>	X		
<i>Pseudomonas fulva</i>	X		
<i>Enterobacter sp.</i>	X		
<i>Lelliottia amnigena</i>	X		
<i>Enterobacter sp.</i>	X		
<i>Pseudomonas sp.</i>	X		
<i>Lelliottia amnigena</i>	X		
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	X		

Fonte: o autor (2022)

Dentre os isolados identificados, estão tanto bactérias com vastos estudos sobre seus sistemas de *quorum sensing*, quanto bactérias que, no conhecimento do autor, nunca tiveram tais sistemas identificados.

A presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* em queijos e diversos outros produtos lácteos, em especial nos elaborados com leite cru e refrigerados, é amplamente estudada, uma vez que prevalecem facilmente sobre as demais psicrotróficas nesses ambientes (MARTIN et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2021; WAN-AZEMIN, ALIAS e KARI, 2021). Dentre elas, destaca-se a *Pseudomonas fluorescens*, pela capacidade de produzir proteases e lipases termoestáveis, responsáveis pela hidrólise de caseína e lipídeos no produto, levando à perda sensorial e de qualidade e impactando diretamente a produtividade nas queijarias e demais laticínios (MARTINS et al., 2014).

Foram encontrados seis isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, com a identificação das espécies *P. fulva* e *P. putida* entre eles. Esse é um dos gêneros de bactérias Gram-negativas mais bem estudados quanto aos seus sistemas de

quorum sensing, em especial os baseados em AI-1, devido à boa parte de seus integrantes possuírem sistemas bastante variados de comunicação e pela grande importância da *Pseudomonas aeruginosa* nas mais diversas áreas (ELASRI et al., 2000). Essa espécie se utiliza de diversos sistemas de *quorum sensing*, como os baseados nos genes *las* e *rhl*, que utilizam 3-oxo-C12-HSL e N-butilil-L-homoserina lactona (C4-HSL), para regular diversos fatores de virulência, incluindo a formação de biofilme e a produção de toxinas, o tornando um patógeno oportunista, e um dos principais causadores de infecções hospitalares (PEARSON, PESCI e IGLEWSKI, 1997; O'LOUGHLIN et al., 2013; KOSTYLEV et al., 2019; YANG e WU, 2019; LI et al., 2022b).

Diversos estudos indicam a presença de *quorum sensing* em *Pseudomonas putida*. Normalmente encontrada em associação com rizomas de plantas variadas e em solo, essa bactéria é conhecida pela utilização de moléculas de 3-oxo-decanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C10-HSL) e 3-oxo-C12-HSL como sinalizadoras para sistemas que controlam a expressão de fenótipos de mobilidade, biofilme e a produção de biosurfactantes (STEIDLE et al., 2002; BERTANI et al., 2007; CÁRCAMO-OYARCE et al., 2015). Os resultados obtidos são condizentes com os estudos citados, uma vez que o isolado obtido induziu o fenótipo apenas na biosensora *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), que é a única biosensora utilizada com capacidade para detectar AHLs de cadeia longa com ou sem substituição oxo.

Por outro lado, poucos estudos tratam da presença ou ausência de comunicação por *quorum sensing* em *Pseudomonas fulva*. Por se tratar de uma espécie menos comum, presente principalmente em solo, mas com possibilidade de se tornar um severo patógeno humano em caso de procedimentos invasivos ou traumas com contato com material infectante, estudos buscando sistemas de *quorum sensing* no gênero *Pseudomonas* raramente a incluem (VENTURI, 2005; STARK, 2021; ADENJIJI e BABALOLA, 2022). Kloepper et al. (2013) sugerem que dois isolados encontrados durante seu estudo, identificados como *P. fulva/putida* e *P. fulva/taiwanensis*, expressam alguns de seus genes de virulência apenas quando a população dessas bactérias atinge um nível populacional mínimo, resultando na infecção severa da planta *Rumohra adiantiformis*. Tais resultados não são conclusivos em relação à presença ou não de um sistema de *quorum sensing* mediado por AHLs nessas bactérias, embora sugiram essa possibilidade. Dessa

forma, este trabalho torna-se possivelmente o primeiro a diretamente observar a indução de fenótipos de *quorum sensing* mediados por AHL extraídas de *Pseudomonas fulva*, sendo de grande interesse que análises subsequentes visando a determinação das AHLs envolvidas e os genes responsáveis, bem como o mecanismo controlado por eles, sejam desenvolvidas.

Dentre os isolados analisados, um foi identificado como *Hafnia alvei*. É uma bactéria de distribuição ampla, podendo estar presente em alimentos fermentados, como *kimchi* (vegetais fermentados tradicionalmente produzidos nas Coréias) e embutidos cárneos, no solo e no trato intestinal de animais e humanos. Não é considerado um patógeno, embora possa causar reações adversas em crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos (CASTAÑO et al., 2002; KIM e KWON, 2008; PHAM et al., 2019). Novos estudos têm tratado seu uso como probiótico de forma promissora (LEGRAND et al., 2020; VINOT et al., 2022). Também é comumente presente em leite cru, sendo o micro-organismo dominante durante a fermentação de diversos queijos produzidos a partir de leite cru e envelhecidos a partir da casca (MOUNIER et al., 2008; POGAČIĆ et al., 2015).

Esta espécie tem sido recentemente estudada para melhor elucidar seus mecanismos de *quorum sensing*. Diferentes isolados foram observados com sistemas dependentes de AHLs distintas. Dentre elas, foram observadas a produção e a resposta às AHLs C4-HSL, C6-HSL e N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C8-HSL), regulando fatores como motilidade e produção de biofilme, bem como a inibição dessa comunicação por meio de L-carvona (TAN, YIN e CHAN, 2014; MARTINS et al., 2018; LI et al., 2019; ZHU et al., 2019; YAN et al., 2021). A indução do fenótipo de *quorum sensing* na estirpe biossensora *E. coli* pSB403 é condizente com a provável presença de 3-oxo-C8-HSL, uma vez que a produção dessa molécula foi atestada em trabalhos prévios e esta é a AHL que melhor induz a resposta fenotípica na estirpe biossensora. Além disso, pelo vasto campo de respostas da *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), a indução da resposta fenotípica nela também se mostra provável.

Dois isolados foram identificados como *Serratia marcescens*. Esse micro-organismo é considerado patogênico aos humanos, sendo responsável por infecções hospitalares, em especial no trato urinário e respiratório. É encontrado em diversos ambientes, incluindo no solo, em rizomas, em água e em alimentos, onde é um importante deteriorador. No leite e em seus derivados, como o queijo, encontra-

se normalmente presente juntamente de outras Enterobacteriaceae, podendo causar olhaduras, alterações sensoriais provenientes de ações enzimáticas diversas e aromas desagradáveis, criados a partir da formação de putrescina e outros compostos variados (ALBERGHINI, TALLONE e GIACCONE, 2010; PACHLOVÁ et al., 2016; MLADENović et al., 2017; MLADENović, MURUZović e ČOMIĆ, 2017).

O *quorum sensing* no gênero *Serratia* é extensamente estudado, em especial em *S. marcescens*. Os sistemas controlados por AI-2 já mostraram controlar fenótipos de produção de carbapenema, um antibiótico potente; prodigiosina, o pigmento avermelhado característico de algumas espécies do gênero; e hemolisina, além de outras enzimas de caráter virulento. Já em fenótipos regulados por AHLs, foi observado o controle da expressão de motilidade, tanto do tipo “swarming” quanto “sliding”, a formação de biofilme, produção de biosurfactantes além de, em diferentes isolados, também controlar a produção da prodigiosina e de carbapenema. As AHLs produzidas por *Serratia* são diversas, sendo as mais comuns as C6-HSL, embora também não seja incomum a produção de N-3-oxo-hexanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL), N-heptanoil-L-homoserina lactona (C7-HSL) e a N-octanoil-L-homoserina lactona (C8-HSL) (HORNG et al., 2002; HOUDT, GIVSKOV e MICHIELS, 2007; BOUYAHYA et al., 2022).

Ambos os isolados encontrados corroboram com observações de estudos anteriores, uma vez que induziram a formação de resposta fenotípica ao *quorum sensing* não apenas em *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372), mas também em *C. violaceum* CV026, que apresenta maior sensibilidade à C6-HSL, já que essa era a homoserina que esta cepa originalmente produzia.

Bactérias do gênero *Enterobacter* frequentemente são encontradas em alimentos, incluindo leite cru, normalmente provenientes de contaminações de origem fecal ou do solo. São alguns dos responsáveis no queijo pela produção de defeitos na massa, como a formação de olhaduras, desenvolvimento de aromas desagradáveis e pela produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas que diminuem a qualidade sensorial do produto (TORNADIJO et al., 2001; CHAVEZ-LÓPEZ et al., 2006; TAMAGNINI et al., 2008; GÖKMEN, TEKINŞEN e GÜRBÜZ, 2010; TABLA et al., 2016; FERREIRA e SILVA, 2020; ARAGÃO et al., 2022; LACORTE et al., 2022).

Diversos estudos apontam para diferentes interações populacionais pelo gênero *Enterobacter*. Yin et al. (2012) e Lau et al. (2013) demonstraram a utilização

de C4-HSL e C6-HSL por diferentes isolados do gênero, enquanto outros estudos indicam a presença de sistemas de *quorum sensing* baseados em AI-2 e em AI-3 (READING e SPERANDIO, 2005; REZZONICO, SMITS e DUFFY, 2012; TAY e YEW, 2013; LAZAR et al., 2021). Além disso, outros estudos mostram ações de *quorum quenching* em diversas espécies desse gênero, com variadas estratégias, desde o emprego de lactonases até a utilização de ácidos orgânicos (SHASTRY et al., 2018; SHARMA et al., 2019). Até o presente momento, nenhum estudo conduzido levou à identificação da produção de AHLs por *E. xiangfangensis*, indicando que esse possa ter sido o primeiro registro para essa espécie.

Por fim, foram também identificados três isolados como *Lelliottia amnigena*. Essa bactéria, recentemente renomeada (anteriormente conhecida por *Enterobacter amnigenus*) é considerada um patógeno oportunista humano, tendo incidências em infecções urinárias. Também apresenta patogenicidade para algumas plantas, em especiais tubérculos, ao mesmo tempo em que pode promover o crescimento de outras, quando em equilíbrio com o sistema radicular desta (BRADY et al., 2013; LEAL-NEGREDO et al., 2017; EL-AKHDAR, ELSAKHAWY e ABO-KOURA, 2020; OSEI et al., 2022). Outras espécies de seu gênero podem também ser encontradas em água e raramente em alimentos fermentados (KÄMPFER et al., 2018; YUK et al., 2018). Até o presente momento, o autor não tem ciência de nenhum estudo publicado referente à produção de AHLs ou a fenótipos relativos ao *quorum sensing* para este gênero, bem como sua presença na microbiota relativa ao queijo canastra, podendo este ser o primeiro relato.

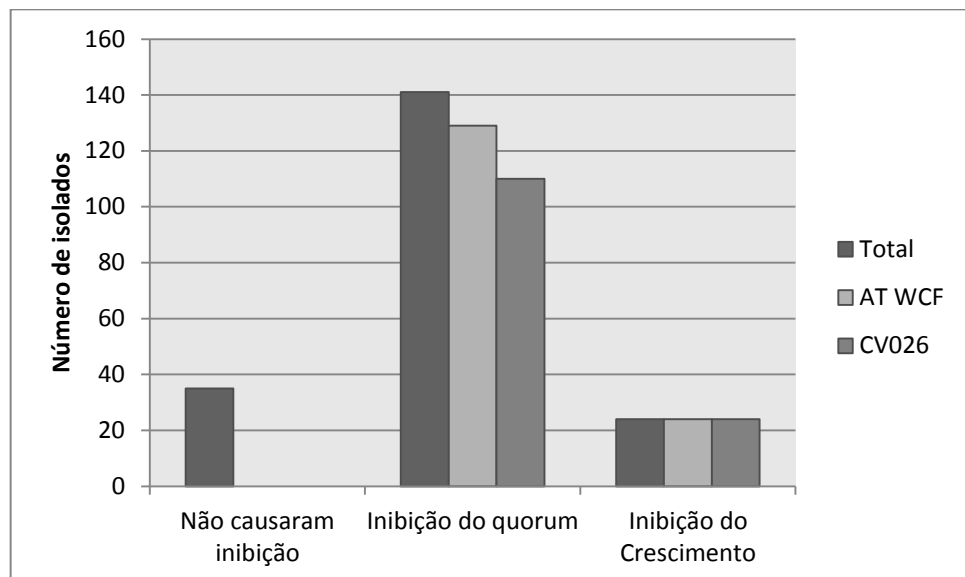
Este trabalho, bem como diversos anteriores a ele, demonstra a riqueza microbiológica contida no soro-fermento do queijo Canastra (BORELLI et al., 2006a; KAMIMURA et al., 2020; CAMPOS et al., 2021; LACORTE et al., 2022). Esta diversidade permite que o produto obtenha sabor e aroma únicos, complexos e de difícil reprodução em outros ambientes. Ao mesmo tempo, a diversidade de bactérias Gram-negativas tem, de modo geral, um impacto negativo no produto (BORELLI et al., 2006b; DORES et al., 2013; SANT'ANNA et al., 2018). Dentre os gêneros encontrados, apenas *Hafnia* é conhecida por poder contribuir positivamente para o queijo, embora também possa ser um patógeno oportunista humano (COONEY et al., 2014). Já os demais gêneros encontrados, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Lelliottia*, são todos considerados indesejados em alimentos, levando

a degradações sensoriais e estruturais do produto, e sua conseqüente perda de qualidade (TRMČIĆ et al., 2016; ZHENG et al., 2021).

