

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Cristiane Rodrigues Silva

**MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA A  
ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE QUEIJOS NO BRASIL**

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC MARKERS OF ANTIBIOTIC  
RESISTANCE IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA FROM CHEESE IN BRAZIL**

Rio de Janeiro 2022

Cristiane Rodrigues Silva

**MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA A  
ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE QUEIJOS NO BRASIL**

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC MARKERS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN  
GRAM-NEGATIVE BACTERIA FROM CHEESE IN BRAZIL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.  
Orientador: Prof. Dr. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro 2022

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

R586 Rodrigues Silva, Cristiane  
MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE  
RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS GRAM-  
NEGATIVAS DE QUEIJOS NO BRASIL / Cristiane  
Rodrigues Silva. -- Rio de Janeiro, 2022.  
154

Orientador: Victor Augustus Marin.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do  
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação  
em Alimentos e Nutrição, 2022.

1. Segurança Alimentar. 2. Bactérias Gram-  
negativas. 3. Resistência a antibióticos. 4. Saúde  
Pública. 5. Genes de Resistência. I. Marin, Victor  
Augustus, orient. II. Título.

Cristiane Rodrigues Silva

**MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA A  
ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE QUEIJOS NO BRASIL**

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC MARKERS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN  
GRAM-NEGATIVE BACTERIA FROM CHEESE IN BRAZIL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Victor Augustus Marin

**Aprovado em 13/07/2022**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Victor Augustus Marin  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

---

Dr. Anderson Junger Teodoro  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

---

Dra. Bárbara Cristina Euzebio Pereira Dias de Oliveira  
Instituto Federal do Rio de Janeiro - IFRJ

---

Dra. Thaís Souza Silveira Majerowicz  
Instituto Federal do Rio de Janeiro - IFRJ

---

Dra. Alice Gonçalves Martins Gonzalez  
Universidade Federal Fluminense - UFF





## Folha\_aprovação\_Cristiane Rodrigues Silva

Data e Hora de Criação: 25/07/2022 às 15:49:40

Documentos que originaram esse envelope:

- Folha de aprovação\_TESE Cristiane Rodrigues Silva FINAL.docx (Documento Microsoft Word) - 1 página(s)



### Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 7fd3130e6cbd6958a7deed94773588c971c5aa11d6b5a08884ba9f451e130b14

[SHA512]: 662c564d63ce8f895cbcd442f0d41755332691ce4e1154430bb5724126c15fed79ac75afacbd2af56b8abb6b3822f116a8b1d58f2d989c597e6f938a49dfa678

### Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



#### ASSINADO - Alice Gonçalves Martins Gonzalez (aliceg@id.uff.br)

Data/Hora: 25/07/2022 - 16:30:34, IP: 200.20.0.195

[SHA256]: 12795527897d93c8ef432a71dd808ff14e26ebb6f8b8e0d6c10983462fdc75da



#### ASSINADO - Anderson Junger Teodoro (atteodoro@gmail.com)

Data/Hora: 25/07/2022 - 16:02:50, IP: 200.156.102.49, Geolocalização: [-22.8898, -43.122]

[SHA256]: 015b0f0d32f8fae03285dd5ac855ca1bbae3f96af52d57c2a48f1125db1f7d2f

*Anderson Junger Teodoro*



#### ASSINADO - Bárbara Cristina Euzebio Pereira Dias de Oliveira (barbara.dias@ifrj.edu.br)

Data/Hora: 28/07/2022 - 12:41:48, IP: 177.41.19.175

[SHA256]: 4394fde1ac69c5b7251a90e92a5b9478b94c6da4821492232747938be1b89048



#### ASSINADO - Thais Souza Silveira Majerowicz (thais.silveira@ifrj.edu.br)

Data/Hora: 25/07/2022 - 23:42:09, IP: 177.41.24.83

[SHA256]: 445be1d6a5748ea89b8e475fb02b37d65d59a9967f8e16d8a851492094a6e7ca



#### ASSINADO - Victor Augustus Marin (victor.marin@unirio.br)

Data/Hora: 25/07/2022 - 16:14:46, IP: 179.218.50.125

[SHA256]: e244e1acc621d2dc3f3ad0810883c7cdb58bd335a958fe949eb35ebd47d73c1

*victor augustus marin*

### Histórico de eventos registrados neste envelope

28/07/2022 12:41:48 - Envelope finalizado por barbara.dias@ifrj.edu.br, IP 177.41.19.175

28/07/2022 12:41:48 - Assinatura realizada por barbara.dias@ifrj.edu.br, IP 177.41.19.175

25/07/2022 23:42:09 - Assinatura realizada por thais.silveira@ifrj.edu.br, IP 177.41.24.83

25/07/2022 23:41:06 - Envelope visualizado por thais.silveira@ifrj.edu.br, IP 177.41.24.83

25/07/2022 16:30:34 - Assinatura realizada por aliceg@id.uff.br, IP 200.20.0.195

25/07/2022 16:14:46 - Assinatura realizada por victor.marin@unirio.br, IP 179.218.50.125

25/07/2022 16:14:39 - Envelope visualizado por victor.marin@unirio.br, IP 179.218.50.125

25/07/2022 16:02:50 - Assinatura realizada por atteodoro@gmail.com, IP 200.156.102.49

25/07/2022 15:58:30 - Envelope registrado na Blockchain por ppgan.secretaria@unirio.br, IP 200.156.27.158

25/07/2022 15:58:29 - Envelope encaminhado para assinaturas por ppgan.secretaria@unirio.br, IP 200.156.27.158

25/07/2022 15:49:53 - Envelope criado por ppgan.secretaria@unirio.br, IP 200.156.27.158



Dedico este trabalho a minha avó Zenyr, por sua luta e por todo o seu amor, que me permitiram chegar até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a meu marido Bruno por todo o suporte, amor, paciência e presença constantes.

Agradeço ao meu orientador Victor por acreditar em meu potencial, pela disponibilidade e paciência sem as quais não seria possível desenvolver este trabalho, especialmente no período da Pandemia da covid-19.

Meu agradecimento ao professor Anderson por todo o ensinamento durante a minha trajetória acadêmica.

Ao Rafael Miller por sua valorosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório que dividiram e tornaram minha vida na bancada mais alegre, Fernando, Lana e Joel e aos amigos que de alguma forma me incentivaram a continuar.

À UNIRIO, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, pela oportunidade de realizar este trabalho.

## RESUMO

A resistência a antibióticos é um importante problema de saúde mundial necessitando de ação multissetorial para que seu combate seja efetivo, incluindo a área de alimentos. O queijo é um alimento pronto para consumo e no Brasil, é consumido predominantemente por população vulnerável, os idosos. Esta pesquisa avaliou marcadores de resistência a antibióticos em queijos produzidos no Brasil. Vinte amostras de queijo foram analisadas entre os tipos parmesão, prato, minas padrão, cottage e a ricota. A metodologia investigou o conjunto de bactérias Gram-negativas viáveis presentes nesses queijos. A pesquisa identificou 8 entre 20 diferentes genes de resistência, sendo os genes *ctx*, *tem* e *shv* que codificam enzimas com ação em beta-lactâmicos, gene *oxa-48* em carbapenêmico, genes *tetA* e *tetB* em tetraciclinas, e dois sistemas genéticos, os integrons 1 e 2 que podem abrigar genes para resistência a diversos antibióticos e são importantes propagadores de resistência. Destaque para as bactérias isoladas da ricota apresentando 7 dos genes pesquisados. Embora características específicas de cada tipo de queijo possam ter influenciado os resultados, o conjunto dos dados indica que a resistência apresentada é de causa multifatorial e também influenciada por fatores externos a características específicas de cada queijo, como as condições higiênico-sanitárias em que foi produzido, armazenado e comercializado, entre outras. A avaliação de queijos permitiu também identificar através de etapa de sequenciamento genético, uma cepa de *Serratia marcescens* que além de abrigar genes de resistência apresentou uma surpreendente diversidade genômica, que permitem uma pluralidade de funções benéficas na indústria de alimentos, cosmética, farmacêutica e principalmente para a promoção de crescimento de plantas.

**Palavras-chave:** alimento, queijo, segurança alimentar, bactérias Gram-negativas, resistência, antibiótico, saúde pública, genes de resistência, qualidade dos alimentos.

## ABSTRACT

### PHENOTYPIC AND GENOTYPIC MARKERS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA FROM CHEESE IN BRAZIL

Antibiotic resistance is an important global health problem requiring multisectoral action to combat it effectively, including the food sector. Cheese is a ready-to-eat food and in Brazil, it is consumed predominantly by the vulnerable population, the elderly. This research evaluated antibiotic resistance markers in cheese produced in Brazil. Twenty samples of cheese were analyzed from the types of parmesan, prato, minas padrão, cottage, and ricotta. The methodology investigated the set of viable Gram-negative bacteria present in these cheeses. The research identified 8 among 20 different resistance genes, being the *ctx*, *tem*, and *shv* genes that encodes enzymes with action on beta-lactams, *oxa-48* gene on carbapenem, *tetA* and *tetB* genes on tetracyclines, and two genetic systems, integrons 1 and 2 that can harbor genes for resistance to several antibiotics and are important propagators of resistance. Highlight the bacteria isolated from ricotta that presents 7 of the researched genes. Although specific characteristics of each type of cheese may have influenced the results, the data set indicates that the resistance presented has a multifactorial cause and is also influenced by factors external to the specific characteristics of each cheese, such as the hygienic-sanitary conditions in which it was produced, stored and commercialized, among others. The evaluation of cheeses also made it possible to identify, through a genetic sequencing step, a strain of *Serratia marcescens* that, in addition to harboring resistance genes, presented a surprising genomic diversity, which allows a plurality of beneficial functions in the food, cosmetic, pharmaceutical industry and especially in promoting plant growth.

**Keywords:** food, cheese, food safety, Gram-negative bacteria, resistance, antibiotic, public health, resistance genes, food quality.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. GEL DE ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR MULTIPLEX *SHV*, *TEM* E *OXA*

40

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. PERCENTUAL DE ORIGEM POR ESTADO DOS 20 QUEIJOS ANALISADOS	38
GRÁFICO 2. GENES DE RESISTÊNCIA IDENTIFICADOS EM QUEIJO PARMESÃO	41
GRÁFICO 3. GENES DE RESISTÊNCIA IDENTIFICADOS EM QUEIJO PRATO	41
GRÁFICO 4. GENES DE RESISTÊNCIA IDENTIFICADOS EM QUEIJO MINAS PADRÃO	42
GRÁFICO 5. GENES DE RESISTÊNCIA IDENTIFICADOS EM RICOTA	42
GRÁFICO 6. GENES DE RESISTÊNCIA IDENTIFICADOS EM QUEIJO COTTAGE	43
GRÁFICO 7. QUANTIDADE TOTAL DE AMPLICONS DE GENES DE RESISTÊNCIA ENCONTRADOS NAS MGNs RESISTENTES E INTERMEDIÁRIAS	43
GRÁFICO 8. QUANTIDADE TOTAL DE AMPLICONS DE GENES DE RESISTÊNCIA POR TIPO DE QUEIJO	44

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. LEGISLAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE UMIDADE DOS QUEIJOS SELECIONADOS PARA ANÁLISE	16
TABELA 2. COMPARATIVO DE DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE CADA QUEIJO	18
TABELA 3. RESUMO DA CONCENTRAÇÃO DOS DISCOS DE ANTIBIÓTICOS E DAS ZONAS DE INIBIÇÃO CARACTERÍSTICAS DA FAMÍLIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	33
TABELA 4. SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS, TAMANHO DOS GENES E REFERÊNCIAS	34
TABELA 5. PRIMER PARA IDENTIFICAÇÃO DA FAMÍLIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> COM SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS, TAMANHO DO GENE E REFERÊNCIA	36
TABELA 6. RESISTÊNCIA FENOTÍPICA DAS 220 MGNs DISTRIBUÍDAS ENTRE RESISTENTES, INTERMEDIÁRIAS E SENSÍVEIS INCLUINDO ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLACA	39
TABELA 7. GENES DE RESISTÊNCIA DISTRIBUÍDOS NAS MGNs RESISTENTES E INTERMEDIÁRIAS	45
TABELA 8. GENES ENVOLVIDOS EM PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS	46
TABELA 9. GENES RESPONSÁVEIS POR ATIVIDADE NEMATICIDA E LARVICIDA	48
TABELA 10. GENES DE METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS	49
TABELA 11. GENES RESPONSÁVEIS POR RESISTÊNCIA A METAIS E ANTIBIÓTICOS	50
TABELA 12. GENES ENVOLVIDOS EM ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS OU ENZIMAS IMPORTANTES PARA A INDÚSTRIA	51

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS LÁCTEOS NO BRASIL	13
1.2	QUEIJOS: CARACTERÍSTICAS	14
1.3	QUEIJOS: PROCESSO PRODUTIVO	16
1.4	BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO	19
1.5	SEGURANÇA ALIMENTAR E DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	20
1.6	ANTIBIÓTICOS E MECANISMOS DE AÇÃO	21
1.7	RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS	22
1.7.1	<i>Mecanismos de resistência</i>	22
1.7.2	<i>Genes de resistência</i>	23
1.8	RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM LEITE E DERIVADOS	25
1.9	BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1	AMOSTRAGEM	29
3.2	MÉTODO DE PRÉ SELEÇÃO	29
3.3	AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA	30
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA	31
3.5	IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA	31
3.6	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	34
3.7	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	34
3.8	BIOINFORMÁTICA	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
4.1	AMOSTRAGEM	36
4.2	RESISTÊNCIA FENOTÍPICA	36
4.3	RESISTÊNCIA GENOTÍPICA	38
4.4	FAMÍLIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	43
4.5	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	45
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
5.1	AMOSTRAGEM E CONSUMIDOR	52
5.2	ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO	54
5.3	RESISTÊNCIA FENOTÍPICA – VISÃO GERAL	55
5.4	RESISTÊNCIA GENOTÍPICA – VISÃO GERAL	57

5.4.1	<i>Plataforma Genética – Integrons</i> .....	58
5.4.2	<i>Genes de Resistência a tetraciclina</i> .....	60
5.4.3	<i>Genes produtores de beta-lactamases</i> .....	61
<b>5.5</b>	<b>RESISTÊNCIA FENOTÍPICA E GENOTÍPICA POR TIPO DE QUEIJO</b> .....	<b>64</b>
5.5.1	<i>Queijo Parmesão</i> .....	64
5.5.2	<i>Queijo Prato</i> .....	67
5.5.3	<i>Queijo Minas Padrão</i> .....	68
5.5.4	<i>Ricota</i> .....	70
5.5.5	<i>Queijo Cottage</i> .....	72
<b>5.6</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>73</b>
<b>5.7</b>	<b>SEQUENCIAMENTO</b> .....	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>83</b>
	<b>APÊNDICE A - GENOMIC ANALYSIS AND PLANT GROWTH-PROMOTING POTENTIAL OF A SERRATIA MARCESCENS ISOLATED FROM FOOD</b> .....	<b>100</b>
	<b>APÊNDICE B - RESISTOME IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA FROM SOFT CHEESE IN BRAZIL</b> .....	<b>134</b>

## **LISTA DE SIGLAS**

**BPCP** - Bactéria promotora de crescimento de plantas

**BPCPs** - Bactérias promotora de crescimento de plantas

**GR** – gene de resistência

**GRs** – genes de resistência

**MGN** – Microbiota Gram-negativa

**MGNs** - Microbiotas Gram-negativas

**QMP** – Queijo minas padrão

**QCtg** – Queijo cottage

**QPrt** – Queijo prato

**QPms** – Queijo parmesão

**RA** – resistência a antibióticos

**Ret**– ricota

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS LÁCTEOS NO BRASIL

O Brasil alcançou uma produção de leite em 2021, de aproximadamente 25 milhões de toneladas (USDA, 2021), sendo destaque no setor de lácteos como 4º maior produtor do mundo, composto pelos segmentos produtores de leite e seus derivados. A produção de leite está presente em todo o território nacional e em mais de 99% dos municípios brasileiros (FGV, 2019).

Os queijos se destacam dentre a produção de laticínios constituindo 50,8% do total de produção e movimentando cerca de R\$ 28 bilhões anuais, seguidos de setores como o leite em pó (11%), creme de leite (3,9%) e manteiga (2,1%) que juntos somam cerca de R\$ 10 bilhões. Ademais, estimativas baseadas em fontes comerciais e pesquisas de associações setoriais, indicam que a produção de queijos em 2021 foi estimada em 790 mil toneladas (USDA, 2021), atualmente o Brasil ocupa o quinto lugar mundial na produção de queijos (EMBRAPA, 2021).

O mercado consumidor brasileiro ainda depende de importações de queijo, mesmo com uma produção crescente desde a década de 1990 (FGV, 2019). Embora o Brasil ainda importe percentual de queijo maior que a exportação, o setor de queijos junto com leite condensado e creme de leite foram os principais produtos exportados pelo Brasil, sendo responsáveis por 83% dos embarques e também de uma receita significativa (EMBRAPA, 2019). A importância econômica também é evidente em estados onde a indústria de queijos está entre as maiores da agroindústria como, por exemplo, no estado do Espírito Santo onde ocupa o 2º lugar (INCAPER, 2021). Embora a importação esteja presente no território nacional, oriundas principalmente da Argentina e Uruguai, essa se restringe a apenas 4% dos queijos consumidos no Brasil (USDA, 2021).