4.4 Triagem de isolados Gram-positivos quanto à inibição do quorum sensing

A Figura 4 indica a presença dos isolados Gram-positivos capazes de inibir o *quorum sensing* nas estirpes biossensoras.

Figura 4 - Estratificação dos isolados Gram-positivos quanto à capacidade de inibir o *quorum sensing* em bactérias biossensoras.

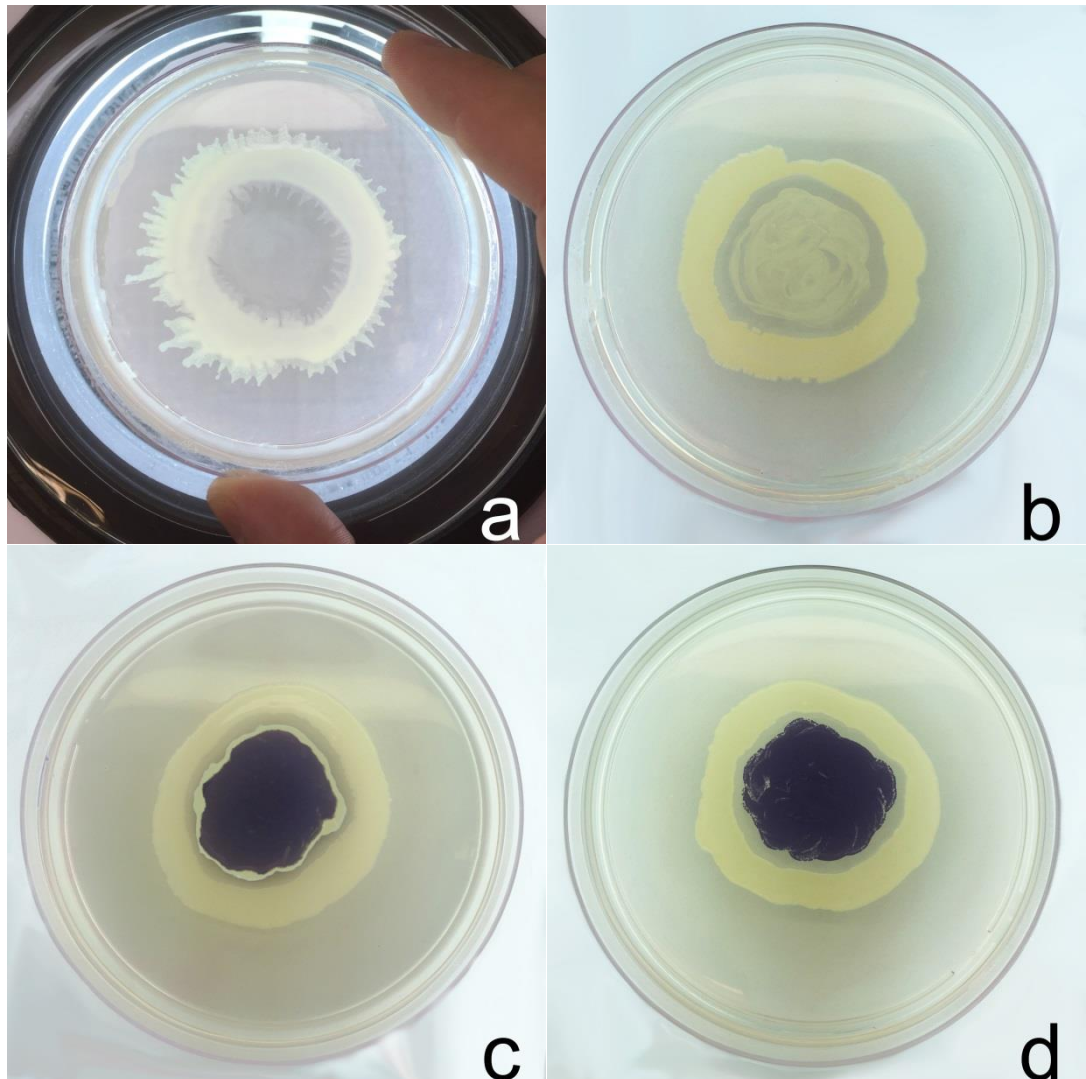


Fonte: o autor (2022)

AT WCF e CV026 referem-se às respostas obtidas pelas estirpes biossensoras *A. tumefaciens* WCF WCF47(pCF218)(pCF372) e *C. violaceum* CV026, respectivamente.

Dos 200 isolados Gram-positivos analisados, 165 (82,5%) apresentaram ação sobre as estirpes biossensoras utilizadas. Desses, 24 apresentaram ação antimicrobiana sobre, e as demais 141 apresentaram ação anti-*quorum* específica, com 12 agindo exclusivamente na biossensora CV026, 31 agindo exclusivamente em WCF e 98 em ambas. As respostas positivas foram classificadas em três categorias distintas, como apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Resultados dos ensaios com estirpes biossensoras.

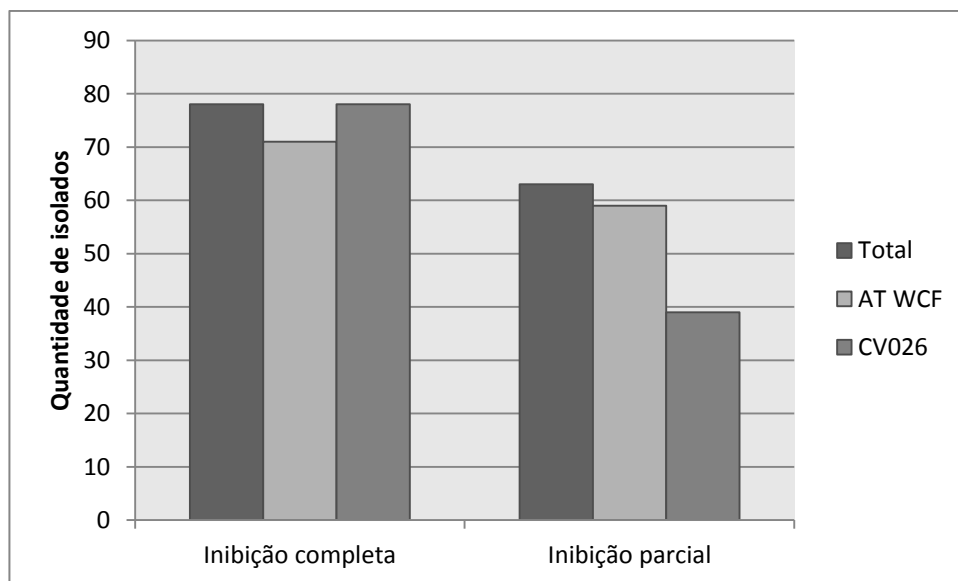


Fonte: o autor (2022)

Resultados possíveis da análise de triagem dos isolados Gram-positivos, como ilustrado anteriormente na Figura 2. (a) Inibição do crescimento da estirpe biossensora por parte do isolado Gram-positivo. (b) Inibição total da resposta ao *quorum sensing* provocada pelo isolado Gram-positivo. Não houve produção visível de violaceína por parte da estirpe biossensora CV026. (c) Inibição parcial da resposta ao *quorum sensing* por isolado Gram-positivo. Houve produção de violaceína por parte da estirpe biossensora CV06, mas foi observado um halo despigmentado ao redor da estria, indicando inibição apenas nas imediações (d) Resposta negativa quanto à interação do isolado Gram-positivo com a estirpe biossensora. A estirpe biossensora CV026 expressou seu fenótipo regulado por *quorum sensing* sem nenhuma inibição.

A Figura 6 mostra os diferentes tipos de ação dos isolados sobre as estirpes biossensoras.

Figura 6 - Distribuição das diferentes formas de inibição do *quorum sensing* nas estirpes biossensoras.



Fonte: o autor (2022)

AT WCF e CV026 referem-se às respostas obtidas pelas estirpes biossensoras *A. tumefaciens* WCF WCF47(pCF218)(pCF372) e *C. violaceum* CV026, respectivamente.

Dos isolados que apresentaram interação com as estirpes biossensoras, 78 (47,3%) promoveram a inibição completa da resposta ao *quorum*, com 71 agindo sobre ambas as estirpes e sete agindo apenas sobre a estirpe CV026. Ao mesmo tempo, 63 (38,2%) promoveram inibição apenas no entorno da colônia biossensora, com 35 agindo em ambas as estirpes, quatro agindo apenas na CV026 e 24 agindo apenas sobre a WCF.

A inibição do *quorum sensing* pode ocorrer por diversas vias. Embora o presente estudo tenha como principal foco a inibição por vias enzimáticas, que resultam na degradação das moléculas sinalizadoras, já foram descritas inibições causadas por bloqueio da síntese das moléculas de AHL, pela competição de outras

moléculas com os receptores dos sinais e pela ligação de um composto à molécula de AHL (sequestro), impedindo que esta mantenha sua atividade como autoindutor (KIRAN et al., 2017).

Tais formas de inibição já foram observadas diretamente em bactérias ou em compostos provenientes de seu metabolismo, na forma de antibióticos em baixas concentrações, metabólitos de baixo peso molecular e compostos de função ainda desconhecida (HAYASHIDA et al., 2001; SKINDERSOE et al., 2008; CHU et al., 2013; KAUR e YOGALAKSHMI, 2018).

Devido ao raio de inibição extremamente extenso, dificilmente o *quorum quenching* promovido pelos isolados que inibiram totalmente a resposta da estirpe biossensora seja originário majoritariamente de meios enzimáticos de degradação de AHLs. Outros compostos secretados de forma extracelulares, como N-[2-(1H-indol-3-yl)etil]-ureia e N-(2-fenel)-ureia (yayurea A e yayurea B), e 4-Hidroxi-2,5-Dimetil-3(2H)-Furanona, produzidos por bactérias presentes em leite e derivados, já tiveram sua ação inibitória do *quorum sensing* confirmada (CHU et al., 2013; CHOI et al., 2014). Estes, devido ao seu tamanho reduzido, poderiam se difundir mais facilmente pelo meio, produzindo ações de inibição diversas (LODISH et al., 2000). Tais compostos, por apresentarem características extremamente diversificadas, tornam inviável um método único de análise para sua identificação.

Por outro lado, a inibição apenas no entorno da colônia biossensora apresentada por diversos isolados se assemelha à ação de proteínas extracelulares, com a formação de um halo de inibição. Por seu diâmetro reduzido, é possível inferir que seu tamanho molecular seja bastante elevado (HANKIN, ZUCKER e SANDS, 1971; HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

Diversas enzimas responsáveis pela degradação de AHLs foram encontradas em bactérias que habitam ambientes marinhos, solo, no trato intestinal humano e até em contaminantes alimentares. Esses achados indicam que, embora não totalmente mapeadas e compreendidas, acilases e lactonases podem, auxiliadas por fatores ambientais e pela presença de outros compostos inibidores do *quorum sensing*, permitir que certas bactérias se sobressaiam em ambientes específicos (FETZNER, 2014; MAYER et al., 2018; FONG et al., 2018; REINA, PÉREZ e LLAMAS, 2022).

A Tabela 3 mostra a distribuição dos isolados sem ação inibitória do *quorum sensing* nas diferentes amostras de soro-fermento.

Tabela 3– Distribuição dos isolados sem ação inibitória do *quorum sensing* nas amostras de soro-fermento

Amostra	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11
Número de isolados	5/18	0/18	0/18	1/18	0/18	4/18	3/18	0/18	2/18	1/18	19/20

Fonte: o autor (2022)

Dos isolados avaliados, 35 (17,5%) não apresentaram qualquer efeito nem no crescimento nem na capacidade de comunicação destas bactérias. Deles, 19 são provenientes da amostra de soro-fermento descrita no item 4.1, denominada P11. Tal número corresponde a 95% (19/20) dos isolados Gram-positivos analisados que tiveram origem no mesmo soro-fermento, mostrando diferença bastante pronunciada em relação às demais amostras, onde o máximo de isolados sem atividade de *quorum quenching* correspondeu a 27,8% dos isolados Gram-positivos obtidos.

Devido às indiscutíveis vantagens que a regulação de fenótipos por *quorum sensing* conferem às bactérias, Dong e Zhang (2005) consideram que a inibição dessa comunicação por sistemas diversos também deve ser considerada extremamente vantajosa para os organismos que utilizam esta estratégia.

Dessa forma, é possível supor que parte da estratégia de colonização e adaptação de bactérias Gram-positivas lácticas ao leite e aos seus derivados, incluindo o soro-fermento do queijo Canastra, pode se dever à capacidade destas de inibirem fenótipos controlados por *quorum sensing* em bactérias Gram-negativas concorrentes, diminuindo suas vantagens competitivas e tornando sua permanência e multiplicação em grande quantidade dificultada.

4.5 *Confirmação da degradação de moléculas sinalizadoras do quorum sensing por via enzimática nos isolados Gram-positivos e sua identificação por MALDI-TOF MS*

Após a segregação dos isolados obtidos anteriormente em possíveis produtores de enzimas com ação de *quorum quenching* ou não, os isolados do primeiro grupo foram analisados quanto sua capacidade de multiplicação em um meio mínimo tendo como única fonte de carbono diferentes moléculas de AHL. Dessa forma, a multiplicação do isolado a ser avaliado ficou condicionada à sua

capacidade de degradação das AHLs por via enzimática e sua posterior utilização como substrato.

Dos 63 isolados avaliados, foi possível a re-obtenção de 28 após o ensaio. Desses, 10 foram obtidos exclusivamente a partir do meio contendo C6-HSL, seis foram obtidos exclusivamente do meio contendo 3-oxo-C12-HSL e 12 foram recuperados em ambos os casos.

Esses isolados foram identificados por MALDI-TOF MS e foram submetidos a um teste de confirmação, a fim de melhor avaliar sua capacidade inibitória do *quorum sensing*, bem como um teste de relactonização, a fim de melhor compreender o mecanismo de ação da enzima empregada. A identidade dos isolados e os dados correspondentes a essas análises estão demonstrados na Tabela 4. Foi atribuída uma codificação, indicada ao lado da identificação de cada isolado, para melhor facilitar a comunicação ao longo do trabalho.

Tabela 4–Identificação dos isolados Gram-positivos produtores de enzimas inibidoras do *quorum sensing* e suas respectivas capacidades de inibição de AHLs selecionadas, bem como a possibilidade de relactonização dessas após a ação enzimática..

Identificação	Codificação	AHL utilizada como fonte de carbono	Inibição de C6-HSL	Relactonização de C6-HSL	Inibição de 3-oxo-C8-HSL	Relactonização de 3-oxo-C8-HSL	Inibição de 3-oxo-C12-HSL	Relactonização de 3-oxo-C12-HSL
<i>Staphylococcus xylosus</i>	SX1	C6-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	-
<i>Staphylococcus xylosus</i>	SX2	C6-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Staphylococcus xylosus</i>	SX3	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Staphylococcus xylosus</i>	SX4	C6-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	-
<i>Staphylococcus xylosus</i>	SX5	C6-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Staphylococcus xylosus</i>	SX6	C6-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Staphylococcus xylosus</i>	SX7	C6-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Staphylococcus sciuri</i>	SS	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	C6-HSL	Sim	Não	Não	-	Não	-
<i>Microbacterium oxydans</i>	M1	3-oxo-C12-HSL	Não	-	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	M2	3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	M3	3-oxo-C12-HSL	Não	-	Sim	Sim	Sim	Sim

Identificação	Codificação	AHL utilizada como fonte de carbono	Inibição de C6-HSL	Relactonização de C6-HSL	Inibição de 3-oxo-C8-HSL	Relactonização de 3-oxo-C8-HSL	Inibição de 3-oxo-C12-HSL	Relactonização de 3-oxo-C12-HSL
<i>Microbacterium maritipicum</i>	M4	3-oxo-C12-HSL	Não	-	Não	-	Sim	Não
<i>Rothia kristinae</i>	KK	C6-HSL	Sim	Não	Sim	Não	Não	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF1	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF2	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF3	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF4	C6-HSL	Sim	Sim	Não	-	Não	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF5	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF6	3-oxo-C12-HSL	Não	-	Não	-	Sim	Não
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF7	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF8	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF9	3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF10	C6-HSL	Sim	Sim	Não	-	Não	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF11	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF12	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Identificação	Codificação	AHL utilizada como fonte de carbono	Inibição de C6-HSL	Relactonização de C6-HSL	Inibição de 3-oxo-C8-HSL	Relactonização de 3-oxo-C8-HSL	Inibição de 3-oxo-C12-HSL	Relactonização de 3-oxo-C12-HSL
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF13	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF14	C6-HSL 3-oxo-C12-HSL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Fonte: o autor (2022)

Ao todo, foram identificados nove isolados de *Staphylococcus*, sendo sete da espécie *S. xylosus*, um *S. aureus* e um *S. sciuri*. Todos foram re-isolados do meio suplementado com C6-HSL, com dois (SX3 e SS) sendo re-isolados também do meio suplementado com 3-oxo-C12-HSL. No teste seguinte de reconfirmação da capacidade inibitória, os isolados SX1 e SX4 inibiram a comunicação por C6-HSL e 3-oxo-C8-HSL apenas, enquanto SX2, SX3, SX5, SX6 e SX7 inibiram a comunicação tanto dessas duas AHLs como também de 3-oxo-C12-HSL. Já o isolado de *S. aureus* (SA) foi obtido a partir do meio suplementado com C6-HSL, e mostrou capacidade inibitória apenas em C6-HSL, enquanto o isolado de *S. sciuri* (SS) pôde ser reisolado de ambos os meios, e apresentou capacidade inibitória em todas as AHLs testadas. Os isolados SX1, SX2, SX3, SX4, SX5, SX6, SX7 e SS, que inibiram a comunicação mediada por mais de uma das AHLs utilizadas tiveram a viabilidade da comunicação de seu extrato restaurada quando submetidas ao teste de relactonização, enquanto o isolado SA, que inibiu o *quorum sensing* apenas em C6-HSL não sofreu alteração perceptível nesse teste.

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, é possível inferir que, uma vez que o efeito inibitório causado pelos isolados SX1, SX2, SX3, SX4, SX5, SX6, SX7 e SS parecem se estender para uma vasta gama de AHLs, independentemente do comprimento de sua cadeia acil, ao passo que seu sobrenadante recupera a capacidade de induzir o *quorum sensing* ao ser submetido a uma redução de pH, a principal enzima atuante nesses isolados deve tratar-se de uma lactonase.

Diversos estudos anteriores apontam para a produção de lactonases por diferentes espécies dentro do gênero *Staphylococcus*. Morikawa et al. (2005) e Tanaka et al. (2007) estudaram a produção de uma lactonase em *S. aureus* a partir de uma proteína de sua parede celular. Foi determinado que sua ação necessita de cálcio, mas não obtiveram êxito em elucidar qual sua função para a célula, uma vez que foi determinado que esta não contribui para o sistema de defesa a antibióticos daquele isolado. Posteriormente, a partir do sequenciamento do genoma completo de um isolado de *Staphylococcus* sp., Chong et al., (2012) encontraram outro gene codificante para uma lactonase, e inferiram sobre seu potencial de *quorum quenching* em bactérias Gram-negativas. Chan et al. (2015) observaram o potencial de *quorum quenching* de um *Staphylococcus saprophyticus*, e através da análise de seu genoma completo, identificaram a lactonase responsável por essa ação. Recentemente, Morohoshi, Kamimura e Someya (2020) identificaram ainda outra

lactonase em *Staphylococcus* coagulase-negativa, incluindo *S. sciuri*, e confirmaram sua ação sobre diferentes moléculas sinalizadoras do *quorum sensing* em bactérias Gram-negativas. Em especial, *S. sciuri* mostrou excelente capacidade de degradação tanto de C6-HSL quanto de C10-HSL, sendo o isolado estudado produtor da degradação mais acentuada. Outros isolados pertencentes às espécies *S. carnosus*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* mostraram ação degradante menor, em especial com AHLs de maior cadeia acilada.

Esses resultados condizem com os obtidos durante esse estudo, onde *S. sciuri* promoveu ampla ação de *quorum quenching* em todas as AHLs estudadas, além de demonstrar possibilidade de reativação das moléculas hidrolizadas por re-lactonização. Pelo menos segundo os conhecimentos do autor, ainda não existem estudos sobre a produção de lactonase ou a capacidade inibitória do *quorum sensing* em *S. xylosus*. Porém, segundo os estudos filogenéticos mais recentes no gênero *Staphylococcus*, esta espécie apresenta proximidade muito grande com *S. saprophyticus*, de forma que se torna possível supor, mediante os resultados apresentados, a presença de genes codificadores de lactonase semelhantes. Tal fato explicaria tanto a grande prevalência dessa espécie dentre as identificadas como promotora do *quorum quenching*, quanto a razão dos isolados SX1 e SX4 possuírem ação de lactonase, ao mesmo tempo em que apresentam dificuldade na hidrólise da molécula de 3-oxo-C12-HSL (LAMERS et al., 2012).

De forma oposta, o isolado SA teve ação apenas em C6-HSL, enquanto que a acidificação do seu sobrenadante não foi suficiente para reestabelecer a ação de *quorum sensing* da AHL degradada. Dessa forma, é possível supor que a inibição do *quorum sensing* promovida por esse isolado tem origem na ação de uma acilase (YATES et al., 2002; MUKHERJI e PRABHUNE, 2015; RYU et al., 2020).

As acilases no *quorum sensing* são caracterizadas pela ação em substratos mais específicos, quando comparadas às lactonases, uma vez que atuam em ligações específicas da cauda acilada das moléculas de AHL, e, por essa ser justamente a região variável, sua ação se torna muitas vezes limitada (FETZNER, 2014; MURUGAYAH e GERTH, 2019). Além disso, ela pode ter sua ação dificultada por substituições oxo, presentes em algumas AHLs, devido a impedimento estérico (SHURKI et al., 2002; CASTRONOVO et al., 2008; YIN et al., 2011; ZIELIŃSKA et al., 2016).

No gênero *Staphylococcus*, algumas acilases já são conhecidas. As mais bem estudadas são as penicilinases, devido à sua grande importância médica (ENGLISH, MCBRIDE e HUANG, 1960; TEMBHURKAR et al., 2012; LI et al., 2020). Mukherji e Prabhune (2015) confirmaram pela primeira vez a capacidade de interferência no *quorum sensing* de Gram-negativas por meio da ação de uma acilase de *Staphylococcus epidermidis* que antes se acreditava ter ação apenas na hidrólise de sais de bile, sugerindo que outros membros desse gênero também possam sintetizar enzimas com capacidades semelhantes. Já Conroy (2016) descreveu um gene em *S. aureus* produtor de acilase, que foi por ela caracterizado como forte inibidor do *quorum sensing* mediado por 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL e 3-oxo-C14-HSL. Sua suposição inicial de que essa acilase serviria de mecanismo de defesa de *S. aureus* contra a toxicidade apresentada por algumas AHLs se mostrou improvável, já que seus produtos de hidrólise ainda mantinham ação tóxica na colônia. Foi então teorizado que tais enzimas tinham como função a inibição da comunicação de *Pseudomonas aeruginosa*, que compartilha o mesmo ambiente no qual foi encontrado e compete diretamente pelos mesmos substratos.