De certo, o mercado brasileiro de queijos tem ainda grande possibilidade de ampliação pois indústrias estrangeiras reconhecem nesse mercado a possibilidade de uma expansão que já não é mais possível em países europeus já saturados com altas taxas de consumo per capita. No Brasil, o consumo médio per capita de queijos é de apenas 5,5 quilos por ano, perdendo tanto para países como Argentina que alcança 11 quilos, como de toda a Europa com um consumo médio de 20 quilos e que pode chegar a 25 quilos por ano em países como França e Itália (USDA, 2021).

No Brasil, vale ressaltar que em termos de consumo per capita o Rio de Janeiro é o estado que mais consome queijo no país, com destaque também para a região Sudeste, com um nível de aquisição do queijo 28% acima da média das outras regiões do País (EMBRAPA, 2021).

O impacto causado pela pandemia de covid-19 sobre a produção e consumo de alimentos, em 2020 houve aumento na produção de leite no país. Embora o aumento de 2,1% em relação a 2019 possa parecer modesto, alcançou uma produção de 25,526 bilhões de litros, estando entre os melhores resultados obtidos na última década. No mesmo ano, houve crescimento também na produção de queijo que absorveu um volume de leite 2,8% maior que no ano anterior consumindo 8,746 bilhões de litros da produção de leite do país. A pandemia também afetou o local de consumo, com tendência a redução no consumo fora de casa e aumento no consumo domiciliar (EMBRAPA, 2021). No Brasil é provável que essa tendência tenha sido apenas reforçada, visto que o maior percentual de consumo era domiciliar, mesmo antes da pandemia (IBGE, 2020).

Em pesquisa associando redes sociais e derivados lácteos realizada do Twitter durante a pandemia foi identificado que o queijo é o derivado lácteo de maior interesse do público, e esteve presente em 40,7% das postagens relacionadas a lácteos. Segundo os autores, é possível que exista influência da incorporação de hábitos da cultura moderna ocidental ao estilo de vida brasileiro embora essa tendência tenha sido observada também em vários outros países. Os autores relacionam também a praticidade do queijo para lanches rápidos e ainda a concepção dos queijos como uma comida de indulgência, também conhecidos como “comfort food”, e, portanto, alimentos que têm sua demanda aumentada em situações de estresse (EMBRAPA, 2021).

## 1.2 QUEIJOS: CARACTERÍSTICAS

O queijo é um alimento com uma ampla variedade disponível no mercado, com mais de 1000 tipos em todo o mundo. No Brasil alguns queijos, são consumidos por todo o território. Embora possam sofrer variação de nomenclatura entre os estados ou ter uma terminologia que designe sua região de produção, muitas vezes carregam parte da cultura regional para outros estados e regiões do país, reafirmando sua importância cultural (RODRIGUES; FERREIRA, 2019).

Bastante consumido entre os brasileiros, o queijo é um alimento que tem destaque entre os derivados lácteos, pelo seu alto teor de proteínas, rico em cálcio, fósforo e vitaminas, além de apresentar características sensoriais distintas e mesmo valores de compra variados, características que permitem atender a um mercado consumidor diversos e também de diferentes faixas etárias (CORASSIN; PATRICIA; CARLOS, 2017). Ademais, constitui uma importante opção de fonte de proteínas, conseqüentemente é bastante utilizado por pessoas com dietas mais restritivas associadas à comorbidades e também como uma boa opção para vegetarianos e flexitarianos. Seu consumo é inclusive estimulado, particularmente quando considerado os benefícios de seu potencial probiótico (DA SILVA; SILVA; DA CRUZ, 2022). Queijos probióticos possuem diversos efeitos positivos na saúde já demonstrados na literatura em modelos animais como redução de processo inflamatório em pulmão (VASCONCELOS et al., 2019) e também em humanos como a atenuação da pressão arterial sistólica e diastólica (LOLLO et al., 2015). Sua composição favorece seu uso como uma matriz para adição de bactérias probióticas, uma vez que sua composição permite um efeito tamponante em ambiente gástrico que protege essas bactérias (CORASSIN; PATRICIA; CARLOS, 2017).

Sendo o queijo um produto animal suscetível a contaminação, características como a umidade podem favorecer o crescimento bacteriano nesse alimento (ORDÓÑEZ, 2005). Os queijos selecionados no estudo serão representativos das diferentes classificações de umidade de acordo com a legislação (BRASIL, 1996).

Assim, considerando as legislações referentes a identidade dos queijos, embora existam legislações recentes e específicas a cada tipo de queijo sendo estabelecidas (tabela 1), há queijos sem uma legislação própria, caso do queijo cottage que atendem ao Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos constante na portaria número 146 de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Nessa, o queijo é definido como um produto fresco ou maturado obtido mediante a coagulação do leite ou leite reconstituído (na forma integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, pela ação de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com posterior retirada do soro. Podendo ser adicionado de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e corantes (BRASIL, 1996).

Tabela 1. Legislação e classificação de umidade dos queijos selecionados para análise

Queijo	Legislação	Umidade	pH
<b>Ricota Fresca</b>	IN 65 21/07/2020 (BRASIL, 2020)	Muito alta (superior a 55,0%)	5,1 – 5,9
<b>Cottage</b>	Portaria 146 07/03/96 (BRASIL, 1996)	Muito alta (superior a 55,0%)	4,5 – 4,8
<b>Minas Padrão</b>	IN 66 21/07/2020 (MAPA, 2020)	Média* (46,0 e 54,9%)	5,0 – 5,2
<b>Prato</b>	Portaria 358, 04/09/1997 (BRASIL, 1997a)	Média (36,0% e 45,9%)	5,2 – 5,4
<b>Parmesão</b>	Portaria 353, 04 /09/1997 (BRASIL, 1997e)	Baixa (até 35,9%)	5,3 – 5,5

Fonte: Umidade adaptada da Portaria 146 07/03/96; pH Adaptada de manuais de produção da EMBRAPA: Rct (TEIXEIRA SILVA, 1997); QPms (SILVA, 2005a); QMP (RODRIGUES; FERREIRA, 2019); QPr (SILVA, 2005b); e QCtg (NICOLETTI; VERDI; ENDRES, 2016) \*Em 2020, a partir da legislação específica para queijo minas padrão, esse foi estabelecido como um queijo de média umidade, porém anteriormente, portanto, quando as análises microbiológicas foram realizadas, esse era considerado de alta umidade (PERRY, 2004; RODRIGUES; FERREIRA, 2019).

No caso da ricota, embora este seja um produto derivado do queijo, sua umidade (superior a 55%) permite classificá-lo como de muito alta umidade (BRASIL, 1996; CAMINI et al., 2014).

### 1.3 QUEIJOS: PROCESSO PRODUTIVO

O leite é um alimento perecível sujeito a contaminação por microrganismos, podendo gerar defeitos no queijo e também causar doenças. A contaminação microbiana é uma das causas mais comuns de degradação de alimentos em todo o mundo e pode ocorrer em qualquer ponto da cadeia alimentar. Produtos lácteos deteriorados são uma questão econômica significativa, especialmente, considerando que são meios particularmente ideais para o desenvolvimento de microrganismos devido ao seu alto teor nutricional (ALKHAFJE; OLAMA; ALI, 2022).

Desta maneira, o processo que visa um queijo seguro e de boa qualidade precisa se

iniciar no leite usado para a produção do queijo. A pasteurização, exigida para grande parte dos queijos, permite a eliminação ou redução de bactérias potencialmente patogênicas que quando presentes no leite cru podem se multiplicar, gerando risco ao produto (DE OLIVEIRA PINTO et al., 2015).

O processo de pasteurização, permite através do aumento de temperatura por um determinado período de tempo, causar a destruição ou redução de microrganismos causadores de doenças. Esse processo permite a eliminação de microrganismos patogênicos não formadores de esporos, além de bolores, leveduras, bactérias Gram-negativas e muitas Gram-positivas (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Outra metodologia que favorece a conservação do produto acontece através da adição de sal, pela redução de atividade de água. A atividade de água expressa o teor de água livre no alimento, alimentos com altos valores de atividade de água estão relacionados com a atividade metabólica e o crescimento microbiológico (ORDÓÑEZ, 2005). Embora termo de compromisso para redução de sal em queijo tenha sido firmado dentro do Plano Nacional de Redução do Sódio em Alimentos Processados, esse termo contemplou apenas o queijo muçarela e o requeijão, e portanto, nenhum dos queijos analisados (ANVISA, 2019a).

Após a obtenção de matéria prima, a tecnologia de fabricação dos queijos, de maneira geral, compreende as etapas de coagulação, em que ingredientes como fermento, cloreto de cálcio e coalho são adicionados permitindo que a caseína (proteína do leite) coagule gerando a massa. Durante o tratamento da massa o queijo é cortado em partes homogêneas para passar pelo processo de agitação permitindo a dessoragem que é favorecida também na fase de enformagem, nessa fase, a massa obtida é colocada em formas e prensada. Para completar o processo de produção, o queijo passa pela etapa de salga, onde o sal tem a função não apenas de aprimorar o sabor, mas também exercer importante função no controle da umidade e conservação do produto (PERRY, 2004; SILVA, 2005a). A tabela 2 apresenta comparação entre as principais diferenças de processo de cada tipo de queijo.

No caso da ricota sua produção é feita a partir da coagulação do soro do queijo. Tem sua composição rica em proteínas e baixa em gorduras, normalmente produzida com pouco ou sem sal (KOSIKOWSKI, 1966).

O armazenamento deve ser feito em temperaturas reduzidas (de acordo com a legislação para queijo de muito alta umidade, em temperatura não superior a 8°C), pois, baixas temperaturas ajudam a inibir crescimento de microrganismos contaminantes e aumentar sua validade (BRASIL, 1997).

Tabela 2. Comparativo de processos de produção de cada queijo

	<b>Parmesão</b>	<b>Prato</b>	<b>Minas Padrão</b>	<b>Ricota Fresca</b>	<b>Cottage</b>
<b>Matéria prima</b>	Leite cru ou pasteurizado	Leite pasteurizado	Leite pasteurizado	Soro da prod. de queijos	Leite pasteurizado
<b>Pasteurização</b>	65°C por 30 min ou 72-75°C 12 a 15 seg. ambos com resfriamento imediato a 34°C	65°C por 30 min ou 72-75°C por 12 a 15 seg. ambos com resfriamento imediato a 34°C	63-65°C por 30 min ou 72-75°C por 15 a 20 seg ambos com resfriamento posterior de 32-34°C	Não passa por pasteurização, apesar de passar por etapa de aquecimento até 85°C, mas sem contagem de tempo.	60-65°C por 30 minutos
<b>Coagulante</b>	Adição de Fermento, Cloreto de cálcio, Coalho (45min)	Adição de Fermento, Cloreto de cálcio, Coalho (45min)	Adição de Fermento, Cloreto de cálcio, Coalho (40min)	Adição de Acidulante (Ac. láctico <sup>3</sup> / <sub>4</sub> das amostras)	Adição de Fermento e Cloreto de cálcio
<b>Corte da Massa</b>	Liras horizontais, verticais e transversais, com cubos de 0,3 cm de aresta	Liras horizontais, verticais e transversais, com cubos de 1 cm de aresta	Liras horizontais e verticais, com cubos de 1cm a 1,5cm de aresta	-	Liras horizontais e verticais, com cubos de 1cm a 1,5cm de aresta
<b>Agitação e cozimento</b>	* Agitação lenta alcançando 54°C (cozida)	* Agitação lenta alcançando 42°C (semi-cozida)	Agitação lenta alcançando 36-37°C, Sem cozimento	Sem agitação, aumento de temperatura até alcançar 95°C	Agitação lenta alcançando 44-48°C
<b>Enformagem</b>	Massa não resfriada para ganhar a forma típica	Enformado após passar por processo de pré-prensa	Massa não resfriada para ganhar a forma típica	Sob refrigeração, para dessora	-
<b>Prensagem</b>	Com manuseio por viragens	Com manuseio por viragens	Com manuseio por viragens	-	-
<b>Procedimento específico</b>	-	-	-	-	Lavagens da massa com água fria até 5°C. Com posterior acréscimo do **Dressing (pasteurizado)
<b>Salga</b>	Salmoura a 10-15°C, com 18% a 20% (m/v) de sal durante 24 h p 1Kg	Salmoura a 10-15°C, com 18% a 20% (m/v) de sal durante 24 h p 1Kg	Salmoura a 10-12°C, com 20% (m/v) de sal durante 24 h	***	Adição de Sal ao Dressing
<b>Maturação</b>	6 meses(4-10Kg), 8m (10-20Kg) e 12(20Kg) em 10°C a 15°C., com manuseio por viragem	Ocorre após a embalagem. 25 a 60 dias, em 10-15°C., com manuseio por viragem	20 a 40 dias em 10-15°C., com manuseio por viragem	-	-
<b>Embalagem/Armazenamento</b>	≤ 25°C	≤ 12°C	≤ 12°C	≤ 8°C	5 ± 2 °C

Fonte: Adaptação de manuais de produção da EMBRAPA: Rct (TEIXEIRA SILVA, 1997); QPms (SILVA, 2005a); QMP (RODRIGUES; FERREIRA, 2019); QPrT (SILVA, 2005b); e QCTg (NICOLETTI; VERDI;

ENDRES, 2016)

\*Quando não são utilizados tanques de parede dupla, que permitem a circulação de água quente ou vapor para realizar o aquecimento, outra forma consiste em retirar 20% a 30% de soro, colocando, em seu lugar, água quente.

\*\*Dressing é o líquido cremoso normalmente constituído de leite, creme de leite e sal que compõem o queijo cottage junto com a parte granular de massa coalhada.

\*\*\* Fluxograma sem adição de sal mas esse pode ser adicionado.

## 1.4 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

Iniciando com uma matéria prima de qualidade, o processo produtivo precisa contar com as boas condições higiênicas durante toda a produção, transporte e armazenamento, principalmente por se tratar de um alimento pronto para consumo e com maior consumo entre a população idosa (IBGE, 2020). A fim de contribuir significativamente para a garantia da qualidade final do produto em seus aspectos higiênicos sanitários se faz necessária a implementação de programas de Boas Práticas de Fabricação e Manipulação e fiscalização garantindo sua execução através da legislação vigente. Para a etapa de processo produtivo destacam-se a Portaria do MAPA nº 368/1997 (BRASIL, 1997c), e Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997 (BRASIL, 1997d) que versam ambas sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores industrializadores de alimentos, a Portaria do MAPA nº 46/1998 (BRASIL, 1998), que estabelece obrigatoriedade de implantação de Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle nos estabelecimentos com SIF (Serviço de Inspeção Federal) que juntos permitem o alcance de níveis adequados de segurança alimentar. Estes critérios compreendem desde a obtenção da matéria prima, neste caso, o leite, até o transporte do produto pronto para comercialização (BRASIL, 1997d). Desta forma, é responsabilidade dos produtores, garantir que todos os envolvidos na cadeia sigam estas orientações, assim como manutenção e conservação de estruturas, equipamentos e instalações que possam assegurar a qualidade do produto final (BRASIL, 2002).

Essas legislações dentre outras visam reduzir ou riscos de contaminação durante todo o processo produtivo gerando um produto final seguro.

## 1.5 SEGURANÇA ALIMENTAR E DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) compreende o conceito de Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) como garantia de acesso físico e econômico a todo indivíduo em quantidade suficiente de alimentos inócuos e nutritivos atendendo suas necessidades e preferências, com foco em uma vida sadia. Com esse objetivo, torna-se, fundamental a produção de alimentos de forma segura (livre de contaminantes biológicos, químicos e físicos), que permita reduzir as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (COATES, 2013).

Embora as DTAs possam ser evitadas, apenas na região das Américas, 77 milhões de pessoas sofrem de DTAs ao ano, levando a morte 9000 pessoas. Dentre essas, 31 milhões são crianças menores de 5 anos, dos quais mais de 2000 morrem (OPAS, 2021). De acordo com o centro de controle e prevenção de doenças (CDC) alimentos considerados não seguros podem ser responsáveis por 250 diferentes doenças. Essas doenças são reconhecidamente um problema de saúde pública disseminado, sobrecarregando ainda mais o sistema de saúde, impactando de forma significativa a produtividade e reduzindo ganhos econômicos, porém muitos casos não são adequadamente relatados, o que não permite conhecer a verdadeira dimensão do problema (CDC, 2016).

Uma vez que a falta de segurança dos alimentos e o grande número de doenças transmitidas por estes são importante causa de internações e mortes, mitigar os riscos para a inocuidade dos alimentos é um dos objetivos da Agenda de Saúde Sustentável para as américas 2018-2030, dentro do Plano Estratégico da Organização Pan Americana de Saúde 2020-2025 (OPAS, 2019).

O grande número de doenças causadas por microrganismos de origem alimentar, têm grandes consequências econômicas e para a saúde (ALKHAFAJE; OLAMA; ALI, 2022). Embora o papel do alimento, por vezes seja subestimado, esse pode estar diretamente relacionado com, até mesmo, surtos nosocomiais (RUSSINI et al., 2021).

No Brasil, de acordo com o ministério da saúde há comprovada relação de várias doenças com a ingestão de alimentos contaminados, com crescente número de internações hospitalares e altos índices de mortalidade infantil por diarreia em várias regiões do país. No período de 2007 a 2020, foram notificados, por ano, uma média de 662 surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar, com 156.691 pessoas doentes, sendo 22.205 hospitalizados e 152 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Dentro da segurança alimentar, uma concepção abrangente compreende os microrganismos resistentes à antimicrobianos como um perigo biológico que pode estar na cadeia de alimentos e representa uma ameaça à saúde pública (OPAS, 2015). Na União Europeia, embora o consumo de antibióticos em humanos e animais produtores de alimentos tenha sido reduzido desde 2011, a RA apresentada por bactérias isoladas em humanos continua aumentando para várias associações de antibióticos (ECDC, 2022).

## 1.6 ANTIBIÓTICOS E MECANISMOS DE AÇÃO

Antibióticos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, que previnem a multiplicação de agentes infecciosos ou induzem sua morte, impedindo assim, a disseminação da infecção (BRASIL, 2011). Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (KASPER; FAUCI, 2015).

Embora os antimicrobianos possam ter classificações diversas que derivam de sua origem, síntese, constituição química ou mecanismo de ação entre outras, uma das classificações mais usadas para os antibióticos de importância clínica os divide em: beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemases, monobactams), quinolonas, glicopeptídeos, oxazolidinonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosaminas, nitroimidazólicos, cloranfenicol, estreptograminas, sulfonamidas, tetraciclina e novos antimicrobianos (gliciliclinas, polimixinas, daptomicina, gemifloxacina) (HARAGUCHI, 2000)

Os principais mecanismos de ação dos antibióticos são: inibição da síntese ou da atividade do ácido nucleico, alterações da membrana celular, inibição do metabolismo bacteriano, inibição da síntese da parede celular e inibição da síntese de proteínas. O detalhamento de como os antibióticos atuam são ferramentas que tornam possível compreender as suas potencialidades tóxicas, as razões da sua inocuidade, o risco que apresenta o aparecimento de resistência, bem como inferir possíveis terapêuticas futuras (BRUNTON; BRUNTON; CHABNER, 2012).

## 1.7 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

### 1.7.1 Mecanismos de resistência

Países de baixa e média renda tem risco aumentado de emergência de resistência. Condições como controle ineficiente de infecções, situações sanitárias inadequadas e baixa qualidade de vida são impulsionadores relevantes de resistência (RAMBLIÈRE et al., 2021). O ambiente tem grande influência no aumento da pressão seletiva. A composição microbiana de esgoto nosocomial sofrendo seleção que favorece fenótipo de multirresistência foi identificado em Hospital no estado de São Paulo (ZAGUI et al., 2022). A associação de forte pressão seletiva e variabilidade de genes favorecem a seleção de cepas multirresistentes (COUTINHO et al., 2022).

A força da pressão de seleção, a taxa de mutação, o nível de resistência, bem como o impacto de cada mutação no fitness bacteriano, parecem ser os fatores principais que direcionam a evolução no caso de resistência a antibióticos (HERNANDO-AMADO; SANZ-GARCÍA; MARTÍNEZ, 2019).

Além da resistência intrínseca, quando a bactéria é naturalmente não predisposta a sofrer a ação de determinado medicamento, as bactérias podem se tornar resistentes através da transferência horizontal de genes, por quatro vias conhecidas. A primeira via ocorre por conjugação com outra bactéria, com genes sendo transferidos através de elementos móveis (plasmídeos, transposons e integrons). Embora menos comum é possível que a transferência ocorra através de bacteriófagos em um processo conhecido como transdução. Além disso, há também uma via chamada de transformação, onde o DNA livre no ambiente é incorporado por uma bactéria circundante, nesse caso uma bactéria sofre lise, liberando seu material genético que é então absorvido por outra bactéria. Recentemente uma quarta via tem sido reconhecida, através das vesículas de membrana, principalmente em bactérias Gram-negativas, em um processo onde as vesículas podendo conter material citoplasmático, incluindo DNA, se fundem a uma nova célula alvo. Espécies de *Bacteroides* spp., que compõem a microbiota humana, produzem vesículas de membrana com beta-lactamases associadas à superfície, que podem proteger bactérias como *Salmonella typhimurium* de antibióticos beta-lactâmicos (BRUNTON; BRUNTON; CHABNER, 2012; MCINNES et al., 2020; STENTZ et al., 2015).

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em quatro grandes grupos: primeiro

aqueles relacionados à entrada do antibiótico na célula, por alteração da permeabilidade ou até mesmo pela presença de bombas de efluxo; em segundo aqueles que previnem a acumulação do antibiótico na célula, com estratégias que focam na modificação ou hidrólise do antibiótico; em terceiro a modificação da molécula alvo do antibiótico, podendo ligar a uma molécula protetora ou alterar sua concentração; e por fim o mecanismo que evita o efeito tóxico gerado pela ligação do antibiótico ao alvo contornando no metabolismo celular a necessidade de reação química na qual o alvo está envolvido (YELIN; KISHONY, 2018).

Os mecanismos de RA são complexos e sofrem também a influência de outros genes de resistência e mesmo de outras funções do metabolismo. Em *Escherichia coli* uropatogênica produtora de enzimas beta-lactamases de espectro estendido a intensidade de resistência a beta-lactâmicos e mesmo a não lactâmicos pode ser afetado pela hiperprodução dos genes *ampC*, *bla<sub>ctxM-1</sub>*, *bla<sub>tem</sub>* além de biofilmes e ilhas de patogenicidade (MATINFAR et al., 2021).

### 1.7.2 Genes de resistência

Uma vez que a resistência aos antibióticos se tornou uma importante ameaça para a medicina moderna, existe um interesse considerável para identificar além da resistência fenotípica, os mecanismos pelos quais essa resistência ocorre e os genes envolvidos nesse processo (KRELL; MATILLA, 2022). O entendimento da base genética da resistência bacteriana e, portanto, o espectro de atividade de um antibiótico, podem guiar o desenvolvimento de novas combinações de agentes com aperfeiçoamento ou expansão de sua atividade (BLAIR et al., 2015).

Visto isso, alguns genes importantes, já descritos pela literatura, compreendem a enzima Nova Deli metalo-beta-lactamase (NDM), descrita pela primeira vez em 2008, inicialmente proveniente da Índia. Os genes *ndm* codificam enzimas capazes de inativar todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Esses genes se espalharam para diversos gêneros de membros da família *Enterobacteriaceae* entre outras bactérias e geograficamente já estão espalhados em países de todo o mundo (DENISUIK et al., 2013; NABTI et al., 2021; SHOMA et al., 2014).

Entre os genes produtores de carbapenemases clinicamente mais expressivos, estão os tipos *KPC* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). O gene *KPC* foi relatado pela primeira vez no final de 1990 a partir de *K. pneumoniae* isolada na Carolina do Norte, EUA e atualmente conta com mais de 10 diferentes variantes descritos. Já tendo sido isolado de amostras de leite

(UYANIK et al., 2022). Estas enzimas oferecem resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas, cefamicinas e monobactâmicos (VAN DER BIJ; PITOUT, 2012).

Com relação aos genes *tet*, que conferem resistência a tetraciclina, temos que seus produtos são responsáveis pela proteção do ribossomo, por meio de mecanismos que induzem mudanças conformacionais. A tetraciclina fica então impedida de se ligar ao ribossomo para impedir a síntese de proteínas, a ação pode acontecer também de forma que ocorra a dissociação de tetraciclina já ligada ao ribossomo (BROOKS; ADELI; MCLAUGHLIN, 2014). São comumente encontrados em *Salmonella spp.* isoladas de alimentos (PAVELQUESI et al., 2021).

Assim, as plataformas genéticas, conhecidas como integrons são de grande importância na epidemiologia da resistência antimicrobiana entre as bactérias Gram-negativas. Com a incorporação de cassetes gênicos móveis por recombinação específica, podem carregar distintos genes de resistência. Como exemplo, temos integrons que contêm genes que codificam para metalo-beta-lactamase, que destacam seu papel na disseminação de resistência (SUNDE et al., 2015).

O gene *oxa-48* foi identificado pela primeira vez em 2001 em *K. pneumoniae* isolada na Turquia, desde então, as bactérias que produzem metalo-beta-lactamases foram causas importantes de surtos nosocomiais em vários países europeus, como França, Alemanha, Espanha, Países Baixos, Bélgica, Reino Unido e Norte da África (VAN DER BIJ; PITOUT, 2012), muitas vezes encontrado também entre isolados hospitalares (NABTI et al., 2021).

Bactérias Gram-negativas produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) relacionadas a presença dos genes *bla<sub>tem</sub>*, *bla<sub>shv</sub>*, e genes *bla<sub>ctx-M</sub>*, foram identificadas em leite e outros derivados lácteos (ALKHAFAJE; OLAMA; ALI, 2022). Calbo et al. (2011) descreve a difusão rápida e generalizada de um clone de *K. pneumoniae* produtor de *ctx-M-15* e *shv-1* causando grande surto nosocomial através da cadeia alimentar. Sendo o primeiro relatório que fornece uma visão sobre como a transmissão de ESBL-*K. pneumoniae* pode ocorrer através do alimento como veículo em ambiente hospitalar. Este estudo, demonstra que equipes de controle de infecção devem ter em conta que o alimento pode ser um vetor de transmissão para as estirpes multirresistentes no ambiente hospitalar.

## 1.8 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM LEITE E DERIVADOS

Produtos lácteos apresentando risco à saúde estão distribuídos por todo o mundo. Bactérias Gram-negativas podem estar presentes no leite como resultado de mastite clínica ou subclínica, ou indiretamente, através de contaminação fecal. Estudo em quatro estados brasileiros mostrou maior resistência a antibióticos em leite mastítico em comparação a *K. pneumoniae* isolados das fezes de rebanhos leiteiros. Alguns genes como o *tetA* de resistência a tetraciclina foram encontrados exclusivamente no leite (NOBREGA et al., 2021).

Recentemente, infecções transmitidas por alimentos causadas pelo consumo de leite e produtos lácteos tiveram isolamento frequente de bactérias como *S. entérica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* e *E. coli* (ALKHAFAJE; OLAMA; ALI, 2022).

Na região sul do Brasil, a identificação de espécies e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias associadas à mastite bovina, isolou 51 microrganismos de 8 diferentes espécies em leite com maioria de Gram-positivas e *Klebsiella spp* e *Serratia sp* entre as negativas. É importante ressaltar que neste estudo foi observada alta frequência de resistência bacteriana à penicilina, tetraciclina, amoxicilina, ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprima com 46,3%, 39%, 36,6%, 34,1% e 31,7%, respectivamente (LOPES et al., 2022). Além do risco no alimento, essas são resistências frente a antibióticos comumente utilizados na medicina humana (WHO, 2018).

Práticas adequadas durante o processo produtivo são fundamentais para que não haja desenvolvimento de patógenos resistentes, e/ou que permitam eliminar possíveis contaminantes já presentes durante a produção do leite. A análise microbiológica em queijo coalho na Cidade de Maceió no Alagoas, apresentou amostras que não atendiam os padrões de qualidade microbiológica exigidos, indicando possíveis falhas na produção, transporte, armazenamento e comercialização (MUNHOZ et al., 2021).

No Brasil, avaliação em 4 regiões diferentes, dentre os estados de Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Bahia, os queijos produzidos com leite sem pasteurização apresentaram *E. coli* com perfil de resistência em 19% de 147 amostras, incluindo cepa multirresistente (DE CAMPOS et al., 2018).

Estudo em queijos preparados a partir de leite não pasteurizado, no Egito, mostrou que o risco pode sofrer variações relacionadas a localização geográfica da área de pesquisa, nível de escolaridade da população e de conscientização sobre higiene e mesmo a forma de produção e embalagem dos produtos lácteos (ALKHAFAJE; OLAMA; ALI, 2022).

Surpreendentemente, resistência a aminoglicosídeos também vem sendo identificada mesmo em culturas lácticas para uso probiótico, como *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. (JAIMEE; HALAMI, 2016).

Genes de resistência para sistemas genéticos como os integrons que possuem significativa diversidade de genes, já foram encontrados em produtos lácteos. Integron de classe 1 foi encontrado em 28 isolados de *E.coli* resistentes em 187 amostras de leite no Egito (OMBARAK et al., 2018) e também em amostras de queijo Minas Frescal, no Brasil, onde com uso de metagenômica, identificou-se integron de classe 1 e 2 em 77% e 97%, respectivamente, das 35 amostras (DE PAULA et al., 2018).

## 1.9 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

As bactérias Gram-negativas são envolvidas com uma dupla camada de proteção de membranas lipídicas, através da qual expõem compostos nocivos por transporte transmembranar ativo. Várias classes de proteínas que atravessam a membrana medeiam seu transporte e, assim, conferem às bactérias a capacidade de ocupar nichos ecológicos perigosos ou de contornar os efeitos citotóxicos de compostos antimicrobianos (YU et al., 2013). A estrutura das bactérias Gram-negativas é bastante relevante, particularmente por sua resistência intrínseca relacionada à suas características de pouca permeabilidade de membrana, devido a sua membrana externa, e também por suas bombas de efluxo que fazem transporte ativo de antimicrobianos (RANDALL et al., 2013).

Por vezes, na área clínica, conhecer o contexto local e seus padrões de resistência é a melhor ferramenta a ser usada para que as medidas sejam direcionadas e adequadas, de forma a orientar e otimizar o tratamento com antibióticos para os pacientes (OPAS, 2021). Sendo assim, dados epidemiológicos são fundamentais para esse conhecimento.

A importância dos estudos em Gram-negativos para mitigar o processo de resistência é corroborada pelos microrganismos selecionados para monitoramento pelo Sistema Global de Vigilância de Resistência Antimicrobiana (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System – GLASS) onde 75% dos microrganismos selecionados são Gram-negativos e 50% deles todos pertencentes à mesma família, a família *Enterobacteriaceae* (WHO, 2017b).

A família *Enterobacteriaceae* com resistência a carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração foi estabelecida como grupo de prioridade máxima para desenvolvimento de

pesquisas e novos antibióticos pela OMS em sua Lista de Patógenos Prioritários. Nesta lista outras bactérias Gram-negativas como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos também foram incluídas como prioridade (WHO, 2017a).

Considerando a importância das bactérias Gram-negativas para o processo de resistência, e que técnicas tradicionais de isolamento fornecem informações subestimadas sobre 1% ou menos, da diversidade bacteriana de uma amostra ambiental (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990), a avaliação da microbiota Gram-negativa, e não apenas de uma bactéria isolada, pode trazer informação mais completa sobre o potencial de resistência presente em uma amostra.

A despeito de não haver unicidade na definição do termo microbioma e microbiota, neste trabalho, a palavra microbioma será usada no sentido de comunidade de microrganismos residentes do alimento enquanto o termo microbiota corresponderá a toda a população de microrganismos presentes na amostra no momento, sejam autóctones (residentes) e/ou alóctones (transitórios).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificação de marcadores fenotípicos e genotípicos de resistência a antibióticos em microbiota Gram-negativa (MGN) viável oriunda dos queijos parmesão, prato, minas padrão, cottage e de ricota fresca.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a susceptibilidade a antibióticos na microbiota Gram-negativa com metodologia alternativa ao isolamento;

2.2.2 Identificar fenotipicamente a susceptibilidade da microbiota Gram-negativa presentes nos queijos e ricota;

2.2.3 Investigar a presença de genes que conferem às bactérias resistência aos antibióticos;

2.2.4 Identificar através de sequenciamento genético espécies em MGN resistente apresentando diversidade de genes de resistência;

2.2.5 Avaliar genoma da espécie identificada na MGN selecionada, neste caso, cepa da espécie *Serratia marcescens*.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM

Vinte queijos, sendo quatro unidades de cada um dos 5 tipos a seguir: parmesão, prato, minas padrão, cottage e ricota foram coletados em estabelecimentos comerciais formalizados no estado do Rio de Janeiro. Ao todo 15 marcas comerciais foram avaliadas de forma que nenhuma marca foi repetida dentro do grupo do mesmo tipo de queijo.

Todos as amostras coletadas atenderam aos critérios: produto na embalagem original não violada, produto visualmente não alterado ou deteriorado, dentro do prazo da validade, com carimbo de serviço de inspeção federal (SIF), estadual (SIE) ou municipal (SIM) e com temperatura de superfície do queijo menor ou igual a 8°C verificado por termômetro de infravermelho Skill-Tec SKTI-550, respeitando critérios estabelecidos pela RDC nº 12/2001 (BRASIL, 2001) posteriormente revogada em dezembro de 2021 pela RDC nº 331/2019 (BRASIL, 2019a) e IN nº60 (29/12/19) (BRASIL, 2019b).O transporte ao laboratório foi feito em recipiente com manutenção da temperatura adequada de acordo com a legislação.

#### 3.2 MÉTODO DE PRÉ SELEÇÃO

As análises seguiram a metodologia descrita por (SILVA et al., 2020a). Os queijos foram homogeneizados em homogeneizador tipo stomacher, destes  $25,0 \pm 0,2$ g foram colocados em 225mL de Caldo GN (Gram-negativo) que tem por finalidade o enriquecimento seletivo para o cultivo de organismos Gram-negativos (HIMEDIA, 2011). Posteriormente foram incubados por 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para pré-enriquecimento.