Os resultados obtidos para o isolado SA se mostram únicos na literatura até o momento, uma vez que sua inibição se deu apenas na molécula de C6-HSL, tornando interessante a continuidade de pesquisas com essa bactéria.

O gênero *Microbacterium* foi representado por quatro isolados, sendo dois *M. liquefaciens*, um *M. oxydans* e um *M. maritimum*. Todos foram isolados a partir do meio suplementado com 3-oxo-C12-HSL apenas. Os isolados M1 e M3 inibiram o *quorum sensing* mediado pelas AHLs 3-oxo-C8-HSL e 3-oxo-C12-HSL, ambos respondendo positivamente ao teste de relactonização. O isolado M2 inibiu a comunicação mediada por todas as AHLs avaliadas, também respondendo positivamente ao teste de relactonização em todos os casos. Porém, o isolado M4 apresentou inibição apenas de 3-oxo-C12-HSL, sem indicar a relactonização das moléculas atacadas.

Poucos trabalhos estudam a relação de *Microbacterium* com o *quorum sensing*. Wang et al. (2010) foram os primeiros a encontrar um gene responsável pela codificação de uma lactonase em *M. testaceum*, isolado a partir da folha de batata, mostrando também a ação da enzima isolada sobre C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL e 3-oxo-C12-HSL, onde a proteína foi capaz de degradar todas as moléculas, tendo maior êxito nas de

maior comprimento da cadeia acilada. Posteriormente, utilizando como base o isolado obtido no estudo anterior, Wang et al. (2012) realizaram um estudo amplo, visando catalogar a presença de lactonases por todo o gênero *Microbacterium*, bem como a ação degradante sobre as AHLs C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C10-HSL e 3-oxo-C10-HSL, obtendo 26 isolados de diferentes espécies. Dentre eles, um isolado de *M. oxydans* obtido de amostras de ar foi capaz de degradar 3-oxo-C6-HSL, C10-HSL e 3-oxo-C10-HSL, as duas últimas com intensidade superior. Além dela, *M. liquefaciens*, obtida a partir de uma amostra de leite, apresentou capacidade de inibição das mesmas AHLs, mas com menor intensidade. Os autores demonstraram que a ação das lactonases presentes em *Microbacterium* possui maior afinidade com AHLs de cadeias mais longas e com substituições oxo, embora maiores detalhes de sua estrutura que possa indicar tal comportamento não foram elucidados.

Esses resultados corroboram com os obtidos para os isolados encontrados. A relactonização do sobrenadante reforça a possibilidade do isolado se usar de lactonases para a inibição, e, em especial nos isolados M1 e M3, a preferência por moléculas maiores e com substituição oxo se tornam evidentes. No caso de M2, é possível que a ausência de inibição em C6-HSL se deva à menor concentração de AHLs utilizada neste trabalho, se comparado aos autores mencionados previamente. Por outro lado, a ação observada em M4 não condiz com o comportamento de uma lactonase. Não é de conhecimento do autor estudos que tenham demonstrado a presença de acilases em *Microbacterium maritypicum*, nem sua ação inibitória sobre o *quorum sensing* de bactérias Gram-negativas, podendo este ser o primeiro relato de seu tipo na literatura científica.

Também se encontrou um isolado identificado como *Rothia kristinae*, que inibiu a resposta ao *quorum sensing* por C6-HSL e 3-oxo-C8-HSL, sem que houvesse relactonização, indicando, portanto, uma ação de acilase. Anteriormente conhecido como *Kokuria kristinae* e *Micrococcus kristinae*, esse micro-organismo Gram-positivo é frequentemente encontrado na pele humana, e recentemente foi considerado como possível patógeno em pessoas imunossuprimidas (MA et al., 2005; CHEN et al., 2015; FATAHI-BAFGHI, 2021). Até o presente momento, o autor não conhece nenhum trabalho ou estudo que evidencie qualquer ação de *quorum quenching* por nenhuma bactéria do gênero *Rothia*, podendo este ser o primeiro relato feito.

Por fim, foram obtidos 14 isolados pertencentes à espécie *Enterococcus faecalis*. Estes apresentaram respostas bastante variadas, com dois sendo obtidos apenas partir de C6-HSL, dois obtidos apenas a partir de 3-oxo-C12-HSL e 10 sendo obtidos a partir das duas AHLs utilizadas. Os isolados EF1, EF2, EF3, EF5, EF8, EF9, EF11, EF12, EF13 e EF14 inibiram a comunicação mediada por todas as AHLs empregadas no experimento, e exibiram em todos os casos atividade positiva mediante o teste de relactonação. Os isolados EF4 e EF10 inibiram apenas o *quorum* mediado por C6-HSL, mas responderam positivamente ao teste de relactonação. O isolado EF6 mostrou inibição apenas em 3-oxo-C12-HSL, respondendo negativamente ao teste de relactonação, enquanto EF7 inibiu a comunicação mediada tanto por C6-HSL quanto por 3-oxo-C8-HSL, respondendo positivo à relactonação em ambos os casos.

Bactérias do gênero *Enterococcus* são amplamente estudadas pelas suas relações populacionais mediadas por *quorum sensing*, com destaque especial para seu próprio sistema de comunicação, mediado por peptídeos autoindutores (HAAS, SHEPARD e GILMORE, 2002; ALI et al., 2017; ZHANG et al., 2022; ALI, LÉVESQUE, e NEELAKANTAN, 2022). Quanto à sua capacidade inibitória de sistemas mediados por AHLs por via enzimática, alguns estudos demonstraram a produção de uma lactonase de espectro amplo de ação, encontrada em algumas espécies do gênero. Em um estudo visando elucidar a resistência de determinados isolados de *Enterococcus* a streptogramina, Werner, Klare e Witte (2002) encontraram pela primeira vez um gene em *E. faecium* e *E. faecalis* que codifica a produção de uma lactonase, possivelmente utilizada no combate a este antimicrobiano. Posteriormente, Ham et al., (2018) isolaram a partir de um bioreator de membrana uma cepa de *Enterococcus* com grande atividade de *quorum quenching*. Por meio da ação de uma lactonase, o isolado interrompeu a comunicação em sistemas de *quorum sensing* mediados por C4-HSL, C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C8-HSL e 3-oxo-C12-HSL, obtendo resultados melhores nas AHLs de cadeias aciladas menores. Outros estudos demonstraram a presença de genes codificadores para lactonase em *Enterococcus faecium* bastante semelhantes aos encontrados em membros do gênero *Bacillus*. Em estudo realizado por Vadassery e Pillai (2020), *E. faecium* permitiu um grande controle sobre uma infecção causada por *Aeromonas hydrophila* a partir da inibição de seus fenótipos controlados por *quorum sensing*. A inibição foi devida a uma lactonase, que atuou sobre as

moléculas de C6-HSL presentes no substrato. Novos estudos visam melhor compreender a possibilidade de utilização de *Enterococcus* como bactéria probiótica, e buscam melhor avaliar a ação de sua lactonase sobre a comunicação de diversos micro-organismos (BOOPATHI, SELVAKUMAR e SIVAKUMAR, 2017; LIU et al., 2021).

Tais estudos validam os resultados obtidos com os isolados EF1, EF2, EF3, EF4, EF5, EF7, EF8, EF9, EF10, EF11, EF12, EF13 e EF14. As respostas destes isolados indicam a presença de uma lactonase, como presente na literatura. Nos casos dos isolados EF4, EF7 e EF10, o não impedimento da comunicação por *quorum sensing* pode se dever às concentrações diferentes utilizadas neste estudo em relação a outros, bem como a variações estruturais nas enzimas, tornando sua ação favorecida em alguns substratos em relação a outros.

Já a ação do isolado EF6 apresenta características muito mais semelhantes a uma acilase. Estudos anteriores mostram a produção de algumas acilases por *E. faecalis*, e, embora possuam ação semelhante às acilases de alguns *Staphylococcus*, que por sua vez possuem capacidade inibitória do *quorum sensing* mediado por AHLs, o autor não tem conhecimento de pesquisas que tenham melhor elucidado a capacidade de *quorum quenching* de *E. faecalis* por esse meio (CHAND, RAMASAMY e SURESH, 2016; CHAND et al., 2018). Assim, este trabalho pode ser o primeiro a observar a ação de *quorum quenching* por meio de acilases *E. faecalis*.

5 Conclusão

Os experimentos mostraram que interações populacionais mediadas por *quorum sensing* mediado por AI-1 na microbiota do soro-fermento utilizado na produção do Queijo Canastra são bastante ativas, bem como interações inibitórias dessa comunicação por parte de bactérias Gram-positivas. Também foi mostrado que a presença ou não de moléculas sinalizadoras do *quorum sensing* nesse sistema não está relacionada diretamente à presença exclusiva dessas bactérias na amostra, mas também à ausência de bactérias Gram-positivas com capacidade inibitória desse sistema.

O presente estudo se propôs a melhor elucidar as relações populacionais mediadas por *quorum sensing* na microbiota do soro-fermento do Queijo Canastra. Para atingir seu objetivo, foram produzidas bibliotecas de isolados Gram-negativos e Gram-positivos, além da análise quanto à presença de moléculas indicadoras da comunicação mediada por AHLs.

Ao todo, foram obtidos 39 isolados de bactérias Gram-negativos produtores de AHLs, correspondentes a cinco gêneros, constando seis espécies diferentes. Destes, três tiveram o primeiro relato desse tipo de interação populacional identificada neste presente trabalho, pelo conhecimento do autor. Além disso, 28 isolados Gram-positivos, pertencentes a quatro gêneros e a 8 espécies diferentes foram obtidos, dos quais, pelo conhecimento do autor, um teve a primeira observação da ação de quorum quenching por lactonase neste trabalho, e outros quatro por ação de acilases.

Este trabalho elucidou diversos pontos antes desconhecidos sobre a microbiota desta matriz alimentar tão complexa, ao mesmo tempo em que levanta diversas novas possibilidades de estudos futuros, abrindo as portas para o aprofundamento de diversos pontos observados; como a determinação das AHLs produzidas pelos isolados Gram-negativos obtidos e a determinação dos genes responsáveis pelas enzimas observadas.

Referências

- ADENJII, Adetomiwa A.; BABALOLA, Olubukola O. Evaluation of *Pseudomonas fulva* PS9.1 and *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5 as Candidate Plant Growth Promoters during Maize-Fusarium Interaction. **Plants**, v. 11, n. 324, p. 1–13, 2022.
- ALBERGHINI, L.; TALLONE, G.; GIACCONE, V. Un caso di nuova alterazione cromatica della ricotta. **A.I.V.I.**, v. June, n. 8, 2010.
- ALI, Liaqat; GORAYA, Mohsan Ullah; AJMAL, Muhammad; et al. Molecular Mechanism of *Quorum-Sensing* in *Enterococcus faecalis*: Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18 n. 960, p. 2-19, 2017.
- ALI, Islam. A.A., LÉVESQUE, Celine M., NEELAKANTAN, P. (2022). *Fsr quorum sensing* system modulates the temporal development of *Enterococcus faecalis* biofilm matrix. **Molecular Oral Microbiology**, 37, p. 22– 30.
- ALVES, Levy Anderson César; SOUZA, Rafael Celestino; DA SILVA, Taciana Mara Couto; WATANABE, Andreia; DIAS, Meriellen; MENDES, Maria Anita; CIAMPONI, Ana Lúcia. Identification of microorganisms in biofluids of individuals with periodontitis and chronic kidney disease using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, n. March, p. 1228–1232, 2016.
- AMMOR, Mohammed Salim; MICHAELIDIS, Christos; NYCHAS, George-John E. Insights into the Role of *Quorum Sensing* in Food Spoilage. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 7, p. 1510–1525, 2008.
- ARAGÃO, Bruno Bezerra; TRAJANO, Sabrina. Cândido; DE OLIVEIRA, Raylson Pereira; CARVALHO, Maria da Conceição; DE CARVALHO, Rafaella Grenfell; JULIANO, Maria Aparecida; JUNIOR, José Wilton Pinheiro; MOTA, Rinaldo Aparecido. Occurrence of emerging multiresistant pathogens in the production chain of artisanal goat coalho cheese in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 84, n. February, 2022.
- AYUBA, Rina; UMENO, Daisuke; KAWAI-NOMA, Shigeko. OFF-switching property of *quorum sensor* LuxR via As(III)-induced insoluble form. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 133, n. 4, p. 335–339, 2022. **The Society for Biotechnology, Japan**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.12.013>>.
- BASSLER, Bonnie Lynn; WRIGHT, Miriam; SILVERMAN, Michael R. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 273–286, 1994.
- BERARDI, Alberto; CATTELANI, Chiara; CRETI, Roberta; BERNER, Reinhard; PIETRANGIOLILLO, Zaura; MARGARIT, Immaculada; MAIONE, Domenico; FERRARI, Fabrizio. Group B streptococcal infections in the newborn infant and the

potential value of maternal vaccination. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 13, n. 11, p. 1387–1399, 2015.