Objetivando a pré-seleção de microbiota resistente, após 24 horas, 50 microlitros do caldo foram retirados e colocados em tubos contendo 5 mL de Caldo triptona de soja - TSB (Oxoid, Reino Unido) e disco de antibiótico (Oxoid, Reino Unido) (CDC, 2008). Foram utilizados 11 antibióticos, sendo 10 deles distribuídos de forma a representar cada classe da Classificação de Ambler (AMBLER, 1980) e acrescido de 1 antibiótico monobactâmico, única classe dentro dos beta-lactâmicos não incluída na classificação.

Os antibióticos selecionados foram: Cefepima (30µg), Ertapenem (10µg), Gentamicina (10µg), Ampicilina (10µg), Ampicilina Sulbactam (10/10µg), Cloranfenicol (30µg), Tetraciclina (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Ceftazidima (30µg) e Trimetoprima Sulfametoxazol (1.25/23.75µg) e Aztreonam (30µg). A etapa de pré-seleção foi realizada em triplicata para cada antibiótico testado.

### 3.3 AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA

Após 24 horas de crescimento, os tubos com crescimento (turvação) foram levados para a próxima etapa, em uma adaptação da técnica de disco difusão, uma alçada (10 microlitros) foi inoculada de maneira a formar superfície com crescimento homogêneo, em placa de Agar MacConkey, um meio diferencial e levemente seletivo para organismos Gram-negativos. O disco de antibiótico, da classe selecionada, foi colocado na superfície da placa recém-semeada e esta levada à estufa a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C por 16-18 horas (CDC, 2008; CLSI, 2018). Repetiu-se o procedimento para cada antibiótico selecionado na pesquisa.

Após 16-18 horas de incubação, cada placa teve os diâmetros dos halos de inibição mensurados e avaliados de acordo com tabela de Normas Interpretativas para zona de diâmetro e concentração inibitória mínima para família *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2018). Os valores de referência se encontram resumidos na tabela 3.

A pesquisa selecionou antibióticos que incluem os amplamente utilizados na medicina veterinária, comumente usados para tratamento de mastite em rebanhos leiteiros brasileiros e humana em todo o mundo e também encontrados em uma variedade de matrizes ambientais (PAN, 2017; Nobrega, 2021) e antibióticos considerados criticamente importantes para saúde humana pela OMS em 2016 e ainda atualmente (WHO, 2016; WHO, 2018).

Para controle de efetividade dos antibióticos, todos foram testados com *Escherichia coli* (ATCC 25922) simultaneamente as análises.

As MGNs que apresentaram resistência sejam por serem consideradas resistentes ou intermediárias e foram estocadas em solução de TSB e 20% de glicerol.

Tabela 3. Resumo da concentração dos discos de antibióticos e das zonas de inibição características da família *Enterobacteriaceae*

Agente Antibiótico	Concentração do disco	Diâmetros das zonas de inibição (mm)		
		Resistente	Intermediário	Sensível
<b>Cefepima (FEP)</b>	30µg	≤ 18	19-24*	≥ 25
<b>Ertapenem (ERT)</b>	10µg	≤ 18	19-21	≥ 22
<b>Gentamicina (GEN)</b>	10µg	≤ 12	13-14	≥ 15
<b>Ampicilina (AMP)</b>	10µg	≤ 13	14-16	≥ 17
<b>Ampicilina Sulbactam (AMP-SUL)</b>	10µg/10µg	≤ 11	12-14	≥ 15
<b>Cloranfenicol (CLO)</b>	30µg	≤ 12	13-17	≥ 18
<b>Tetraciclina (TE)</b>	30µg	≤ 11	12-14	≥ 15
<b>Ciprofloxacina (CIP)</b>	5µg	≤ 20	21-30	≥ 31
<b>Ceftazidima (CEF)</b>	30µg	≤ 17	18-20	≥ 21
<b>Sulfametoxazol Trimetoprima (SUL- TRI)</b>	1,25µg/ 23,75µg	≤ 10	11-15	≥ 16
<b>Aztreonam (AZT)</b>	30µg	≤ 17	18-20	≥ 21

Fonte: Dados extraídos de CLSI, 2018. \*Para o antibiótico cefepima o dado de Intermediário é substituído por SDD (susceptible-dose dependent), que tem seu efeito dependente da concentração e da frequência da dose.

### 3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA das MGNs consideradas resistentes e intermediárias, foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas GeneJET Genomic DNA Purification KIT (ThermoScientific, Lituânia).

### 3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

As MGNs intermediárias e resistentes foram analisadas por PCR para os genes descritos na tabela 4.

Tabela 4. Sequência de nucleotídeos, tamanho dos genes e referências

Primer	Sequência (5' - 3')	Condições da PCR	Produto (pb) <sup>A</sup>	Referência
<i>tem-1 e</i> 2(F) <sup>C</sup>	CATTTCCGTGTGCGCCCTTATTC	10 min a 94°C; 30 ciclos de 40s a 94°C, 40s a 60°C, 60s a 72°C; e 7 min de extensão final a 72°C.	800	(DALLENNE et al., 2010)
<i>tem-1 e</i> 2(R) <sup>C</sup>	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC			
<i>shv</i> (F) <sup>C</sup>	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC	10 min a 94°C; 30 ciclos de 40s a 94°C, 40s a 60°C, 60s a 72°C; e 7 min de extensão final a 72°C.	713	DALLENNE et al., 2010
<i>shv</i> (R) <sup>C</sup>	ATCCCGCAGATAAATCACCA			
<i>oxa-1,4,30</i> (F) <sup>C</sup>	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	10 min a 94°C; 30 ciclos de 40s a 94°C, 40s a 60°C, 60s a 72°C; e 7 min de extensão final a 72°C.	564	DALLENNE et al., 2010
<i>oxa-1,4,30</i> (R) <sup>C</sup>	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG			
<i>int-1</i> (F)	CTGCGTTCGGTCAAGTTCT	03 min a 94°C; 35 ciclos de 60s a 94°C, 60s a 68°C, 60s a 72°C; e 7 min de extensão final a 72°C.	882	(LANZ; KUHNERT; BOERLIN, 2003)
<i>int-1</i> (R)	GGAATGGCCGAGCAGATCCT			
<i>int-2</i> (F)	CACGGATATGCGACAAAAGG	03 min a 94°C; 35 ciclos de 60s a 94°C, 60s a 68°C, 60s a 72°C; e 7 min de extensão final a 72°C.	788	LANZ; KUHNERT; BOERLIN, 2003
<i>int-2</i> (R)	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG			
<i>int-3</i> (F)	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	03 min a 94°C; 35 ciclos de 60s a 94°C, 60s a 68°C, 60s a 72°C; e 7 min de extensão final a 72°C.	979	LANZ; KUHNERT; BOERLIN, 2003
<i>int-3</i> (R)	ACGGATCTGCCAAACCTGACT			
<i>ctx - M</i> (F)	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGG C	15 min a 95°C; 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C, 2 min a 72°C; e 10 min de extensão final a 72°C.	593	(MONSTEIN et al., 2007)
<i>ctx - M</i> (R)	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCA GC GG <sup>D</sup>			
<i>kpc</i> (F)	GTATCGCCGTCTAGTTCTGC	05 min a 95°C; 30 ciclos de 60s a 95°C, 60s a 56°C, 60s a 72°C; e 05 min de extensão final a 72°C.	635	(AZIMI et al., 2013)
<i>kpc</i> (R)	GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC			
<i>ndm</i> (F)	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	10 min a 94°C; 36 ciclos de 30s a 94°C, 40s a 58°C, 50s a 72°C; e 05 min de extensão final a 72°C.	621	(POIREL et al., 2011a)
<i>ndm</i> (R)	CGGAATGGCTCATCACGATC			
<i>tet - a</i> (F)	GGCCTCAATTCCTGACG	01 min a 94°C; 30 ciclos de	372	

<i>tet - a</i> (R)	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC	60s a 94°C, 60s a 55°C, 2 min a 72°C; e 10 min de extensão final a 72°C.		(GUILLAUME et al., 2000)
<i>tet - b</i> (F)	GAGACGCAATCGAATTCGG	01 min a 94°C; 30 ciclos de	228	GUILLAUME et al., 2000
<i>tet - b</i> (R)	TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC	60s a 94°C, 60s a 56°C, 2 min a 72°C; e 10 min de extensão final a 72°C		
<i>ges-1 to 9, 11</i> (F) <sup>B</sup>	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	10 min a 94°C; 30 ciclos de	399	DALLENNE et al., 2010
<i>ges-1 to 9, 11</i> (R) <sup>B</sup>	TTTGTCCGTGCTCAGGAT	40s a 94°C, 40s a 60°C, 1 min a 72°C; e 07 min de extensão final a 72°C		
<i>per-1, 3</i> (F) <sup>B</sup>	GCTCCGATAATGAAAGCGT	10 min a 94°C; 30 ciclos de	520	DALLENNE et al., 2010
<i>per-1, 3</i> (R) <sup>B</sup>	TTCGGCTTGACTCGGCTGA	40s a 94°C, 40s a 60°C, 1 min a 72°C; e 07 min de extensão final a 72°C		
<i>veb -1,6</i> (F) <sup>B</sup>	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	10 min a 94°C; 30 ciclos de	648	DALLENNE et al., 2010
<i>veb -1,6</i> (R) <sup>B</sup>	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	40s a 94°C, 40s a 60°C, 1 min a 72°C; e 07 min de extensão final a 72°C		
<i>imp</i> (F)	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	05 min a 94°C; 35 ciclos de	188	(ZEIGHAMI; HAGHI; HAJIAHMADI, 2015)
<i>imp</i> (R)	CCAAACCACTACGTTATCT	50s a 94°C, 60s a 50°C, 1 min a 72°C; e 08 min de extensão final a 72°C		
<i>vim</i> (F)	GATGGTGTGGTTCGCATA	15 min a 95°C; 36 ciclos de	390	(KARUNIAWATI; SAHARMAN; LESTARI, 2013)
<i>vim</i> (R)	CGAATGCGCAGCACCAG	30s a 94°C, 20s a 57°C, 50s a 72°C; e 05 min de extensão final a 72°C.		
<i>oxa 48</i> (F)	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	10 min a 94°C; 36 ciclos de	438	(POIREL et al., 2011b)
<i>oxa 48</i> (R)	CATCAAGTTCAACCCAACCG	30s a 94°C, 40s a 54°C, 50s a 72°C; e 05 min de extensão final a 72°C.		

A. pb: pares de base; B. *ges*, *per* and *veb* (multiplex PCR); C. *tem*, *shv* and *oxa* (multiplex PCR); D. S = g ou c.

Um gene de identificação da família *Enterobacteriaceae* foi também aplicado a cada uma das MGNs resistentes e/ou intermediárias (Tabela 5).

Tabela 5. Primer para identificação da família *Enterobacteriaceae* com sequência de nucleotídeos, tamanho do gene e referência

Primer	Sequência (5' - 3')	Condições da PCR	Produto (pb) <sup>A</sup>	Referência
uni515(F)	GTGCCAGCMGCCGCGGTA	03 min a 95°C; 40 ciclos de 15s a 95 °C, 60s a 67°C, 01 min a 72°C; e 05 min de extensão final a 72°C.	312	(BARMAN et al., 2008)
ent826 (R)	GCCTCAAGGGCACAACCTCCAA G			

A.pb: pares de base.

As condições de reação foram baseadas em protocolos publicados pelos autores descritos nas tabelas acima.

### **3.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE**

Todos os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,9% com uso de corante Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Brasil) e marcadores de peso molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen, EUA).

A visualização do gel foi realizada em transiluminador de UV acoplado a fotodocumentador (Forlab, Brasil).

### **3.7 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO**

Esta etapa apresentou uma adaptação ao projeto original em virtude da Pandemia de covid-19, com redução do número de sequenciamentos e origem da microbiota sequenciada. Uma microbiota Gram-negativa considerada resistente fenotipicamente e apresentando diversidade de genes de resistência foi selecionada para a fase de sequenciamento. A MGN foi identificada em amostra de queijo utilizando rigorosamente a mesma metodologia utilizada neste projeto e oriunda de um queijo tipicamente brasileiro e de alta umidade, o queijo Minas Frescal. A MGN foi submetida à etapa de isolamento morfológico em placas e em seguida o DNA foi extraído da única linhagem identificada e então enviada para sequenciamento para identificação da espécie e também da diversidade genômica desta. O DNA genômico total da linhagem foi sequenciado usando uma plataforma MiSeq da Illumina Inc. (Empresa Genone).

### **3.8 BIOINFORMÁTICA**

Uma biblioteca genômica foi construída usando um Kit Nextera XT (Illumina Inc., San

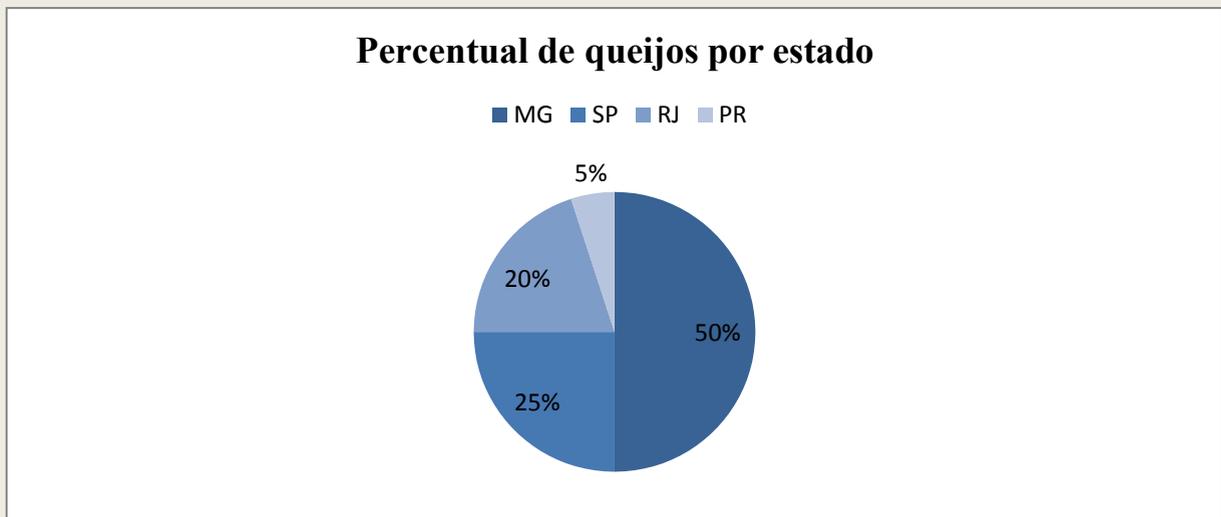
Diego, C) pela Genone Company. A sequência de leituras e o esboço do genoma foi montado usando Prokka (SEEMANN, 2014) no site Galaxy <https://www.usegalaxy.org>; RAST (BRETTIN et al., 2015) no site <http://rast.nmpdr.org/rast.cgi> e o DFAST <https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/>. Tipagem de sequência multilocus (MLST) foram identificados usando os serviços do Instituto Pasteur (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Os genes de resistência a antibióticos foram identificados usando ResFinder, KmerResistance disponível do Centro de Epidemiologia Genômica (<http://www.genomicepidemiology.org/>) e o Banco de dados abrangente de resistência a antibióticos (CARD) (ZANKARI et al., 2012). Replicons de plasmídeo e a identificação das espécies foram identificadas usando os serviços de PathogenFinder e PlasmidFinder, respectivamente, disponível no Centro de Epidemiologia Genômica (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AMOSTRAGEM

As 20 amostras de queijo selecionadas no estudo foram produzidas em 4 estados diferentes, sendo Minas Gérias o estado que contribuiu com maior número de amostras sendo responsável por metade destas e ainda é o estado de origem de todas as amostras de ricota e também está representado com pelo menos um queijo de cada tipo nesta pesquisa (gráfico 1).

Gráfico 1. Percentual de origem por estado dos 20 queijos analisados



Fonte: Dados da pesquisa.

### 4.2 RESISTÊNCIA FENOTÍPICA

Ao longo da fase de pré-seleção as amostras em quase sua totalidade, apresentaram crescimento significativo indicativo de resistência nos tubos. Exceção para apenas 2 tipos de queijo apresentando sensibilidade já nesta etapa. Nesse caso, 3/4 (75%) das amostras de cottage apresentaram MGNs sensíveis a 2 ou 3 antibióticos e para a ricota, uma única amostra com sensibilidade frente a 3 antibióticos, ou seja, apenas cottage e ricota apresentaram MGNs sensíveis nesta fase.

Após a avaliação de resistência em placa, todas as 20 amostras de queijo demonstraram

algum perfil de resistência. Considerando a análise de 20 queijos testados para 11 diferentes antibióticos, temos um total de 220 Microbiotas Gram-negativas (MGNs) classificadas entre MGNs resistentes, MGNs intermediárias e MGNs sensíveis (Tabela 6). Os tipos de queijos foram analisados randomicamente, porém foram agrupados na tabela para facilitar a visualização por tipo de queijo.

Tabela 6. Resistência fenotípica das 220 MGNs distribuídas entre resistentes, intermediárias e sensíveis incluindo etapa de pré-seleção e avaliação de resistência em placa

Queijos	Antibióticos										
	FE P	ER T	GE N	AM P	AMP- SUL	CL O	TE T	CIP	CE F	SUL- TRI	AZ T
Q1/QPms	R	R	R	R	R	I	R	R	I	S	R
Q2/QPms	I	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R
Q3/QPms	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Q4*/QPms	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Q5/QPrt	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Q6/QPrt	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Q7/QPrt	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S
Q8/QPrt	S	S	I	R	R	R	R	S	R	R	S
Q9/QMP	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Q10/QMP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Q11/QMP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Q12/QMP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Q13/Rct	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Q14/Rct	I	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R
Q15/Rct	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
Q16/Rct	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
Q17/QCtg	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R
Q18/QCtg	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S
Q19/QCtg	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S
Q20/QCtg	S	S	I	R	R	R	S	S	R	R	R

Fonte: Dados da pesquisa. R = MGN resistente, I = MGN Intermediário, S = MGN Sensível; Antibióticos: FEP - cefepima, ERT - ertapenem, GEN - gentamicina, AMP - ampicilina, AMP-SUL – ampicilina-sulbactam, CLO – cloranfenicol, TET – tetraciclina, CIP – ciprofloxacina, CEF – ceftazidima, SUL-TRI – sulfametoxazol-Trimetoprima, AZT – aztreonam; (\*) Queijo orgânico.

As análises demonstraram resultado resistente em 163/220 (74,1%) das MGNs e intermediário em apenas 7/220 (3,2%). Somado, o resultado total alcança 170/220 (77,3%) de MGNs com a presença de algum mecanismo de resistência. Ressaltamos que em 8/20 (40%) queijos as MGNs alcançaram a resistência frente à totalidade dos antibióticos testados.

Destaque para Q4 um queijo parmesão orgânico, única amostra orgânica entre todos os queijos analisados, apresentando resistência fenotípica em todas as MGNs.

Vale ressaltar que os 2 queijos com maior atividade de água do estudo, ambos considerados de muito alta umidade, tiveram as menores quantidades de MGNs resistentes enquanto o queijo de menor atividade de água, o parmesão, se posicionou com segundo lugar em número de MGNs resistentes alcançando um percentual de 84,1% das MGNs.

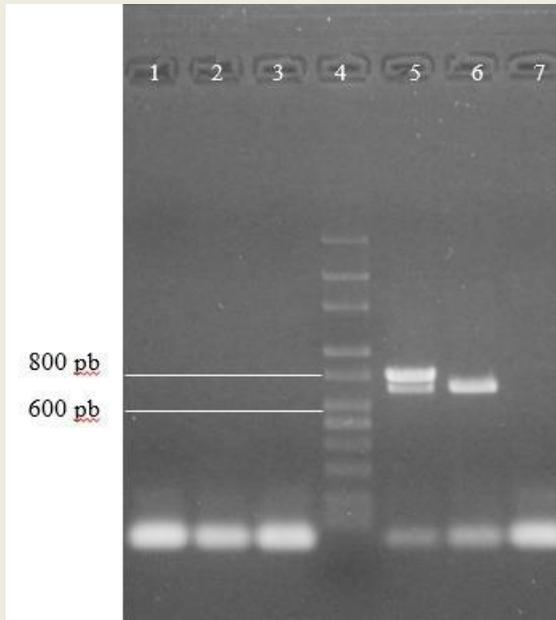
Todos os antibióticos apresentaram resistência em pelo menos um tipo de queijo. Dentre os antibióticos apresentando maior resistência, a maioria é de beta-lactâmicos contando ainda com a classe das tetraciclínas e um aminoglicosídeo.

O queijo cottage (QCTg) foi o único queijo que teve ao menos um antibiótico sem apresentar resistência em nenhuma das amostras, o ertapenem, ou seja, esse se mostrou efetivo em 100% das amostras de QCTg. A ricota apresentou o segundo menor número de MGNs resistentes 30/44 (68,2%) mesmo considerando sua umidade classificada como muito alta.

### 4.3 RESISTÊNCIA GENOTÍPICA

No total foram identificados 83 amplicons dos 8 de resistência encontrados, distribuídos entre os 5 tipos de queijo. A figura 1 traz um exemplo de resultado positivo para os genes de resistência pesquisados.

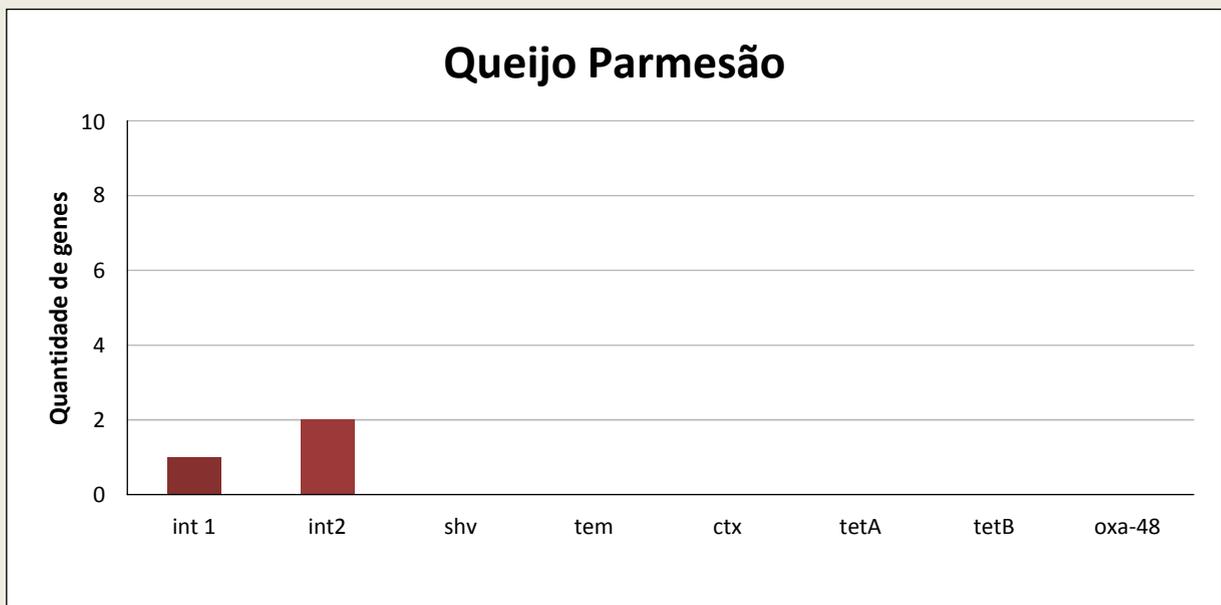
Figura 1. Gel de eletroforese dos produtos de PCR multiplex *shv*, *tem* e *oxa*.



Fonte: Dados da pesquisa. Gel de agarose 0,9%, 90V, 1h30min. Poço 1- Q7ampicilina; poço 2- Q7amp-sulbactam; poço 3- Q7ceftazidima; poço 4- ladder 100pb-3000pb; poço 5- 9amp-sulbactam; poço 6- 9ampicilina; poço 7- 9 ceftazidima. Gene *tem* - 800pb, gene *shv* - 713pb.

O queijo parmesão apresentou apenas genes do sistema genético integron de classe 1 e 2 (gráfico 2).

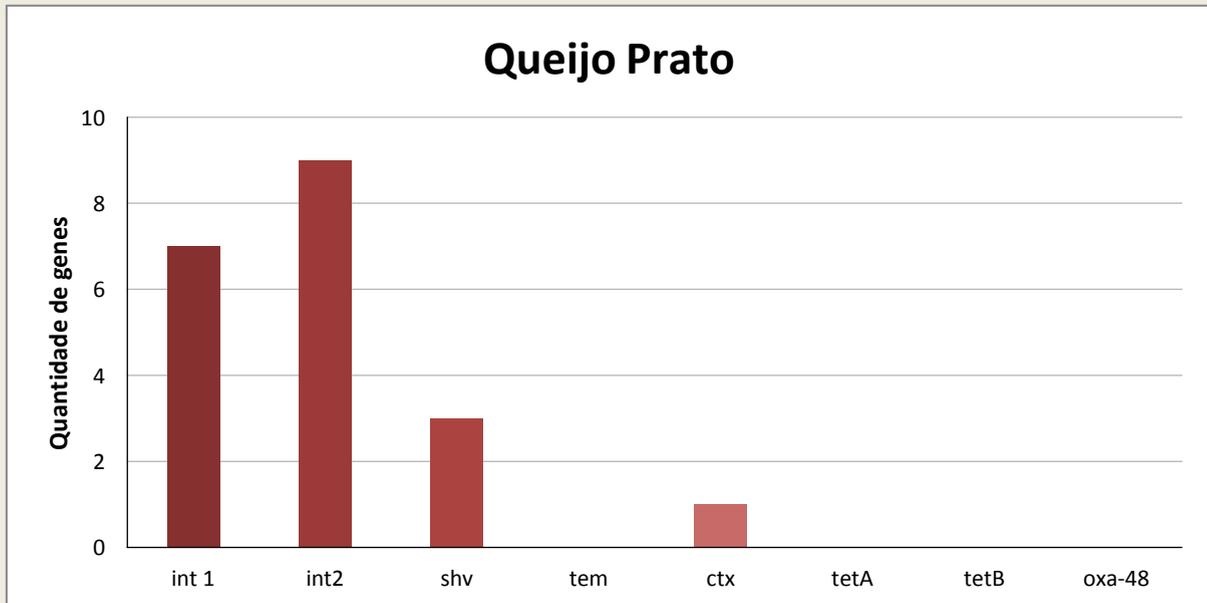
Gráfico 2. Genes de resistência identificados em queijo parmesão



Fonte: Dados da pesquisa

O queijo parmesão, de menor umidade do estudo, apresentou apenas 3 genes de resistência, seguido pelo queijo de média umidade, o queijo prato (Gráfico 3).

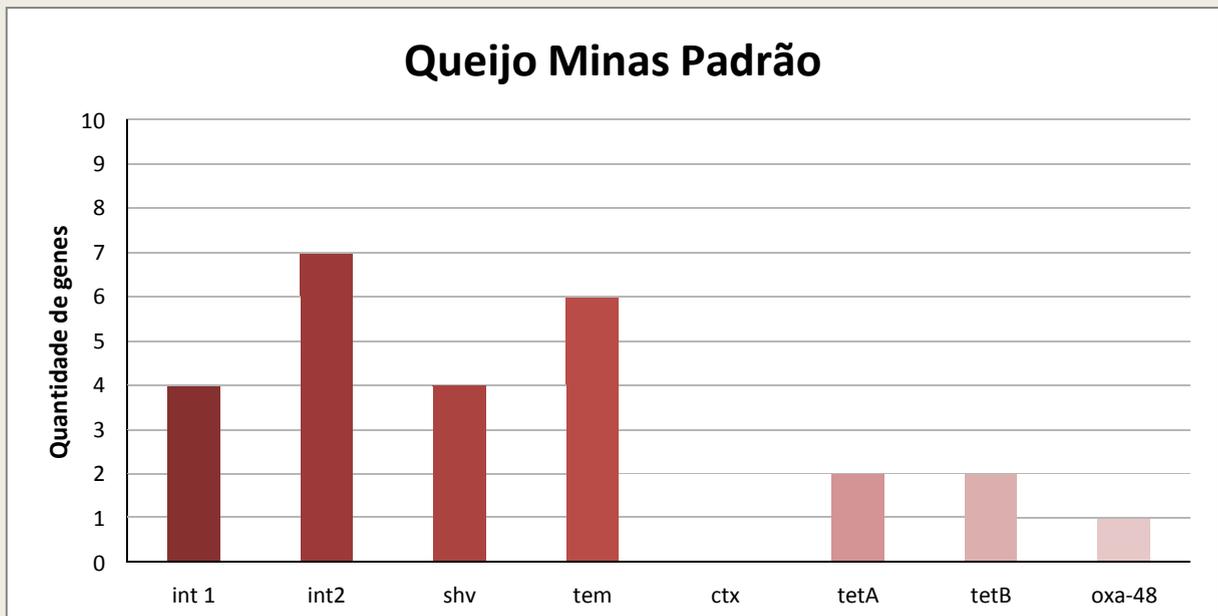
Gráfico 3. Genes de resistência identificados em queijo prato



Fonte: Dados da pesquisa

O queijo prato apresentou um total de 20 genes de resistência (GRs) identificados, seguido do queijo minas padrão com um total de 26 GRs encontrados (Gráfico 4).

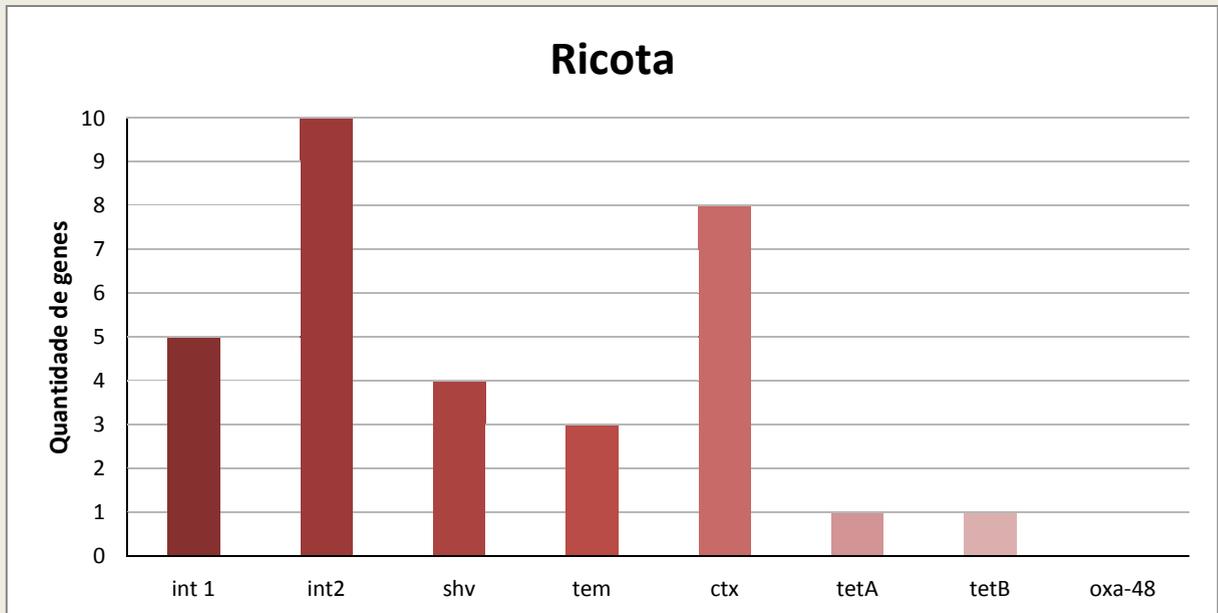
Gráfico 4. Genes de resistência identificados em queijo minas padrão



Fonte: Dados da pesquisa

No queijo minas padrão foram encontrados 26 amplicons distribuídos entre 7 diferentes genes. Semelhante diversidade foi identificada em ricota (Gráfico 5).

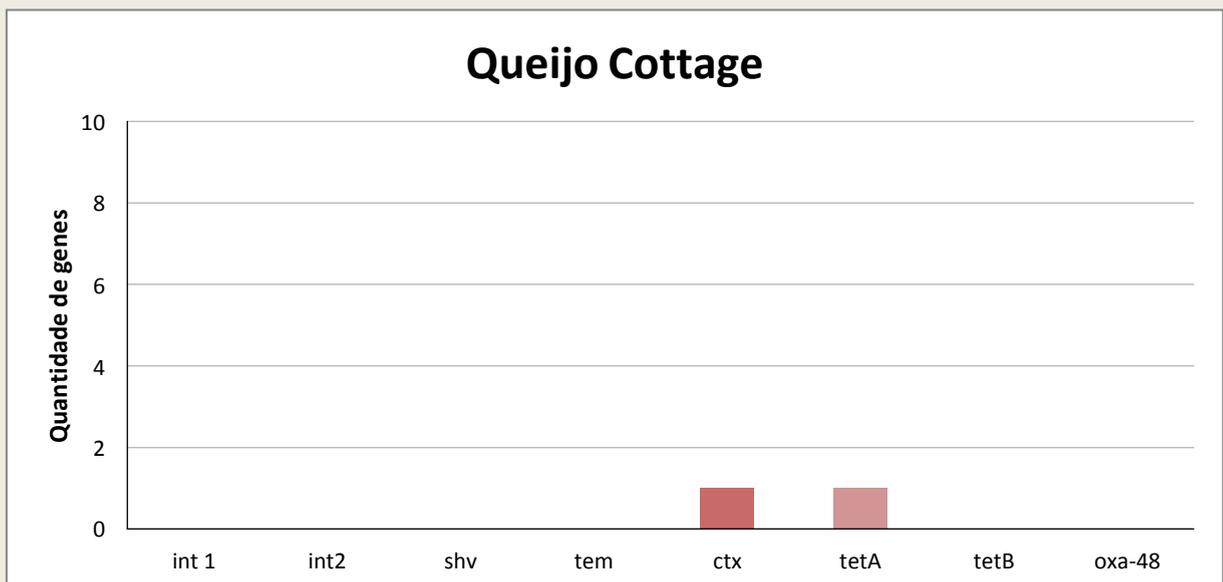
Gráfico 5. Genes de resistência identificados em ricota



Fonte: Dados da pesquisa

A análise da ricota de muito alta umidade, identificou a maior quantidade de amplicons presentes no estudo, 32 no total. Surpreendentemente, o cottage, um queijo também de muito alta umidade apresentou o menor número de amplicons identificados no estudo (Gráfico 6).