BERTANI, Iris; RAMPIONI, Giordano; LEONI, Livia; VENTURI, Vittorio. The *Pseudomonas putida* Lon protease is involved in N -acyl homoserine lactone *quorum sensing* regulation. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 1–8, 2007.

BOKHOVE, Marcel; JIMENEZ, Pol Nadal; QUAX, Wim J.; DIJKSTRA, Bauke W. The *quorum-quenching* N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 2, p. 686–691, 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0911839107>>.

BOOPATHI, Seenivasan; SELVAKUMAR, Gopal; SIVAKUMAR, Natesan. *Quorum quenching* potentials of probiotic *Enterococcus durans* Lab38 against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 4, 2017.

BORELLI, Beatriz M.; FERREIRA, Elaine G.; LACERDA, Inayara C. A.; et al. Enterogenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1-14, 2006.

BORELLI, Beatriz M.; FERREIRA, Elaine G.; LACERDA, Inayara C. A.; et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 1115-1119, 2006.

BOUYAHYA, Abdelhakim; CHAMKHI, Imane; BALAHBIB, Abdelaali; REBEZOV, Maksim; SHARIATI, Mohammad Ali; WILAIRATANA, Polrat; MUBARAK, Mohammad S.; BENALI, Taoufiq Mechanisms, Anti-*Quorum-Sensing* Actions, and Clinical Trials of Medicinal Plant Bioactive Compounds against Bacteria: A Comprehensive Review. **Molecules**, v. 27, n. 1484, 2022.

BRADY, Carrie; CLEENWERCK, Isle; VENTER, Stephanus; COUTINHO, Teresa; DE VOS, P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., . **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 309–319, 2013. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>>.

BROOKS, J. C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J. et al. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, v. 31 n. 1, p. 154-159, 2012.

BUCHAN, Blake W.; RIEBE, Katherine. M.; LEDEBOER, Nathan A. Comparison of the MALDI Biotyper System Using Sepsityper Specimen Processing to Routine Microbiological Methods for Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. Fevereiro, p. 346–352, 2012.

CAMPOS, Gabriela Zampieri, LACORTE, Gustavo Augusto, JURKIEWICZ, Cynthia, HOFFMANN, Christian, LANDGRAF, Mariza, FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo., PINTO, Uelinton Manoel. Microbiological characteristics of Canastra cheese during manufacturing and ripening. **Food Control** 121:107598, 2021.

CÁRCAMO-OYARCE, Gerardo; LUMJIAKTASE, Putthapoom; KUMMERLI, Rolf; EBERL, Leo. Quorum sensing triggers the stochastic escape of individual cells from *Pseudomonas putida* biofilms. **Nature Communications**, v. 6, n. May 2014, 2015.

CASTAÑO, A.; GARCÍA FONTÁN, M. C.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E.; CARBALLO, Javier. Survival of Enterobacteriaceae during processing of Chorizo de cebolla , a Spanish fermented sausage. **Food Control**, v. 13, n. 1, p. 107–115, 2002.

CASTRONOVO, Matteo; RADOVIC, Slobodanka; GRUNWALD, Christian; CASALIS, Loredana; MORGANTE, Michele; SCOLES, Giacinto. Control of Steric Hindrance on Restriction Enzyme Reactions with Surface-Bound DNA Nanostructures. **Nano Letters**, v. 8, n. 12, p. 4140–4145, 2008.

CHAN, Kok-Gan; YIN, Wai-Fong; SAM, Choon-Kook; KOH, Chong-Lek. A novel medium for the isolation of N -acylhomoserine lactone-degrading bacteria. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, p. 247–251, 2009.

CHAN, Kok-Gan.; SULAIMAN, Joanita; YONG, Delicia Ann; TEE, Kok Keng; YIN, Wai-Fong; PRIYA, Kumutha. Draft Genome Perspective of *Staphylococcus saprophyticus* Strain SU8, an N-Acyl Homoserine Lactone-Degrading Bacterium. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. 8–9, 2015.

CHAND, Deepak; PANIGRAHI, Priyabrata; VARSHNEY, Nishantkumar; RAMASAMY, Sureshkumar; SURESH, C. G. Structure and function of a highly active Bile Salt Hydrolase (BSH) from *Enterococcus faecalis* and post-translational processing of BSH enzymes. **BBA - Proteins and Proteomics**, v. 1866, n. 4, p. 507–518, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.01.003>>. .

CHAND, Deepak; RAMASAMY, Sureshkumar; SURESH, C. G. A highly active bile salt hydrolase from *Enterococcus faecalis* shows positive cooperative kinetics. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 263–269, 2016. Elsevier Ltd.

CHAVES-LÓPEZ, C.; DE ANGELIS, M.; MARTUSCELLI, M.; et al. Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe ' s cheese (Pecorino Abruzzese). **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 353–360, 2006.

CHEN, Fang; GAO, Yuxin; CHEN, Xiaoyi; YU, Zhimin; LI, Xianzhen. *Quorum quenching* enzymes and their application in degrading signal molecules to block *quorum sensing*-dependent infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 17477–17500, 2013.

CHEN, Hsin-Mao; CHI, Hsin; CHIU, Nan-Chang; HUANG, Fu-Yuan. ScienceDirect *Kocuria kristinae* : A true pathogen in pediatric patients. *Journal of Microbiology*,

Immunology and Infection, v. 48, n. 1, p. 80–84, 2015. Elsevier Taiwan LLC. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2013.07.001>>.

CHOI, Sung-Chan; ZHANG, Cang; MOON, Sooyoung; OH, Y.-S. Inhibitory Effects of 4-Hydroxy-2, 5-Dimethyl-3 (2H) -Furanone (HDMF) On Acyl-Homoserine Lactone-Mediated Virulence Factor Production and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 734–742, 2014.

CHONG, Teik-Min; TUNG, Hun-Jiat.; YIN, Wai-Fong; CHAN, Kok-Gan. Insights from the Genome Sequence of Quorum-Quenching *Staphylococcus* sp. Strain AL1, Isolated from Traditional Chinese Soy Sauce Brine Fermentation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 23, p. 6611–6612, 2012.

CHRISTIAEN, Steven E. A.; BRACKMAN, Gilles; NELIS, Hans J.; COENYE, Tom. Isolation and identification of bacteria from environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, n. 2, p. 213–219, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.08.002>>.

CHU, Ya-Yun; NEGA, Mukugeta; WÖLFLE, Martina; PLENER, Laure; GROND, Stephanie; JUNG, Kristen; GÖTZ, Friedrich. A New Class of Quorum Quenching Molecules from *Staphylococcus* Species Affects Communication and Growth of Gram-Negative Bacteria. **PLoS Pathogens**, n. September, 2013.

CONROY, Brigid. Investigating the physiological function of a *Staphylococcus aureus* ntn-hydrolase, 2016. **UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA**.

COONEY, S.; O'BRIEN, S.; IVERSEN, C; FANNING, S. Bacteria: Other Pathogenic Enterobacteriaceae – Enterobacter and Other Genera. **Encyclopedia of Food Safety**, p. 433-441, 2014.

DELSHAD, Somayeh Torabi; SOLTANIAN, Siyavash; SHARIFIYAZDI, Hassan; HAGHKHAH, M.; BOSSIER, Peter. Identification of N-acyl homoserine lactone-degrading bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 356–369, 2018.

DICKEY, Seth. W.; CHEUNG, Gordon. Y. C.; OTTO, Michael. Different drugs for bad bugs : antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. **Nature**, v. 16, n. 7, p. 457–471, 2017. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.23>>.

DONG, Yi-Hu; GUSTI, Andi R.; ZHANG, Qiong; XU, Jin-Ling.; ZHANG, Lian-Hui. Identification of Quorum-Quenching N -Acyl Homoserine Lactonases from *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1754–1759, 2002. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/68/4/1754.full.pdf>>.

DONG, Yi-Hu; XU, Jin-Ling; LI, Xian-Zhen; ZHANG, Lian-Hui. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3526–31, 2000. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16273&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>.

DONG, Yi-Hu; WANG, Lian-Hui; XU, Jin-Ling; ZHANG, Hai-Bao; ZHANG, Xi-Fen; ZHANG, Lian-Hui. Quenching *quorum-sensing*- dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. **Nature**, v. 411, n. June, p. 813–817, 2001.

DONG, Yi-hu; ZHANG, Lian-Hui Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. **Journal of Microbiology**, v. 43, n. No. S, p. 101–109, 2005.

DORES, Milene Therezinha das; NOBREGA, Juliana Escarião da; FERREIRA, Célia Lucia de Lucas Fortes. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, n. 1, p. 180–185, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612013000100026&lng=en&nrm=iso&tIng=en>.

EL-AKHDAR, Ibrahim; ELSAKHAWY, Tamer; ABO-KOURA, Hanaa A. Alleviation of Salt Stress on Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Plant Growth Promoting Bacteria strains *Bacillus halotolerans* MSR-H4 and *Lelliottia* Alleviation of Salt Stress on Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Plant Growth Promoting Bacteria strains. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 20, n. 1, 2020.

ELASRI, Miena; DELORME, Sandrine; LEMANCEAU, Philippe; STEWART, Gordon; LAUE, Bridget; GLICKMANN, Eric; OGER, Phil M.; DESSAUX, Yves. Acyl-Homoserine Lactone Production Is More Common among Plant-Associated *Pseudomonas* spp. than among Soilborne *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. Março, p. 1198–1209, 2001.

ENGLISH, Arthur R.; MCBRIDE, Tom J.; HUANG, H. T. Microbial Resistance to Penicillin as Related to Penicillinase or Penicillin Acylase Activity. **P.S.E.B.M**, v. 104, p. 547–549, 1960.

FATAHI-BAFGHI, Mehdi. Characterization of the *Rothia* spp. and their role in human clinical infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 93, n. January, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104877>>.

FERREIRA, Ana Carolina Marques; SILVA, Helisângela de Almeida. Indicadores higiênicos sanitários em queijos do tipo minas frescal na cidade de Uberlândia-MG. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 24, n. 1, p. 103–111, 2021.

FERRAZ, Kamyllé Silva; GONÇALVES, Sara Maria; VALENTINI, Helena Salles; ROCHA, Bernardo Alonso Ribeiro; MONTEIRO, Luanna Jesie Moreira; ALMEIDA, Ana Amélia Paolucci. Evaluation of bromatological parameters in Canastra cheese produced craftly. **Brazilian Journal of Development**, v. 7 n. 6, p. 1-17, 2021.

FETZNER, Susanne. *Quorum quenching* enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 201, n. 2, p. 2–14, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.001>>.

FILHO, Milton de Jesus; KLEIN, Bruna; WAGNER, Roger; GODOY, Helena Teixeira. Key aroma compounds of Canastra cheese: HS-SPME optimization assisted by olfactometry and chemometrics. **Food Research International**, v. 150 n. 1, p. 1-10, 2021.

FINGER, Jessica. A. F. F.; MAFFEI, Daniele F.; DIAS, Meriellen; MENDES, Maria. Anita; PINTO, Uelinton Manoel. Microbiological quality and safety of minimally processed parsley (*Petroselinum crispum*) sold in food markets , southeastern Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 1830, p. 1–9, 2020.

FONG, July; ZHANG, Chaodong; YANG, Renliang; BOO, Zhao Zhi; TAN, Soon Keat; NIELSEN, Thomas E.; GIVSKOV, Michael; LIU, Xue-Wei; SU, Haibin; YANG, Liang. Combination Therapy Strategy of *Quorum Quenching* Enzyme and *Quorum Sensing* Inhibitor in Suppressing Multiple *Quorum Sensing* Pathways of *P. aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19504-w>>.