Gráfico 6. Genes de resistência identificados em queijo cottage

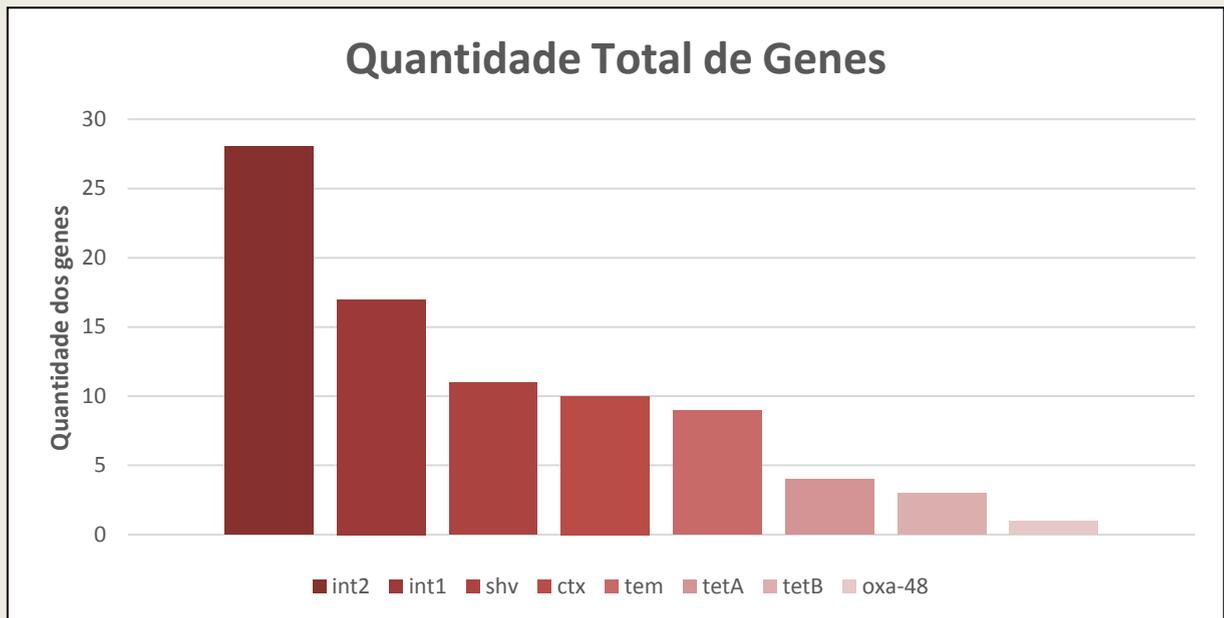


Fonte: Dados da pesquisa

O queijo cottage apresentou apenas 2 dos 20 genes pesquisados. Considerando o total de amplicons, foram identificados 83 amplicons de genes de resistência distribuídos entre 8

diferentes genes (Gráfico 7).

Gráfico 7. Quantidade Total de Amplicons de Genes de Resistência encontrado nas MGNs resistentes e intermediárias

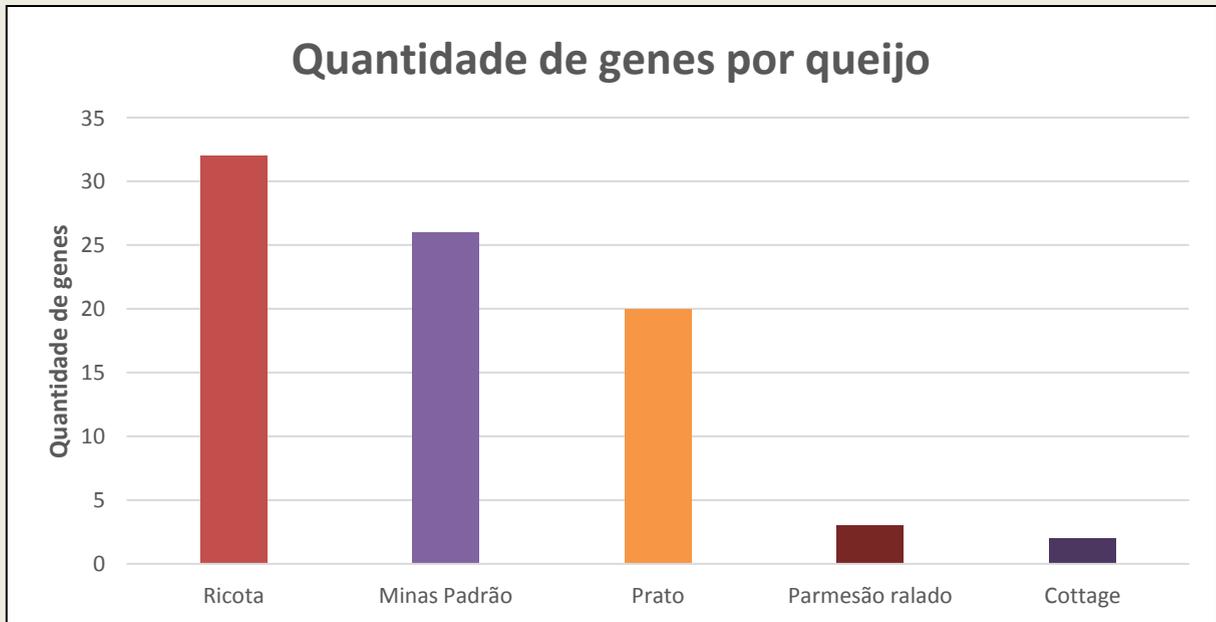


Fonte: Dados da pesquisa

Os sistemas genéticos *int1* e *int2* juntos correspondem a 45/83 (54,2%) dos amplicons de GRs encontrados seguidos dos amplicons de genes codificadores de beta-lactamases (*shv*, *tem*, *ctx*) com percentual de 36,1%, e os de resistência a tetraciclina em 8,4% dos amplicons. Apenas 1 gene de resistência a carbapenêmicos foi encontrado (gene *oxa-48*) em MGN resistente a ertapenem.

Quando analisado sob o ponto de vista dos tipos de queijos, evidencia-se um maior número de amplicons de GRs no queijo de maior umidade. O número de amplicons de GRs decresce gradativamente em conjunto com o decréscimo da umidade. Exceção para o queijo cottage, queijo de muito alta umidade, porém com menor número de genes (gráfico 8).

Gráfico 8. Quantidade Total de Amplicons de Genes de Resistência por tipo de queijo



Fonte: Dados da pesquisa

A tabela 6 apresenta um resumo dos genes de resistência encontrados entre as MGNs resistentes e intermediárias dos queijos analisados.

#### 4.4 FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE*

Das 170 MGNs, 108 apresentaram pelo menos um membro da família *Enterobacteriaceae* (tabela 6). Todos os tipos de queijos apresentaram membros desta família, foi mais prevalente no queijo minas padrão, estando ausente em apenas duas amostras dentre os 20 queijos analisados, sendo 1 de queijo parmesão e 1 de ricota.

Tabela 7. Genes de Resistência distribuídos nas MGNs resistentes e intermediárias

Queijos	Cefepima	Ertapenem	Gentamicina	Ampicilina	Amp.-sulbactam	Cloranfenicol	Tetraciclina	Ciprofloxi	Ceftazidima	Sulfa-Trimetoprima	Aztreonam
Q1/QPms										-	
Q2/QPms	<i>int2</i>	<i>int2</i> *	<i>int1</i> *		-	-		-			
Q3/QPms	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Q4/QPms	*	*	*	*		*					
Q5/QPrt			<i>int1</i> *	<i>int1, shv</i> *	*	<i>int1,int2</i> *	<i>int1,int2</i> *		<i>int2</i> *	<i>int1,int2</i> *	*
Q6/QPrt		<i>int2</i> *	*	<i>shv</i> *	<i>int2,shv</i> *	<i>int2</i> *	*	<i>int1</i> *	<i>int1</i> *	<i>ctx</i> *	<i>int2</i> *
Q7/QPrt	-	-	*	*	*	-	-	-	*	-	-
Q8/QPrt	-	-	*	<i>int2</i> *	*	*	*	-	*	*	-
Q9/QMP	-	-	*	<i>shv, int2</i> *	<i>tem, shv</i> *	*	<i>tetA, tetB</i> *				-
Q10/QMP		<i>tem, oxa-48</i> *	*	<i>tem</i> *	<i>tem</i> *	*	<i>tetB</i> *		*		
Q11/QMP	*	*	<i>int1,int2</i> *	*	*	<i>int2</i> *	<i>int2</i> *	*	*	*	*
Q12/QMP		*	<i>int2</i> *	<i>int1,shv,tem</i> *	<i>int1,shv,tem</i> *	*	<i>tetA, int2</i> *	<i>int1,int2</i> *		*	*
Q13/Rct	<i>int1, ctx</i> *		<i>ctx</i> *	<i>ctx, shv, int2</i> *	<i>int1, ctx, tem, shv</i> *	<i>int1, int2</i> *	<i>int1,int2,ctx,tetA,tetB</i> *		*	<i>int1,ctx,int2</i> *	
Q14/Rct							-				
Q15/Rct	-	-	<i>int2</i>	<i>shv,tem,ctx</i> *	<i>shv,ctx</i> *	-	-	-	-	-	-
Q16/Rct	*	*	<i>int2</i> *	<i>tem,int2</i>	-	*	-	-	<i>int2</i> *	<i>int2</i> *	<i>int2</i> *
Q17/QCtg	-	-	-	<i>ctx</i> *	*		-		*		
Q18/QCtg	-	-	*	*	*	*	-	-	-	*	-
Q19/QCtg		-	-	-	-	-	<i>tetA</i> *		*		-
Q20/QCtg	-	-	*	*	*	*	-	-	*	*	*

Fonte: Dados da pesquisa. (-) Representam isolados que não foram considerados resistentes fenotipicamente; Quadros em branco representam amostras resistentes, nos quais os genes testados não foram encontrados; \*Representam MGNs em que foram identificados ao menos um membro da família *Enterobacteriaceae*.

## 4.5 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

Para etapa de sequenciamento a MGN selecionada passou por etapa de isolamento morfológico em placa. Nesta foi identificada a presença de apenas uma espécie e posteriormente foi realizada a extração de DNA e sequenciamento dessa espécie.

A cepa bacteriana foi identificada por sequenciamento como pertencente a ordem *Enterobacterales*, família *Yersiniaceae* da espécie *Serratia marcescens* e foi depositada no Genbank sob o número SUB9616311, BioProject e número de acesso Biosample são PRJNA729465 e SAMN19116778, respectivamente. O genoma tem Comprimento Total (pb) 4.969.854 e Conteúdo de GC 59,6%; 4.722 CDs; 4 rRNA; 81 ARNt; 2 CRISP.

Foi identificado uma diversidade de genes em *S. marcescens*, com múltiplas funções e interesses biotecnológicos permitindo uma divisão em conjuntos de genes separados com base nos benefícios que eles proporcionam, permitindo inclusive estabelecer potencial neste repertório genômico para aplicação na promoção do crescimento de plantas (tabela 8).

Tabela 8. Genes envolvidos em promoção do crescimento de plantas

Gene	Produto	Via de Síntese
<i>ipdC1</i>	indol-3-piruvato descarboxilase	<b>Síntese do fitohormônio ácido indol acético (IAA)</b>
<i>ipdC2</i>	indol-3-piruvato descarboxilase	
<i>tyrB1</i>	aminoácido aromático aminotransferase	
<i>tyrB2</i>	aminoácido aromático aminotransferase	
<i>aspC</i>	aspartato aminotransferase	
-	descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos	
<i>trpA</i>	cadeia alfa de triptofano sintase	<b>Via de biossíntese do triptofano</b>
<i>trpB</i>	cadeia alfa de triptofano sintase	
<i>trpC</i>	bifuncional indol-3-glicerol fosfato sintase e isomerização de fosforribosil antranilato	
<i>trpD</i>	antranilato fosforribosiltransferase	
<i>trpG</i>	componente II da antranilato sintase	
<i>trpE</i>	componente I da antranilato sintase	
<i>gabP</i>	GABA permease	<b>Transporte de GABA</b>
<i>gabD</i>	succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] GabD	<b>Degradação de GABA</b>
<i>puuA1</i>	gama-glutamil putrescina sintetase PuuA	<b>Biossíntese de GABA</b>
<i>puuA2</i>	gama-glutamil putrescina sintetase PuuA	
<i>puuA3</i>	gama-glutamil putrescina sintetase PuuA	
<i>puuB1</i>	gama-glutamil putrescina óxido redutase	
<i>puuB2</i>	gama-glutamil putrescina óxido redutase	
<i>puuC</i>	aldeído desidrogenase dependente de NADP/NAD PuuC	

<i>puuD</i>	gama-glutamil-gama-aminobutirato hidrolase PuuD	
<i>puuE</i>	4-aminobutirato aminotransferase PuuE	
<i>puuR1</i>	regulador transcricional do tipo HTH PuuR	
<i>puuR2</i>	regulador transcricional do tipo HTH PuuR	
<i>prr1</i>	gama-aminobutiraldeído desidrogenase	
<i>prr2</i>	gama-aminobutiraldeído desidrogenase	
<i>gbuA</i>	Guanidinobutirase	
<i>potF</i>	proteína periplasmática de ligação à putrescina	
<i>potE</i>	transportador de putrescina PotE	
<i>potD</i>	proteína de ligação ao substrato do sistema de transporte de espermidina/putrescina PotD	<b>Transporte de Poliamina</b>
<i>potC</i>	proteína permease do sistema de transporte de espermidina/putrescina PotC	
<i>potB</i>	proteína permease do sistema de transporte de espermidina/putrescina PotB	
<i>potA</i>	proteína de ligação de ATP do sistema de transporte de espermidina/putrescina PotA	
<i>Pup</i>	importador de putrescina	
<i>miaA</i>	tRNA dimetilaliltransferase	<b>Biossíntese de citocina</b>
<i>miaB</i>	tRNA-2-metiltio-N6-dimetilaliladenosina sintase	
<i>speA</i>	arginina descarboxilase biossintética	
<i>speB</i>	Agmatinase	
<i>speC</i>	ornitina descarboxilase	
<i>speD</i>	proenzima S-adenosilmetionina descarboxilase	<b>Biossíntese de putrescina</b>
<i>speE1</i>	poliamina aminopropiltransferase	
<i>speE2</i>	poliamina aminopropiltransferase	
<i>speF</i>	ornitina descarboxilase induzível	
<i>metK</i>	S-adenosilmetionina sintase	
<i>cadA</i>	lisina descarboxilase induzível	
<i>cadB</i>	antiportador putativo de cadaverina/lisina	<b>Biossíntese de cadaverina e putrescina</b>
<i>cadC</i>	ativador transcricional CadC	
<i>speD</i>	proenzima S-adenosilmetionina descarboxilase	
<i>speE1</i>	poliamina aminopropiltransferase	
<i>speE2</i>	poliamina aminopropiltransferase	
<i>speG1</i>	espermidina N(1)-acetiltransferase	<b>Biossíntese de espermidina/espermina</b>
<i>speG2</i>	espermidina N(1)-acetiltransferase	
<i>speG3</i>	espermidina N(1)-acetiltransferase	
<i>chiA1</i>	Quitinase	
<i>chiA</i>	Quitinase	
<i>chiB</i>	Quitinase	<b>Degradação de quitina</b>
<i>Chid</i>	Quitinase	
<i>entC1</i>	sintase de isocorismato	
<i>entC2</i>	sintase de isocorismato	
<i>entE</i>	subunidade E da enterobactina sintase	
<i>entF</i>	subunidade F da enterobactina sintase	
<i>entB</i>	subunidade B da enterobactina sintase	
<i>entS1</i>	exportador de enterobactina	<b>Produção de Sideróforos</b>
<i>entS2</i>	exportador de enterobactina	
<i>exbD1</i>	proteína transportadora de biopolímero	
<i>exbD2</i>	proteína transportadora de biopolímero	
<i>exbB</i>	proteína transportadora de biopolímero	
<i>Bfr</i>	Bacterioferritina	
<i>Gcd</i>	quinoproteína glicose desidrogenase	<b>Solubilização de P inorgânico</b>

<i>Ppa</i>	pirofosfatase inorgânica	
<i>Ppx</i>	Exopolifosfatase	
<i>appA1</i>	proteína de ligação a oligopeptídeos AppA	<b>Mineralização de P orgânico e degradação de glifosato</b>
<i>appA2</i>	proteína de ligação a oligopeptídeos AppA	
<i>phnF</i>	regulador transcricional do metabolismo de fosfonatos PhnF	
<i>phnG</i>	proteína do sistema fosfonato C-P liase PhnG	
<i>phnH</i>	subunidade de alfa-D-ribose 1-metilfosfonato 5-trifosfato sintase PhnH	
<i>phnI</i>	subunidade de alfa-D-ribose 1-metilfosfonato 5-trifosfato sintase PhnI	<b>Mineralização de P orgânico e degradação de glifosato Transportadores</b>
<i>phnJ</i>	alfa-D-ribose 1-metilfosfonato 5-fosfato C-P liase	
<i>phnK</i>	utilização putativa de fosfonato proteína de ligação a ATP PhnK	
<i>phnL</i>	alfa-D-ribose 1-metilfosfonato	
<i>phnM</i>	subunidade PhnL da 5-trifosfato sintase	
<i>phnN</i>	alfa-D-ribose 1-metilfosfonato 5-trifosfato difosfatase	
<i>phnO</i>	ribose 1,5-bifosfato fosfoquinase PhnN	
<i>phnP</i>	aminoalquilfosfonato N-acetiltransferase	
<i>phnW</i>	fosforribosil 1,2-cíclico fosfato fosfodiesterase	
<i>phnX</i>	2-aminoetilfosfonato-piruvato transaminase	
<i>phoA1</i>	hidrolase de fosfonoacetaldeído	
<i>phoA2</i>	Fosfatização alcalina	
<i>phoC1</i>	Fosfatização alcalina	
<i>phoC2</i>	Fosfatase Ácida	
<i>Phy</i>	Floretina hidrolase	
<i>ugpA</i>	Sistema de transporte sn-glicerol-3-fosfato permease proteína UgpA	
<i>ugpB</i>	proteína periplasmática de ligação de sn-glicerol-3-fosfato UgpB	
<i>ugpC1</i>	proteína de importação de ligação de ATP de sn-glicerol-3-fosfato UgpC	
<i>cheR</i>	quimiotaxia proteína metiltransferase	
<i>cheB</i>	proteína-glutamato regulador de resposta de quimiotaxia	
<i>cheZ</i>	Metilesterase	
<i>Tse</i>	proteína fosfatase CheZ	
<i>tas1</i>	transdutor de serina de quimiotaxia com aceitação de metil	
<i>Tap</i>	transdutor de aspartato de quimiotaxia com aceitação de metilo	
<i>tsr1</i>	proteína de quimiotaxia de aceitação de metil IV	
<i>tsr2</i>		<b>Quimiotaxia Solubilização de zinco</b>
<i>tsr3</i>	proteína I de quimiotaxia de aceitação de metil	
<i>tsr4</i>	proteína I de quimiotaxia de aceitação de metil	
<i>Tar</i>	proteína I de quimiotaxia de aceitação de metil	
<i>znuA</i>	proteína do sistema de absorção de zinco de alta afinidade ZnuA	
<i>znuB</i>	proteína de membrana do sistema de absorção de zinco de alta afinidade ZnuB	
<i>znuC1</i>	proteína de ligação ZnuC do sistema de absorção de zinco de alta afinidade ao ATP	
<i>znuC2</i>	proteína de ligação ZnuC do sistema de absorção de zinco de alta afinidade ao ATP	
<i>znuC3</i>	proteína de ligação ZnuC do sistema de absorção de zinco de alta afinidade ao ATP	
<i>pitA1</i>	transportador de fosfato inorgânico de baixa afinidade 1	<b>Solubilização de zinco e Cobre</b>
<i>pitA2</i>	transportador de fosfato inorgânico de baixa afinidade 1	
<i>cadA</i>	lisina descarboxilase induzível	
<i>cadB</i>	antiportador putativo de cadaverina/lisina	
<i>cadC</i>	ativador transcricional CadC	
<i>zntA</i>	aTPase do tipo P transportador de zinco/cádmio/chumbo	
<i>zntB1</i>	proteína de transporte de zinco ZntB	

<i>zntB2</i>	proteína de transporte de zinco ZntB
<i>zntR</i>	regulador transcricional do tipo HTH ZntR
<i>copA</i>	ATPase exportadora de Cu <sup>+</sup>

Fonte: Adaptado de Silva, 2022, apêndice 1.

O genoma de *S. marcescens* apresentou um conjunto de genes que permitem a proteção da planta contra larvas e nematoides (tabela 9).

Tabela 9. Genes responsáveis por atividade nematicida e larvicida

Gene	Produto	Via de Síntese
<i>lyA</i>	Serina hidroximetil transferase	
<i>dhE</i>	Aldeído-álcool desidrogenase	<b>Acetaldeído</b>
<i>Dh</i>	Álcool desidrogenase	
<i>uuC</i>	Aldeído desidrogenase dependente de NADP/NAD PuuC	
<i>cnA</i>	Subunidade de sintase de cianeto de hidrogênio HcnA	<b>Cianeto</b>
<i>cnB</i>	Subunidade de sintase de cianeto de hidrogênio HcnB	
<i>cnC</i>	Subunidade de sintase de cianeto de hidrogênio HcnC	
<i>urF</i>	Amidofosforribosiltransferase	<b>Membro da família purina/pirimidina fosforribosiltransferase</b>
<i>hiA1</i>	Quitinase	<b>Degradação de Quitina</b>
<i>hiA</i>	Quitinase	
<i>hiB</i>	Quitinase	
<i>Hid</i>	Quitinase	
<i>wrW</i>	Serrawetin W1 sintetase	<b>Serrawetin</b>

Fonte: Adaptado de Silva, 2022, apêndice 1.

Considerando que, a sobrevivência e o crescimento das plantas requerem condições ambientais favoráveis, alguns genes podem ajudar no desenvolvimento de plantas de forma indireta. A Tabela 10 mostra os genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos presentes no ambiente.

Tabela 10. Genes de metabolismo de xenobióticos

Gene	Produto	Via de Síntese
<i>bphC</i>	Bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase	<b>Degradação de bifenil</b>
<i>bphJ2</i>	Aldeído-álcool desidrogenase	
-	nitronato monooxigenase	<b>Degradação de nitronatos</b>
<i>azoR1</i>	NADH-azorredutase dependente de FMN	<b>Degradação de corantes azo</b>
<i>azoR2</i>	NADH-azorredutase dependente de FMN	
<i>azoR3</i>	NADH-azorredutase dependente de FMN	
-	Nitroreductase	<b>Degradação de compostos nitro</b>
<i>iorA</i>	subunidade alfa de isoquinolina 1-oxidoreductase (EC 1.3.99.16)	<b>Degradação de compostos aromáticos N-heterocíclicos</b>
<i>iorB</i>	subunidade beta de isoquinolina 1-oxidoreductase (EC 1.3.99.16)	

aroQ	3-desidroquinato desidratase	
aroB	3-desidroquinato sintase	<b>Degradação de quinato</b>
-	Citocromo P450	<b>Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450</b>
-	Citocromo P450	
pcaK	transportador de 4-hidroxibenzoato PcaK	<b>Degradação de hidroxibenzoato</b>
mhbT	transportador de 3-hidroxibenzoato MhbT	
caeA	Carboxilesterase	
ybfK		<b>Degradação de Organofosforados, Carbamatos e Piretróides</b>
nhl1	Glutationa S-transferase	
nhl2		
gstB1	Proteína de membrana interna YqjA	
gstB2	Proteína de membrana interna YqjA	
gstB3	Proteína YqjC	
gstB4	proteína putativa YqjD	
qjA1	proteína putativa YqjD	
yqjA2	Glutationil-hidroquinona redutase YqjG	
yqjD1	Proteína de membrana interna YqjF	<b>Degradação de vários compostos xenobióticos</b>
yqjD2	Regulador transcricional YqjI	
yqjG	proteína putativa YqjZ	
qjE	Bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase	
yqjF	Aldeído-álcool desidrogenase	
yqjI	nitronato monooxigenase	
yqjZ	NADH-azorrredutase dependente de FMN	

Fonte: Adaptado de Silva, 2022, apêndice 1.

A cepa de *S. marcescens* apresentou genes de resistência a antibióticos já identificados por PCR e alguns encontrados durante o sequenciamento, além de genes de resistência a metais diversos (tabela 11).

Tabela 11. Genes responsáveis por resistência a metais e antibióticos

<b>Gene</b>	<b>Produto</b>	<b>Via de Síntese</b>
<i>zcd</i>	Proteína de resistência ao cobalto-zinco-cádmio	<b>Resistência ao cobalto-zinco-cádmio</b>
-	Regulador transcricional	
<i>pxA1</i>	Sensor histidina quinase CpxA	<b>Cascata de resistência a múltiplas drogas</b>
<i>pxA2</i>	Sensor histidina quinase CpxA	
<i>pxP</i>	Proteína periplasmática CpxP	
<i>pxR1</i>	Proteína reguladora transcricional CpxR	
<i>pxR2</i>	Proteína reguladora transcricional CpxR	
<i>orC</i>	Proteína de efluxo de magnésio e cobalto CorC	<b>Proteína de efluxo de magnésio e cobalto</b>
<i>ntA</i>	Zinco/cádmio/mercúrio/transportador de chumbo ATPase	<b>Transporte de chumbo/zinco/cádmio/mercúrio</b>
<i>opA</i>	ABC permease	
<i>utC</i>	ATPase do tipo P exportador de cobre	<b>Resistência ao cobre</b>
<i>csA</i>	Proteína de homeostase de cobre CutC	

<i>Rd</i>	Proteína de resistência ao cobre	
<i>utF</i>	Proteína D de resistência ao cobre	
<i>scsA</i>	Proteína de resistência ao cobre	
<i>csB</i>	Proteína dissulfeto reductase	
<i>csC</i>	Proteína contendo domínio de tiorredoxina	
<i>csD</i>	Proteína dissulfeto reductase	
ac6'-Ic	Aminoglicosídeo acetiltransferase	<b>Aminoglicosídeo</b>
rt-2	Beta-lactamase	<b>Cefotaxima, cefalosporina</b>
et(41)	Bomba de efluxo de tetraciclina	<b>Tetraciclina</b>
Rp	Regulador da expressão de bomba de efluxo multidrogas MdtEF	<b>Fluoroquinolona, macrolídeo, penicilinas</b>
exI	Transportador de membrana interna do complexo de efluxo MexGHI-OpmD	<b>Fluoroquinolona, tetraciclina</b>
xB	Bomba de efluxo	<b>Fluoroquinolona, gliciliciclina, nitrofurantoína, tetraciclina</b>
-ns	Repressor dos genes da proteína de fusão da membrana	<b>Cefalosporina, cefamicina, fluoroquinolona, macrolídeo, penicilina, tetraciclina</b>

Fonte: Adaptado de Silva, 2022, apêndice 1.

Além dos genes envolvidos em crescimento de plantas direta e indiretamente o sequenciamento identificou genes codificando enzimas de interesse para a indústria e com ação antimicrobiana (tabela 12).

Tabela 12. Genes envolvidos em atividades antimicrobianas ou enzimas importantes para a indústria

<b>Gene</b>	<b>Produto</b>	<b>Via de Síntese</b>
<i>grD1</i>	Subunidade D da gramicidina sintase linear	<b>Síntese de gramicidina</b>
<i>grD2</i>	Subunidade D da gramicidina sintase linear	
<i>grD3</i>	Subunidade D da gramicidina sintase linear	
<i>grD4</i>	Subunidade D da gramicidina sintase linear	
<i>ycB</i>	Tirocidina sintase 2	<b>Síntese de tirocidina</b>
<i>nsA</i>	L-asparaginase 1	<b>Síntese de asparaginase</b>
<i>nsB</i>	L-asparaginase 2	
<i>prA1</i>	Serralisina C	<b>Serralisina</b>
<i>prA2</i>	Serralisina	
<i>wrW</i>	Serrawetina W1 sintetase	<b>Serrawettin</b>
<i>odA</i>	Citosina deaminase	<b>Citosina</b>
<i>ebG</i>	4'-desmetilrebecamicina sintase	<b>Rebecamicina</b>
	Proteína de domínio lacase	
	Proteína de domínio lacase	
<i>ulS</i>	Proteína de secreção de pululanase	<b>Pululanase</b>
	Lipase	<b>Lipase</b>
<i>peE</i>	Lipase	
<i>feX1</i>	deferroquelatase/peroxidase putativa YfeX	

<i>feX2</i>	deferroquelatase/peroxidase putativa YfeX	<b>Peroxidase descolorante de corante (DyP), subgrupo tipo YfeX</b>
<i>lpX</i>	Clp protease dependente de ATP Subunidade de ligação a ATP ClpX	
<i>lpP1</i>	Subunidade proteolítica de protease Clp dependente de ATP	
<i>lpP2</i>	Subunidade proteolítica de protease Clp dependente de ATP	
<i>lpS</i>	Proteína adaptadora de protease Clp dependente de ATP ClpS	<b>Protease</b>
<i>tsH</i>	Metaloprotease de zinco dependente de ATP FtsH	
<i>On</i>	lon protease	
	biossíntese de antibióticos monooxigenase	
	biossíntese de antibióticos monooxigenase	
	biossíntese de antibióticos monooxigenase	<b>Biossíntese de Antibióticos</b>
	biossíntese de antibióticos monooxigenase	
<i>acC</i>	Levanase	<b>Levanase</b>
	Carboxipeptidase M32	<b>Carboxipeptidase</b>
<i>hpC/Prx 1</i>	Alquil hidroperóxido redutase C	
<i>smC/Ohr</i>	Proteína da família OsmC/Ohr	<b>Proteínas relevantes para redox</b>
	Peptídeo Sintetase Não Ribossomal	<b>NRPS</b>
	CRISPR com 37 unidades de repetição	
	CRISPR com 14 unidades de repetição	<b>Crispr</b>
<i>hIA</i>	Beta-cetotiolase	<b>Biossíntese de Butanol</b>
<i>adI</i>	3-cetoacil-CoA tiolase FadI	
<i>adA</i>	3-cetoacil-CoA tiolase	
<i>Bd</i>	3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase	<b>Fosmidomicina</b>
<i>aaF</i>	2,3-desidroadi-pil-CoA hidratase	
	-	putativa acil-CoA desidrogenase fadE25
	Ciclohexano-1-carbonil-CoA desidrogenase	
<i>dhE</i>	Aldeído-álcool desidrogenase	
<i>ldI</i>	Aldeído desidrogenase de cadeia longa	
<i>dh1</i>	Álcool desidrogenase	
<i>dh2</i>	Álcool desidrogenase	
<i>dhA</i>	Álcool desidrogenase 1	
<i>Sr</i>	Proteína de resistência à fosmidomicina	
<i>bcr1</i>	Proteína de resistência à biciclomicina	
<i>cr2</i>	Proteína de resistência à biciclomicina	<b>Biciclomicina</b>

Fonte: Adaptado de Silva, 2022, apêndice 1.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 AMOSTRAGEM E CONSUMIDOR

Embora 4% dos queijos no Brasil sejam importados, principalmente de países como Argentina e Uruguai (USDA, 2021), os queijos da pesquisa foram selecionados para representar a realidade brasileira e, portanto, são apenas queijos produzidos no país (gráfico 1).

Minas Gerais representado em pelo menos uma amostra dentre todos os tipos de queijo, é o estado com maior captação de leite cru para laticínios de todo o Brasil de acordo com a Estatística da Produção Pecuária ocupando importante posição no mercado de queijos e, como tal, com uma representatividade importante no mercado dos tipos de queijos selecionados (IBGE, 2021).

Atualmente, o brasileiro consome em média 5,8g/dia de queijo, sendo que o maior consumo está entre a população idosa, reunindo toda a faixa etária igual ou acima de 60 anos de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018 (POF) (IBGE, 2020), dado que se repete na POF 2008-2009 (IBGE, 2010), indicando provavelmente um padrão de consumo entre os idosos brasileiros. Considerando que o queijo é um produto pronto para consumo, é comumente ingerido sem nenhum processamento térmico ou equivalente. Processamentos esses que poderiam suprimir os microrganismos presentes, consumidos pela faixa etária mais fragilizada devido ao envelhecimento, e de forma geral, mais suscetível a doenças. O queijo é também um alimento comumente ofertado em hospitais, até mesmo entre imunossuprimidos (BELL et al., 2020; TOENGES et al., 2021; VICENSKI; ALBERTI; AMARAL, 2012) embora já se haja estabelecido há algum tempo que para pacientes transplantados, por exemplo, o consumo de queijo deva ser substituído por produto pasteurizado como uma opção mais segura de alimentação (CDC, 2000).

Além disso os benefícios relacionados ao consumo de queijo em idades precoces têm favorecido o consumo ainda nas primeiras fases da infância. Estudo realizado na Europa, que acompanhou crianças durante 5 anos, identificou que há efeito preventivo contra dermatite atópica e alergia alimentar aos 6 anos, relacionados ao consumo de queijos variados aos 18 meses de vida. Um efeito acrescido e independente do efeito protetor de outras refeições. Segundo o autor, o efeito pode estar ligado a um provável aumento na diversidade da microbiota intestinal (NICKLAUS et al., 2019).