FUQUA, Clay; WINANS, Stephen C. Conserved cis -Acting Promoter Elements Are Required for Density-Dependent Transcription of *Agrobacterium tumefaciens* Conjugal Transfer Genes. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 2, p. 435–440, 1996.

FUQUA, Clay; WINANS, Stephen C.; GREENBERG, E. Peter. CENSUS AND CONSENSUS IN BACTERIAL ECOSYSTEMS: The LuxR-LuxI Family of *Quorum-Sensing* Transcriptional Regulators. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 727–751, 1996. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.50.1.727>>.

FUQUA, W. Clay.; WINANS, Stephen. C.; GREENBERG, E. Peter. *Quorum Sensing* in Bacteria : the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulatorst. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269–275, 1994.

GAGLIO, Raimondo; TODARO, Massimo; SETTANNI, Luca. Improvement of Raw Milk Cheese Hygiene through the Selection of Starter and Non-Starter Lactic Acid Bacteria: The Successful Case of PDO Pecorino Siciliano Cheese. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 1834 n. 18, p. 1-16, 2021.

GALLOWAY, Warren R. J. D.; HODGKINSON, James T.; BOWDEN, Steven D.; WELCH, Martin; SPRING, David R. *Quorum sensing* in Gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 *quorum sensing* pathways. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 1, p. 28–67, 2011.

GESKE, Grant D.; O'NEILL, Jennifer C.; BLACKWELL, Helen E. Expanding dialogues: From natural autoinducers to non-natural analogues that modulate *quorum sensing* in Gram-negative bacteria. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 7, p. 1432–1447, 2008.

GRAM, Lone; RAVN, Lars; RASCH, Maria; BRUHN, Jesper Bartholin; CHRISTENSEN, Allan B. GIVSKOV, Michael. Food spoilage - interactions between

food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 79–97, 2002.

GÖKMEN, Mukadderat; TEKINSEN, Kemal Kaan; GÜRBÜZ, Ümit. Presence of *Enterobacter sakazakii* in Milk Powder, Whey Powder and White Cheese Produced in Konya. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v. 16, p. 163–166, 2010.

HAAS, Wolfgang.; SHEPARD, Brett.; GILMORE, Michael S. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. **Letters to Nature**, v. 415, n. 1, p. 84-87, 2002.

HAM, So-Young.; KIM, Han-Shin; CHA, Eunji; PARK, Jeong-Hoon; PARK, Hee-Deung Mitigation of membrane biofouling by a *quorum quenching* bacterium for membrane bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 258, n. March, p. 220–226, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.007>>.

HAMMAD, Ahmed M.; ELTAHAN, Amira; HASSAN, Hamdy A.; ABBAS, Nasser H.; et al. Loads of Coliforms and Fecal Coliforms and Characterization of Thermotolerant *Escherichia coli* in Fresh Raw Milk Cheese. **Foods**, v. 332, n. 11, p. 1-12, 2022.

HANKIN, Lester.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597–607, 1975.

HANKIN, Lester.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved Solid Medium for the Detection and Enumeration of Pectolytic Bacteria. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 205–209, 1971.

HAUG, Anna; HOSTMARK, Arne T.; HARSTAD, Odd M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease**, v. 25 n. 6, p. 1-10, 2007.

HAYASHIDA, Yasuo; HATANO, Mayuko; TAMURA, Yoshifumi; KAKIMOTO, Masashi; NISHIMURA, Kenryo; IGOSHI, Keiji; KOBAYASHI, Hiromasa. 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone (HDMF) Production in Simple Media by Lactic Acid Bacterium, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* IFO 3427. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 1, p. 97–99, 2001.

HOLSINGER, V. H.; RAJKOWSKI, K. T.; STABEL, J. R. Milk pasteurization and safety: a brief history and update. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 16 n. 2, p. 441-451, 1997.

HORNG, Yu-Tze; DENG, Su-Chen; DAYKIN, Mavis; SOO, Po-Chi; WEI, Jun-Rong; LUH, Kwen-Tay; HO, Shen-Wu; SWIFT, Simon; LAI, Hsin-Chih; WILLIAMS, Paul. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N⁻-acylhomoserine lactone-dependent *quorum sensing* in *Serratia marcescens*. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1655–1671, 2002.

HOUDT, Rob VAN; GIVSKOV, Michael; MICHIELS, Chris W. *Quorum sensing* in *Serratia*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 2007, p. 407–424, 2007.

INÁCIO, Rita S.; BARROS, Rui; SARAIVA, Jorge; GOMES, Ana M. Optimization of Raw Ewes' Milk High-Pressure Pre-Treatment for Improved Production of Raw Milk Cheese. **Foods**, v. 435, n. 11, p. 1-11, 2022.

KAMIMURA, Bruna A.; CABRAL, Lucélia; NORONHA, Melline F.; et al. Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. **Food Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 1-14, 2020.

KÄMPFER, Peter; GLAESER, Sefanie P.; PACKROFF, Gabriele; BEHRINGER, Katja; EXNER, Martin; CHAKRABORTY, Trinad; SCHMITHAUSEN, Ricarda M.; DOIJAD, Swapnil. *Lelliottia aquatilis* sp. nov., isolated from drinking water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 2454–2461, 2018.

KAUR, Jaskiran; NANDABALAN, Yogalakshmi. Screening of *quorum quenching* activity of the bacteria isolated from dairy industry waste activated sludge. **International Journal of Environmental Science and Technology**, n. 0123456789, 2018. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13762-018-1930-5>>.

KIELISZEK, Marek; POBIEGA, Katarzyna; PIWOWAREK, Kamil; KOT, Anna M. Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. **Molecules**, v. 1858 n. 26, p. 1-15, 2021.

KIM, Jonggun; KIM, Jaepil; KIM, Younghoon; OH, Sangnam; SONG, Minho; CHOE, Jee Hwan; WHANG, Kwang-Youn; KIM, Kwang Hyun; OH, Sejong. Influences of *quorum-quenching* probiotic bacteria on the gut microbial community and immune function in weaning pigs. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 2, p. 412–422, 2018.

KIM, Yu Kyung.; ROY, Pantu Kumar; ASHRAFUDOULLA, Md; NAHAR, Shamsun; TOUSHIK, Sazzad Hossen; HOSSAIN, Md Iqbal; MIZAN, Md Furkanur Rahaman; PARK, Si Hong; HA, Sang-Do. Antibiofilm effects of quercetin against *Salmonella enterica* biofilm formation and virulence, stress response , and *quorum-sensing* gene expression. **Food Control**, v. 137, n. January, 2022. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108964>>.

KIRAN, G. Seghal; HASSAN, Saqib; SAJAYAN, Arya; SELVIN, Joseph. *Quorum Quenching* Compounds from Natural Sources. **Bioresources and Bioprocess in Biotechnology**, v. 30, n. 05, p. 351–364, 2017.

KLEEREBEZEM, Michiel; QUADRI, Luis. E. N.; KUIPERS, Oscar P.; DE VOS, Willem M. *Quorum sensing* by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 895–904, 1997.

KLOEPPER, Joseph W.; MCINROY, John A.; LIU, Ke; HU, Chia-Hui. Symptoms of Fern Distortion Syndrome Resulting from Inoculation with Opportunistic Endophytic Fluorescent *Pseudomonas* spp. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

KOSTYLEV, Maxim; KIM, Daniel Y.; SMALLEY, Nicole E.; SALUKHE, Indraneel; GREENBERG, E. Peter; DANDEKAR, Ajai. A.. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. **PNAS**, v. 116, n. 14, p. 7027–7032, 2019.

KWON, Eun Ah; KIM, Myunghee Isolation of *Hafnia Species* from Kimchi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. October 2008, p. 78–82, 2008.

LACORTE, Gustavo Augusto; CRUVINEL, Letícia Aparecida; AVILA, Marcelo de Paula; DIAS, Marcela França; PEREIRA, Alcilene de Abreu; NASCIMENTO, Andréa Maria Amaral; FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo. Investigating the influence of Food Safety Management Systems (FSMS) on microbial diversity of Canastra cheeses and their processing environments. **Food Microbiology**, v. 105, n. October 2021, 2022.

LAMERS, Ryan P.; MUTHUKRISHNAN, Gowrishankar; CASTOE, Todd A.; TAFUR, Sergio; COLE, Alexander M.; PARKINSON, Christopher L.. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, n. 171, p. 1, 2012. **BMC Evolutionary Biology**. Disponível em: <BMC Evolutionary Biology>.

LASARRE, Breah; FEDERLE, Michael J. Exploiting *Quorum Sensing* To Confuse Bacterial Pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 73–111, 2013.

LAU, Yin Yin; SULAIMAN, Joanita.; CHEN, Jian Woon; YIN, Wai-Fong; CHAN, Kok-Gan. *Quorum Sensing* Activity of *Enterobacter asburiae* Isolated from Lettuce Leaves. **Sensors**, v. 13, n. 1, p. 14189–14199, 2013.

LAZAR, Veronica.; HOLBAN, Alina Maria; CURUTIU, Carmen; CHIFIRIUC, Mariana Carmen. Modulation of *Quorum Sensing* and Biofilms in Less Investigated Gram-Negative ESKAPE Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. July, p. 1–18, 2021.

LEADBETTER, J. R.; GREENBERG, E. P. Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone *Quorum-Sensing* Signals by *Variovorax paradoxus*. Downloaded from <http://jb.asm.org/> on September 2, 2012 by NANYANG T. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 24, p. 6921–6926, 2000.

LEAL-NEGREDO, Álvaro; CASTELLÓ-ABIETAR, Cristian; LEIVA, Pilar S.; FERNÁNDEZ, Javier. Infección urinaria por *Lelliottia amnigena* (*Enterobacter amnigenus*): un patógeno infrecuente. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 30, n. 6, p. 483–484, 2017.

LEGRAND, Romain; LUCAS, Nicolas; DOMINIQUE, Manon; Azhar, Saida; DEROISSART, Camille; SOLLIEC, Marie-Anne Le; RONDEAUX, Julie; NOBIS, Séverine; GUÉRIN, Charlène; LÉON, Fatima. DO REGO, JEAN-CLAUDE; PONS, Nicolas; LE CHATELIER, EMMANUELLE; EHRlich, S. Dusko; DÉCHELOTTE, Pierre; FETISSOV, Sergueï O. Commensal *Hafnia alvei* strain reduces food intake and fat mass in obese mice — a new potential probiotic for appetite and body weight

management. **International Journal of Obesity**, v. 44, n. janeiro, p. 1041–1051, 2020. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41366-019-0515-9>>.

LEITE, M.O.; PINHEIRO, A.J.R.; CHAVES, A.H. et al. Isolamento e identificação de bactérias lácticas de soro de queijo da região do Serro, Minas Gerais. In: **CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS**, 13., 1995, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: Inst. Cândido Tostes, 1995. p.121-125.

LI, Lu; FENG, Lei; ZHANG, Ming.; HE, Xin; LUAN, Shengqiao; WANG, Chao; JAMES, Tony D.; ZHANG, Houli; HUANG, Huilian; MA, Xiaochi. Visualization of penicillin G acylase in bacteria and high-throughput screening of natural inhibitors using a ratiometric fluorescent probe. **ChemComm**, v. 56, n. 34, 2020.

LI, Shuangjia; WU, Shijun; REN, Yixuan; MENG, Qiu; YIN, Jianhua; YU, Zhiliang. Biochemical and Biophysical Research Communications Characterization of differentiated autoregulation of LuxI / LuxR-type *quorum sensing* system in *Pseudoalteromonas*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 590, n. dezembro, p. 177–183, 2022. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.107>>.

LI, Tingting; MEI, Yongchao; HE, Binbin; SUN, Xiaojia; LI, Jianrong. Reducing *Quorum Sensing*-Mediated Virulence Factor Expression and Biofilm Formation in *Hafnia alvei* by Using the Potential *Quorum Sensing* Inhibitor L-Carvone. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. January, p. 1–11, 2019.

LI, Yingying; HU, Yang; CHEN, Tao; CHEN, Yan; LI, Yi; ZHOU, Haibo; YANG, Danting. Talanta Advanced detection and sensing strategies of *Pseudomonas aeruginosa* and *quorum sensing* biomarkers: A review. **Talanta**, v. 240, n. janeiro, 2022.

LIAO, Yu-Chieh; LIN, Hsin-Hsung; SABHARWAL, Amarpreet; HAASE, Elaine M.; SCANNAPIECO, Frank A. MyPro : A seamless pipeline for automated prokaryotic genome assembly and annotation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 113, n. 1, p. 72–74, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.04.006>>.

LIMA, E.M.F., QUECÁN, B.X.V., CUNHA, L.R., FRANCO, B.D.G.M., PINTO, U.M. “Cell-cell communication in lactic acid bacteria,” in *Lactic Acid Bacteria – A Functional Approach*. eds. M. A. C. ALBUQUERQUE, A. M. LEBLANC, J. G. LEBLANC and R. BEDANI (Boca Raton: **CRC Press**), 1–14, 2020.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266–272, 2009.

LIN, Y.; XU, J.; HU, J.; et al. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of *quorum-quenching* enzymes. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 849–860, 2003.

LINTHORNE, J. S.; CHANG, B. J.; FLEMATTI, G. R.; GHISALBERTI, E. L.; SUTTON, D. C. A Direct Pre-screen for Marine Bacteria Producing Compounds Inhibiting *Quorum Sensing* Reveals Diverse Planktonic Bacteria that are Bioactive. **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 33–42, 2015.

LIU, D.; MOMB, J.; THOMAS, P. W.; et al. Mechanism of the *Quorum-Quenching* Lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-Bound Structures. **Biochemistry**, v. 47, p. 7706–7714, 2008. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/bi8003704>>.

LIU, Q.; REN, J.; LU, Y.; et al. A review of the current in-situ fouling control strategies in MBR: Biological versus physicochemical. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 98, p. 42–59, 2021. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.03.042>>.

LOBACZ, Adriana; ZULEWSKA, Justyna. Fate of *Salmonella* spp. in the Fresh Soft Raw Milk Cheese during Storage at Different Temperatures. **Microorganisms**, v. 938 n. 9, p. 1-14, 2021.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., et al.: **Molecular Cell Biology**, 4th edn. W.H. Freeman, New York (2000).

LU, L.; HUME, M. E.; PILLAI, S. D. Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with food additives. **Journal of food protection**, v. 67, n. 7, p. 1457–62, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15270501>>.

LU, X.; YUAN, Y.; XUE, X. L.; ZHANG, G. P.; ZHOU, S. N. Identification of the critical role of Tyr-194 in the catalytic activity of a novel N-acyl-homoserine lactonase from marine *Bacillus cereus* strain Y2. **Current Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 346–350, 2006.

LUCEY, John A. Raw milk consumption. **Nutrition Today**, v. 50 n. 4, p. 189-193, 2015.

MA, E. S. K.; WONG, C. L. P.; LAI, K. T. W.; et al. *Kocuria kristinae* infection associated with acute cholecystitis. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n. 60, p. 3–5, 2005.

MANTHANI, Vyshnavi; KEERTHI, Srikanth; RAO, Prabha. Study on Enumeration of Microflora of Kefir Grains and Kefir Prepared from Cow Milk and Goat Milk. **Innovations in Microbiology and Biotechnology** Vol. 4, [S. l.], p. 99–103, 2022. DOI: 10.9734/bpi/imb/v4/2644C. Disponível em: <https://stm.bookpi.org/IMB-V4/article/view/6229>.

MARTIN, N. H.; MURPHY, S. C.; RALYEA, R. D.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 3176–3183, 2011. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4312>>.

MARTINS, M. L.; PINTO, U. M.; RIEDEL, K.; et al. Lack of AHL-based *quorum sensing* in *Pseudomonas fluorescens* isolated from milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 1039–1046, 2014.

MARTINS, M.L., Pinto, U.M., Riedel, K., Vanetti, M.C.D. *Quorum Sensing* and Spoilage Potential of Psychrotrophic Enterobacteriaceae Isolated from Milk. **BioMed Research International**, vol. 2018, Article ID 2723157, 2018.

MARTINS, Maurilio Lopes; PINTO, Uelinton Manoel; RIEDEL, Katharina; VANETTI. *Quorum Sensing* and Spoilage Potential of Psychrotrophic Enterobacteriaceae Isolated from Milk. **BioMed Research International**, v. 2018 n. 1, p. 1-13, 2018.

MAYER, C.; MURAS, A.; ROMERO, M.; et al. Multiple *Quorum Quenching* Enzymes Are Active in the Nosocomial Pathogen *Acinetobacter baumannii* ATCC17978. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. September, p. 1–16, 2018.

MCCLEAN, K. H.; WINSON, M. K.; FISH, L.; et al. *Quorum sensing* and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 3703–3711, 1997.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. *Quorum Sensing* in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165–199, 2001. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.55.1.165>>.

MLADENOVIC, K. G.; MURUZOVIC, M. Z.; COMIC, L. R. The effects of environmental factors on planktonic growth and biofilm formation of *Serratia odorifera* and *Serratia marcescens* isolated from traditionally made cheese. **Acta Alimentaria**, v. 47, n. 3, p. 370–378, 2018.

MLADENOVIC, K. G.; MURUZOVIC, M. Z.; PETROVIC, T. Z.; STEFANOVIC, O. D.; COMIC, L. R. Isolation and identification of Enterobacteriaceae from traditional Serbian cheese and their physiological characteristics. **Journal of Food Safety**, v. 2007, n. May, p. 1–9, 2017.

MLADENOVIC, K. G.; GRUJOVIC, M.Z.; KIS, M.; et al. Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105 n. 1, p. 1-16, 2021.

MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; et al. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 136–154, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>>.

MORÉ, M. I.; FINGER, L. D.; STRYKER, J. L.; et al. Enzymatic synthesis of a *quorum-sensing* autoinducer through use of defined substrates. **Science**, v. 272, n. 5268, p. 1655–1658, 1996.

MORIKAWA, K.; HIDAKA, T.; MURAKAMI, H.; HAYASHI, H.; OHTA, T. Staphylococcal Drp35 is the functional counterpart of the eukaryotic PONs. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, p. 185–190, 2005.

MOROHOSHI, T.; KAMIMURA, Y.; SOMEYA, N. Identification and Characterization of *Quorum-Quenching* Activity of N-Acylhomoserine Lactonase from Coagulase-Negative Staphylococci. **Antibiotics**, v. 9, n. 483, p. 1–10, 2020.

MOUNIER, J.; MONNET, C.; VALLAEYS, T.; et al. Microbial Interactions within a Cheese **Microbial Community**. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 172–181, 2008.

MUKHERJI, R.; PRABHUNE, A. Possible Correlation Between Bile Salt Hydrolysis and AHL Deamidation : *Staphylococcus epidermidis* RM1 , a Potent *Quorum Quencher* and Bile Salt Hydrolase Producer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 1, p. 140–150, 2015.

MURUGAYAH, S. A.; GERTH, M. L. Engineering *quorum quenching* enzymes : progress and perspectives. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. February, p. 793–800, 2019.

DO NASCIMENTO, E. C.; SABINO, M. C.; CORGUINHA, L. DA R.; et al. Lytic bacteriophages UFJF _ PfDIW6 and UFJF _ PfSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth in vitro and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage. **Food Microbiology**, v. 101, n. May 2021, 2021.

NASROLLAHZADEH, Ahmad; MOKHTARI, Samira; KHOMEIRI, Morteza; SARIS, Per E. J. Antifungal Preservation of Food by Lactic Acid Bacteria. **Foods**, v. 395 n. 11, p. 1-18, 2022.

NHAN, D. T.; CAM, D. T. V; WILLE, M.; et al. *Quorum quenching* bacteria protect *Macrobrachium rosenbergii* larvae from *Vibrio harveyi* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 1007–1016, 2010.

NÓBREGA, J. E. DA. Caracterização Do Fermento Endógeno Utilizado Na Fabricação Do Queijo Canastra No Município De Medeiros , Minas. 2007.

NOGUEIRA, Thayane Sabino; LACORTE, Gustavo Augusto; PACIULLI, Sônia Duque de Oliveira; RODRIGUES, Jéssica Ferreira. Different types of packaging influence sensory profile of Canastra artisanal cheese. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 28 n. 1, p. 1-7, 2021.

O'LOUGHLIN, C. T.; MILLER, L. C.; SIRYAPORN, A.; et al. A *quorum-sensing* inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. **PNAS**, v. 110, n. 44, p. 17981–17986, 2013.

OSEI, R.; YANG, C.; CUI, L.; et al. Microbial Pathogenesis Isolation , identification , and pathogenicity of *Lelliottia amnigena* causing soft rot of potato tuber in China. **Microbial Pathogenesis**, v. 164, n. December 2021, p. 1–6, 2022. Elsevier Ltd.

OZTURKOGLU-BUDAK, S.; DE VRIES, R. P. Mold-ripened and raw milk cheeses: Production, risks, and benefits to human health. **Dairy in Human Health and Disease across the Lifespan**. p.353–361, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809868-4.00027-3>>.

PACHLOVÁ, V.; BUNKA, F.; BUNKOVÁ, L.; et al. Biogenic amines and their producers in Akawi white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 1, p. 1–7, 2012.

PALUCH, E.; REWAK-SOROCZYNSKA, J.; JEDRUSIK, I.; MAZURKIEWICZ, E.; JERMAKOW, K. Prevention of biofilm formation by *quorum quenching*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 1871–1881, 2020.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* signal-response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 576–588, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>>.

PARK, S.; KANG, H.; JANG, H.; LEE, J.; KOO, B. Identification of Extracellular N - Acylhomoserine Lactone Acylase from a *Streptomyces* sp . and Its Application to *Quorum Quenching*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2632–2641, 2005.

PARSEK, M. R.; VAL, D. L.; HANZELKA, B. L.; CRONAN, J. E.; GREENBERG, E. P. Acyl Homoserine-Lactone *Quorum-Sensing* Signal Generation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. May, p. 4360–4365, 1999.

PEARSON, J. P.; PESCI, E. C.; IGLEWSKI, B. H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl Quorum-Sensing* Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 18, p. 5756–5767, 1997.

PHAM, N.-P.; LANDAUD, S.; LIEBEN, P.; BONNARME, P.; MONNET, C. Transcription Profiling Reveals Cooperative Metabolic Interactions in a Microbial Cheese-Ripening Community Composed of *Debaryomyces hansenii* , *Brevibacterium aurantiacum* , and *Hafnia alvei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. August, p. 1–15, 2019.

PINEDA A.P.A., CAMPOS G.Z., PIMENTEL-FILHO N.J., FRANCO B.D.G.M., PINTO U.M. Brazilian Artisanal Cheeses: Diversity, Microbiological Safety, and Challenges for the Sector. **Frontiers in Microbiology** 12:666922, 2021.

PINHEIRO, Julia Silva; SUDRÉ, Bruna; ALEXANDRE, Ana Cláudia; et al. Influence of the starter cultures and ripening on the physicochemical and sensory characteristics of Serro artisanal cheese. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 24 n. 1, p. 1-7, 2021.

PINTO, U. M. *Quorum sensing* em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite. **Universidade Federal de Viçosa**, 2005.

PINTO, U. M.; DE SOUZA VIANA, E.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1322–1327, 2007.

POGACIC, T.; MAILLARD, M.-B.; LECLERC, A.; et al. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. **Food Microbiology**, v. 46, n. agosto, p. 145–153, 2015.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; et al. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 2–3, p. 81–94, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>>.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; et al. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 664–698, 2013.

RAI, N.; RAI, R.; VENKATESH, K. V. *Quorum Sensing Biosensors*. In: V. C. Kalia (Org.); *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*. p.173–183, 2015. **New Delhi: Springer India**. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8_16>.

RAVN, L.; CHRISTENSEN, A. B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; GRAM, L. Methods for detecting AHL produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 239–251, 2001.

RASHTCHI, Parisa; BAZMI, Ali; NOSHIRVANI, Nooshin; MOOSAVY, Mir Hassan. Comparison of the microbial, physicochemical, and sensorial properties of raw and pasteurized Lighvan cheeses during ripening time. **Food Science and Nutrition**, v. 9 n. 1, p. 5527-5535, 2021.

READING, N. C.; SPERANDIO, V. *Quorum sensing: the many languages of bacteria*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 1–11, 2005.

REINA, José Carlos; PÉREZ, Pedro; LLAMAS, Inmaculada. *Quorum Quenching Strains Isolated from the Microbiota of Sea Anemones and Holothurians Attenuate *Vibrio coralliilyticus* Virulence Factors and Reduce Mortality in *Artemia salina**. **Microorganisms**, v. 631 n. 10, p. 1-15, 2022.

REKHA, P. D.; YOUNG, C.-C.; ARUN, A. B. Identification of N-acyl-L-homoserine lactones produced by non-pigmented *Chromobacterium aquaticum* CC-SEYA-1T and pigmented *Chromobacterium subtsugae* PRAA4-1T. **3 Biotech**, v. 1, n. 4, p. 239–245, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13205-011-0029-1>>.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P.; et al. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: Influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidolácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, 2011.

REZZONICO, F.; SMITS, T. H. M.; DUFFY, B. Detection of AI-2 Receptors in Genomes of Enterobacteriaceae Suggests a Role of Type-2 *Quorum Sensing* in Closed Ecosystems. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 1, p. 6645–6665, 2012.

RYU, Du-Hwan; LEE, Sang-Won; MIKOLAITYTE, Viktorija; et al., Identification of a Second Type of AHL-lactonase from *Rhodococcus* sp. BH4, belonging to the α/β Hydrolase Superfamily. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v 28, n 30, p 937-945, 2020.

SANT'ANNA, Felipe Machado de; CARVALHO, Ilhúna Luana Silva; FERREIRA, Fernanda Silva; BORGES, Leonardo. Microbiological Quality of Minas Artisanal Cheeses from Certified Properties at Serra da Canastra Region, Minas Gerais, Brazil in 2016. **Journal of Dairy and Veterinary Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1-3, 2018.

SANTOS, T. S.; CAMPOS, F. B.; PADOVANI, N. F. A.; et al. Assessment of the microbiological quality and safety of minimally processed vegetables sold in Piracicaba, SP - Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 187–194, 2020.

SHARMA, S.; GOPU, V.; SIVASANKAR, C.; SHETTY, P. H. Hydrocinnamic acid produced by *Enterobacter xiangfangensis* impairs AHL-based *quorum sensing* and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 9, n. 1, p. 28678–28687, 2019. Royal Society of Chemistry.

SHASTRY, R. P.; DOLAN, S. K.; ABDELHAMID, Y.; VITTAL, R. R.; WELCH, M. Purification and characterisation of a *quorum quenching* AHL-lactonase from the endophytic bacterium *Enterobacter* sp . CS66. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. March, p. 1–7, 2018.

SHURKI, A.; STRAJBL, M.; VILLA, J.; WARSHEL, A. How Much Do Enzymes Really Gain by Restraining Their Reacting Fragments ? **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 1, p. 4097–4107, 2002.

SIKDAR, R.; ELIAS, M. *Quorum quenching* enzymes and their effects on virulence , biofilm , and microbiomes : a review of recent advances microbiomes: a review of recent advances. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 18, n. 12, p. 1221–1233, 2020. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1794815>>.

SHAW, P. D.; PING, G.; DALY, S. L.; et al. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 12, p. 6036–6041, 1997. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.94.12.6036>>.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. *Quorum sensing* in the context of food microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5473–5482, 2012.

SKINDERSOE, M. E.; ALHEDE, M.; PHIPPS, R.; et al. Effects of Antibiotics on *Quorum Sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3648–3663, 2008.

SONG, M.; YUN, B.; MOON, J.-H.; et al. Characterization of Selected *Lactobacillus* Strains for Use as Probiotics. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 4, p. 551–556, 2015. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=CSSPBQ&py=2015&vnc=v35n4&sp=551>>.

STARK, J. First case of non-traumatic community-acquired *Pseudomonas fulva* infection. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 21, n. December, p. 17–18, 2021. **Indian Association of Medical Microbiologists**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2021.12.010>>.

STEIDLE, A.; ALLESEN-HOLM, M.; RIEDEL, K.; et al. Identification and Characterization of an N -Acylhomoserine Lactone-Dependent *Quorum-Sensing* System in *Pseudomonas putida* Strain IsoF. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6371–6382, 2002.

TABLA, R.; GÓMEZ, A.; SIMANCAS, A.; et al. Enterobacteriaceae species during manufacturing and ripening of semi – hard and soft raw ewe’s milk cheese : Gas production capacity. **Small Ruminant Research**, v. 145, n. 1, p. 123–129, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.11.008>>.

TAMAGNINI, L. M.; DE SOUSA, G. B.; GONZÁLEZ, R. D.; BUDDE, C. E. Behavior of *Enterobacter amnigenus* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat’s cheese: Influence of fluctuating storage temperature. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1, p. 177–182, 2008.

TAN, J.-Y.; YIN, W.-F.; CHAN, K.-G. Quorum Sensing Activity of *Hafnia alvei* Isolated from Packed Food. **Sensors (Switzerland)**, v. 14, n. 1, p. 6788–6796, 2014.

TANAKA, Y.; MORIKAWA, K.; OHKI, Y.; et al. Structural and Mutational Analyses of Drp35 from *Staphylococcus aureus*: A possible mechanism for its lactonase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 8, p. 5770–5780, 2007. © 2007 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M607340200>>.

TAY, S. B.; YEW, W. S. Development of Quorum-Based Anti-Virulence Therapeutics Targeting Gram-Negative Bacterial Pathogens. **International Journal of Mole**, v. 14, n. 1, p. 16570–16599, 2013.

TEMBHURKAR, V.; PATIL, A.; CHAUDHARI, C.; KULKARNI, M.; HARKE, S. Penicillin Acylase Production By *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus* spp . Isolated from Soda Lake. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 296–301, 2012.

TORNADIJO, M. E.; GARCÍA, M. C.; FRESNO, J. M.; CARBALLO, J. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese. **Food Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 499–509, 2001.

TRMČIĆ, A. CHAUHAN, K.; KENT, D.J.; et al. Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6105-6120, 2016.

UROZ, S.; CHHABRA, S. R.; CÁMARA, M.; et al. N-acylhomoserine lactone *quorum-sensing* molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. **Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 3313–3322, 2005.

VADASSERY, D. H.; PILLAI, D. Quorum quenching potential of *Enterococcus faecium* QQ12 isolated from gastrointestinal tract of *Oreochromis niloticus* and its application as a probiotic for the control of *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus 1758). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1333–1343, 2020.

VALDÉZ, J. C.; PERAL, M. C.; RACHID, M.; SANTANA, M.; PERDIGÓN, G. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: The potential use of probiotics in wound treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 6, p. 472–479, 2005.

VENTURI, V. Regulation of *quorum sensing* in *Pseudomonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 30, n. 1, p. 274–291, 2006.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY-CRUCHAUDET, C.; BAVAI, C; et al. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105 n. 1, p. 83-88, 2005.

VINOT, N.; BAGHTCHEDJIAN, E.; PICOLO, C.; LAMBERT, G. 'The Potential of Precision Probiotic *Hafnia alvei* HA4597 to Support Weight Loss. 2022.

WAN-AZEMIN, A.; ALIAS, N.; KARI, A. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Dorper Sheep Milk with Subclinical-mastitis Infection by Uniplex PCR using 16S rRNA , *lasIR* , *gyrB* and *ecfX* Genes. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 18, n. 1, p. 30–42, 2022.

WANG, W.-Z.; MOROHOSHI, T.; SOMEYA, N.; IKEDA, T. Diversity and Distribution of N -Acylhomoserine Lactone (AHL) -Degrading Activity and AHL-Lactonase (AiiM) in Genus *Microbacterium*. **Microbes and Environments**, v. 27, n. 3, p. 330–333, 2012.

WANG, W.; MOROHOSHI, T.; IKENOYA, M.; SOMEYA, N.; IKEDA, T. AiiM , a Novel Class of N -Acylhomoserine Lactonase from the Leaf-Associated Bacterium *Microbacterium testaceum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2524–2530, 2010.

WANG, Yong-Chao; WANG, Can; HAN, Meng-Fei; et al. Reduction of biofilm adhesion strength by adjusting the characteristics of biofilms through enzymatic *quorum quenching*. **Chemosphere**, v. 228 n. 1, p. 1-7, 2021.

WEISBECKER, Andy A legal history of raw milk in the United States. **Legal Briefs**, v. 69 n. 8, p. 62-63, 2007.

WERNER, G.; KLARE, I.; WITTE, W. Molecular analysis of streptogramin resistance in enterococci. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 2, p. 81–94, 2002. Urban & Fischer Verlag. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1078/1438-4221-00194>>.

WINSON, M. K.; SWIFT, S.; FISH, L.; et al. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N -acyl homoserine lactone-mediated *quorum sensing*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, p. 185–192, 1998.

WOUTERS, J. T. M.; AYAD, E. H. E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2–3, p. 91–109, 2002.

YAN, C.; LI, X.; ZHANG, G.; et al. *Quorum Sensing*-Mediated and Growth Phase-Dependent Regulation of Metabolic Pathways in *Hafnia alvei* H4. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. March, p. 1–14, 2021.

YAN, S.; WU, G. Can Biofilm Be Reversed Through *Quorum Sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*? **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. July, p. 1–9, 2019.

YANG, L.; YUAN, T.-J.; WAN, Y.; et al. *Quorum sensing*: a new perspective to reveal the interaction between gut microbiota and host. **Future Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 1–14, 2022.

YATES, Edwin A.; PHILIPP, Bodo; BUCKLEY, Catherine; et al. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 70, n 10, p. 5635-5646, 2002

YIN, J.; DENG, Z.; ZHAO, G.; HUANG, X. The N-terminal Nucleophile Serine of Cephalosporin Acylase Executes the Second Autoproteolytic Cleavage and Acylpeptide Hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 27, p. 24476–24486, 2011. © 2011 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.242313>> .

YIN, W.-F.; PURMAL, K.; CHIN, S.; CHAN, X.-Y.; CHAN, K.-G. Long Chain N-acyl Homoserine Lactone Production by *Enterobacter* sp. Isolated from Human Tongue Surfaces. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 1, p. 14307–14314, 2012.

YUK, K.; KIM, Y.; HUH, C.; LEE, J. *Lelliottia jeotgali* sp . nov ., isolated from a traditional Korean fermented clam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 1725–1731, 2018.

YUN, B.; OH, S.; GRIFFITHS, M. W. *Lactobacillus acidophilus* modulates the virulence of *Clostridium difficile*. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 4745–4758, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214003750>>.

ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; PENG, H.; et al. An attempt to stimulate aniline degrading bioreactor by exogenous auto-inducer : Decontamination performance, sludge characteristics, and microbial community structure response. **Bioresource Technology**, v. 347, n. December 2021, p. 126675, 2022. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126675>>.

ZHANG, Yunhe; SHAN, Bo, GONG, Jianshun; Hu, Yongjin. Mechanism of biogenic amine synthesis of *Enterococcus faecium* isolated from Sanchun ham. **Food Science and Nutrition**, v. 1 n. 00, p. 1-14, 2022.

ZHAO, J.; AI, G.; YANG, S.; ZHANG, X.; ZHANG, G. Detection, Structural Elucidation, and Biological Effects of Diverse N -Acyl-homoserine Lactone Signaling Molecules in the Plant- Promoting Endophytic Bacterium *Rhizobium oryzihabitans* M15. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 9693–9705, 2021.

ZHENG, Xiaochun; XU, Xiaoyu; MA, Yanqing; et al. Diversity and potential function of bacterial communities during milk fermentation of Kazak artisanal cheese. **Process Biochemistry**, v. 111, n. 2, p. 191-200, 2021.

ZHU, J.; BEABER, J. W.; MORÉ, M. I.; et al. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 20, p. 5398–5405, 1998.

ZHU, J.; CHAI, Y.; ZHONG, Z.; LI, S.; WINANS, S. C. *Agrobacterium* Bioassay Strain for Ultrasensitive Detection of N -Acylhomoserine Lactone-Type *Quorum-Sensing* Molecules : Detection of Autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6949–6953, 2003.

ZHU, Y. L.; HOU, H. M.; ZHANG, G. L.; WANG, Y. F.; HAO, H. S. AHLs Regulate Biofilm Formation and Swimming Motility of *Hafnia alvei* H4. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. June, p. 1–11, 2019.

ZIELINSKA, K.; MAZURKIEWICZ, R.; SZYMANSKA, K.; et al. Penicillin G acylase-mediated kinetic resolution of racemic 1-(N-acylamino)alkylphosphonic and 1-(N-acylamino) alkylphosphinic acids and their esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, n. 1, p. 31–40, 2016.