Sem dúvidas os queijos são uma importante opção de fonte de proteínas, bastante utilizada por pessoas com dietas mais restritivas, tanto associadas à comorbidades como também como uma boa opção para vegetarianos e flexitarianos. Seu consumo é inclusive estimulado, particularmente quando considerado seu potencial probiótico (DA SILVA; SILVA; DA CRUZ, 2022). Queijos probióticos possuem diversos benefícios já demonstrados na literatura em modelos animais como redução de processo inflamatório em pulmão (VASCONCELOS et al., 2019), inibição de crescimento de cálculos renais (MARTINS et al., 2018), e mesmo atenuação da pressão arterial sistólica e diastólica em humanos (LOLLO et al., 2015).

Estudo piloto em queijo parmesão evidenciou a associação entre microrganismos no queijo e saúde do consumidor demonstrando, in vivo, que bactérias abrigadas pelo queijo podem colonizar e mesmo persistir no intestino daqueles indivíduos que tem por hábito o consumo diário desse queijo (MILANI et al., 2019). Bactérias lácticas de alimentos também já foram relacionadas com o microbioma intestinal humano através de análises genômicas comparativas, sugerindo os alimentos fermentados como uma fonte de bactérias ácido lácticas para o intestino humano (PASOLLI et al., 2020). Corroborando a importância do processo de interação entre o homem e os microrganismos presentes em seu alimento e de sua contribuição para a saúde humana

Em resumo, considerando a vulnerabilidade do público de maior consumo de queijo no Brasil, os idosos, e mesmo o consumo por imunossuprimidos, hospitalizados, pessoas com dietas restritivas e até mesmo bebês e crianças, a segurança do queijo torna-se ainda mais relevante, especialmente para estes grupos de indivíduos. Esses grupos poderiam se beneficiar de estratégias domiciliares que permitam a eliminação ou redução de microrganismos através de cozimento tradicional, aquecimento ou utilização de micro-ondas entre outros (THUM et al., 2020). Além dos processamentos térmicos tradicionais, novas tecnologias que têm sido investigadas para o uso em alimentos e incluem: entre as térmicas, principalmente o aquecimento ôhmico e entre as não térmicas, o ultrassom, plasma frio, irradiação, alto processamento hidrostático, campos elétricos pulsados, luz pulsada e a luz ultravioleta (UV) (DELORME et al., 2021). No caso da UV como já demonstrada a qualidade de descontaminação e sem gerar alteração no queijo, em seus valores de pH, teor de umidade e oxidação lipídica em queijo fresco Kashar, por exemplo (KEKLIK et al., 2019).

## 5.2 ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO

A maior parte das MGNs encontradas em nosso estudo se mostraram resistentes na etapa da pré-seleção. A etapa de pré-seleção possibilita um resultado de diagnóstico rápido indicando qual antibiótico é efetivo sobre a microbiota cultivável presente e pode representar uma alternativa para evitar o uso ineficaz e excessivo de medicamentos. Uma maneira de reduzir o tempo de diagnóstico como as ferramentas moleculares o fazem, porém com o custo reduzido dos métodos convencionais. Outro ponto relevante é a demora no diagnóstico que pode agravar o estado do paciente, e tem maior custo, acrescido do fato de que alguns mecanismos de resistência (e mesmo a viabilidade da bactéria) ainda não são detectáveis por técnicas exclusivamente moleculares, prejudicando a previsão do real fenótipo de resistência (BURILLO; BOUZA, 2022).

A metodologia utilizada permite também avaliar o conjunto de microrganismos e o que decorre de suas associações e vem sendo corroborado pela literatura identificando que a avaliação microbiológica da resistência com análise de apenas uma espécie isolada pode estar negligenciando uma série de microrganismos e fatores que influem na resistência e ocorrem no coletivo, na microbiota. Um conhecido mecanismo que ocorre em comunidade é o quorum sensing, com um sistema de comunicação célula a célula e seu programa genético cooperativo que aumentam a capacidade de colonização da população microbiana no hospedeiro infectado. Além disso, o quorum sensing permite interações complexas e influenciam o processo evolutivo da RA incluindo, por exemplo, relações de epistasia onde a expressão de genes que não são codificadores de resistência podem influenciar o processo de RA (HERNANDO-AMADO; SANZ-GARCÍA; MARTÍNEZ, 2019).

Em conjunto também ocorrem os biofilmes. Embora os mecanismos da correlação entre a formação do biofilme e a RA ainda permanecem sob investigação, já se demonstrou que a capacidade de formar biofilmes, uma comunidade microbiológica complexa imersa em uma matriz polissacarídica extracelular, de produção própria que permite grande proteção do meio externo e que é um dos mecanismos usados pelas bactérias para resistir a ação de antimicrobianos. Estudos indicam que quando inseridas nesta matriz, as bactérias podem ser até mil vezes mais resistentes do que aquelas encontrados no estado planctônico (ALVES et al., 2021).

### 5.3 RESISTÊNCIA FENOTÍPICA – VISÃO GERAL

A qualidade microbiológica dos queijos analisados, resumidos na tabela 4, pode estar relacionada com as condições higiênico-sanitárias do seu processo produtivo (SIMAS; AMARAL; SANTOS, 2021) ao revisar artigos sobre as condições sanitárias de queijarias em diferentes regiões do Brasil nos últimos 10 anos associou a baixa qualidade dos queijos produzidos às condições sanitárias inadequadas na maioria das queijarias avaliadas. Os itens não conformes com a legislação acompanharam todo o processo produtivo, desde a matéria prima.

A qualidade de um alimento depende em grande parte da qualidade de sua matéria prima. Em 2018 foi iniciado o Plano de Qualificação de Fornecedores de Leite (PQFL), através da Instrução Normativa nº77 que destaca entre outros temas a importância da aplicação das Boas Práticas Agropecuárias com ações adotadas ainda na propriedade rural com a finalidade de produção de leite de qualidade e seguro (BRASIL, 2018).

Em muitos casos a contaminação no leite tem sido relacionada à presença de doenças como a mastite na pecuária leiteira (LANGONI, 2013). Um tratamento inadequado de mastite pode ter como produto final um leite com presença de bactérias patogênicas e também com RA trazendo risco a toda a cadeia produtiva de laticínios e especialmente em produtos fabricados com leite cru (LANGONI, 2013; ULISSES et al., 2022). Vale ressaltar que para o queijo parmesão, analisado em nosso estudo, a legislação permite o uso de leite cru para sua produção.

Outros riscos podem também estar associados ao leite, como a presença de resíduos de antibióticos, que além do risco toxicológico associado a seu consumo, aumenta a pressão seletiva e favorece a sobrevivência de bactérias resistentes a antibióticos interferindo diretamente na qualidade e seguridade dos produtos lácteos trazendo riscos ao consumidor e também ao ambiente (SIVIERO et al., 2021).

Além da condição higiênico-sanitária do leite, outros dois pontos se destacam como pontos significativos de contaminação no processo de produção de queijos, as condições de fabricação e o sistema de refrigeração ao longo da cadeia produtiva (RODRIGUES; FERREIRA, 2019).

Queijos vendidos ilegalmente e, portanto, sem garantias de que sigam os parâmetros estabelecidos pela legislação, vendidos em feiras ou mesmo vendas diretas em domicílio foram avaliados em 11 municípios do estado de Mato Grosso. Foram avaliados queijos de alta e média umidade com relação a sua qualidade higiênico-sanitária e o perfil de sensibilidade

antimicrobiana de *Escherichia coli* isolados. O estudo demonstrou que a grande maioria das amostras apresentavam baixa qualidade higiênico-sanitária e se apresentavam fora dos padrões exigidos pela legislação. A RA mais elevada ocorreu em ampicilina, com 3,68% das amostras com *E. coli* resistente (PENA; FREITAS; CASTRO, 2021). Embora a Ampicilina tenha também se destacado em nossas análises, os índices de resistência encontrados foram muito superiores. Estes podem estar relacionados ao maior número de espécies que a metodologia nos permite avaliar, e, portanto, traz um retrato mais próximo da realidade microbiológica do alimento e não apenas do microrganismo.

O crescimento microbiológico tem maior probabilidade de desenvolvimento em alimentos com maior atividade de água. Considerando apenas este fator, queijos com maior atividade de água tem maior risco associado de crescimento de microrganismos. Embora queijo apresentando umidade acima do preconizado pela legislação seja encontrado no país (ANDRADE; MACHADO; GOMES, 2022). A tabela 4 traz indícios de que com relação a resistência a antibióticos outros fatores podem também atuar de forma que a umidade não seja o único fator determinante.

Nossas análises apresentaram valores altos de resistência, incluindo a amostra de menor umidade, tipo parmesão (Q4), e neste caso de um queijo orgânico. Produtos orgânicos de origem animal não têm os antibióticos como substâncias de uso permitidas. Embora exceção seja feita pela Portaria nº 52, de 15 de março de 2021, que prevê que em situações em que o animal esteja em sofrimento ou risco de morte, e o tratamento feito com as substâncias permitidas para o sistema orgânico não esteja sendo efetivo, poderá ocorrer o uso de substâncias artificiais, como os antibióticos. Entretanto, cumprem regras estritas para manter a certificação como orgânico, dentre estas, que seu uso só poderá ocorrer até duas vezes em período de um ano e deverá ter período de carência dobrado para que seja considerado orgânico (BRASIL, 2021).

São raríssimos os estudos de RA em queijos orgânicos. Esses estudos podem trazer informações importantes para compreender a presença de mecanismos de RA, de que maneira ocorrem e ainda se há alguma relação de seleção pelo uso das substâncias permitidas pela legislação e que vem sendo propostas como alternativa por seu efeito antibacteriano, como o Própolis na produção de leite, por exemplo (NASCIMENTO et al., 2022). Além disso, pode colaborar com a compreensão da evolução de RA, especialmente por ser um processo produtivo orgânico e, portanto, com esperada redução de uso de antibióticos frente ao processo produtivo convencional. Essa redução do uso de antibióticos tem sido relacionada com menor frequência de resistência identificadas em bactérias isoladas de cultivo orgânico quando comparadas ao convencional. Na Nova Zelândia, estudo em cepas de *E. coli* provenientes do solo de fazendas

leiteiras orgânicas exibiram uma frequência menor de resistência aos antimicrobianos testados do que as cepas de fazendas leiteiras convencionais (AMOAF0 et al., 2022). Resíduos de antibióticos foram indetectáveis em amostras de leite de cultivos orgânicos, mas prevalentes entre as produzidas convencionalmente (WELSH et al., 2019). Entre o leite convencional e seus derivados, incluindo o queijo, resíduos de antibióticos têm sido identificados, com prevalência dos antibióticos beta-lactâmicos e tetraciclina (SIVIERO et al., 2021).

Vale salientar que os beta-lactâmicos, destacados por sua alta resistência, estão presentes na lista de Antimicrobianos Criticamente Importantes para Medicina Humana organizada pela OMS. Em sua 6ª edição, a mais recente, as 4 diferentes classes de Beta-lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenêmicos e Monobactâmicos) figuram na categoria de maior relevância, os criticamente importantes. Destaque para as cefalosporinas (incluindo de terceira geração como a Ceftazidima) como prioridade máxima, encontrada em 17/20 (85%) das amostras de queijo. A lista tem a função de auxiliar o gerenciamento para um uso mais parcimonioso dos antimicrobianos de uso mútuo entre humanos e animais considerando a cadeia produtiva de alimentos como um fator de risco para RA (WHO, 2019).

Neste contexto, os resultados encontrados em nossas análises, que trazem os antibióticos considerados criticamente importantes como os que apresentaram maior resistência entre as MGNs de cinco tipos de queijos no Brasil, sendo o queijo um alimento proveniente de cadeia de produção animal, reforçam a necessidade e importância de maior prudência no uso destes antibióticos.

#### **5.4 RESISTÊNCIA GENOTÍPICA – VISÃO GERAL**

Os GRs a antibióticos estão amplamente distribuídos em diversos ambientes, incluindo alimentos (YANG et al., 2022) incluindo os queijos, principalmente os mais estudados, os de alta umidade (DE PAULA et al., 2018). Em nossas análises oito diferentes genes de resistência foram encontrados em 29,4% (50/170) das MGNs, totalizando 83 amplicons encontrados, com maior prevalência para os genes Integron de classe 1 e 2.

#### 5.4.1 Plataforma Genética – Integrons

Integrons são plataformas genéticas que podem funcionar como sistemas de aquisição de genes, e são por vezes considerados como “hot spots”, utilizando um termo da ecologia que remete a uma “região” de grande diversidade biológica. Possuem papel importante na adaptação bacteriana, permitindo a evolução genômica uma vez que têm a capacidade de capturar e expressar novos genes conferindo vantagens adaptativas, incluindo a RA. O conteúdo dos cassetes gênicos presentes em um integron refletem o retrospecto de eventos adaptativos deste integron (FONSECA; VICENTE, 2022).

Integrons permitem uma resposta rápida a alterações ambientais, como a presença de antibióticos, possível pela capacidade de armazenar genes, como um repositório, e de recombiná-los para expressão quando necessário. Permitem, portanto, que a bactéria concentre GRs a diversos antibióticos, e com o benefício adicional de limitar o custo associado a ter a presença de um gene de resistência (GR) mesmo na ausência do seu antibiótico alvo (FONSECA; VICENTE, 2022; RICHARD et al., 2022).

Outro fato é o importante papel na disseminação da resistência representando uma rota significativa via transferência horizontal de genes facilitando o aparecimento de fenótipo multirresistente (COUTINHO et al., 2022). Considerando seu potencial de disseminação é importante salientar que integrons foram os genes com maior dispersão entre os GRs pesquisados, presentes em pelo menos 1 amostra de 4 dos 5 tipos de queijo analisados.

Três classes principais de integrons (classes 1, 2 e 3) são caracterizadas por sua forte ligação com cassetes de genes de resistência a antibióticos e têm estado historicamente associados à disseminação destes. Podem ser plataformas não mobilizáveis incorporadas no cromossomo ou possuir íntima associação com elementos genéticos móveis, inclusive sendo chamados de integrons móveis, comumente associados a transposons (FONSECA; VICENTE, 2022). Os integrons são um dos principais vetores de resistência a antibióticos disseminados entre bactérias por sua capacidade de transferência de genes, especialmente em bactérias Gram-negativas (SABBAGH et al., 2021).

O integron de classe I tem a maior frequência de detecção entre os integrons, tendo os seus cassetes mais detalhadamente descritos na literatura. Em nossas análises ocupou o segundo lugar em número, apresentando números inferiores aos encontrados para o integron 2. Alguns estudos que avaliam a presença de integron o fazem apenas investigando o integron de classe 1, o que pode colaborar para a maior frequência de resultados positivos, na literatura, desta

classe em detrimento das outras (CHOWDHURY et al., 2022; WANG et al., 2020).

Desta maneira, nossas análises identificaram integron 1 em 30% (6/20) dos queijos e representam 20,5% (17/83) dos amplicons. Foram os genes pesquisados com distribuição mais ampla, presente em 4 tipos diferentes de queijo. Os valores são relevantes considerando sua proximidade com os encontrados na clínica médica, onde o valor de prevalência é cerca de 22% a 55%, entre bactérias Gram-negativas isoladas (SABBAGH et al., 2021). Comumente encontrado entre membros da ordem *Enterobacteriales* como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* (JOY et al., 2021). Integron classe 1 também já foi identificado em *E. coli* dos filogrupos A e C em bezerros leiteiros com meningite e septicemia (LOUGE URIARTE et al., 2022). Do mesmo modo, identificado em alimentos de cantina escolar na China em 31.3% de cepas de *Salmonella* spp., *E. coli* e *S. aureus* (WANG et al., 2020). Encontrado em 40% dos coliformes identificados em água potável em Bangladesh (CHOWDHURY et al., 2022) e mesmo em leite cru não mastítico, em 28,1% das *E. coli* (YOON; LEE, 2022) e 81,6% das *P. aeruginosa* (MOBASSERI et al., 2021).

Além disso, são poucas as pesquisas de presença de integron em queijo na literatura e ainda mais raras nos últimos anos. Análise de resistoma em Queijo Minas Frescal também identificou maior quantidade de integron classe 2 (97%) que o integron classe 1 (57%), os valores mais altos encontrados pela autora podem estar relacionados as bactérias Gram-positivas também avaliadas (DE PAULA et al., 2018).

Valores superiores de Integron 2 em relação ao integron 1, também foram encontrados em nossas análises, com presença de int2 em 50% (10/20) dos queijos e em 33,7% (28/83) dos amplicons. Estes resultados podem estar relacionados a espécie de microrganismo prevalente em cada queijo. Entre bactérias Gram-negativas de amostras clínicas, revisão sistemática identificou prevalência de integron classe 1 em *Acinetobacter* spp enquanto integron classe 2 em *Shigella* spp. (PORMOHAMMAD et al., 2019).

Embora integrons de classe 2 tenham aparente menor distribuição e características moleculares relativamente conservadas, eles ainda podem gerar disseminação clínica e expressão de resistência a drogas (LU et al., 2022). Além disso, têm se mostrado prevalentes em amostras clínicas de bactérias Gram-negativas como *Acinetobacter* spp, *Shigella* spp, *Salmonella* spp e *Pseudomonas* spp. (SABBAGH et al., 2021) e em *A. baumannii* de pacientes de unidade de terapia intensiva (DEYLAM SALEHI et al., 2017).

Integron 3, embora já encontrado em suco de laranja, servido a pacientes de hospital no Rio de Janeiro (TROCADO et al., 2021), possui um número reduzido de pesquisas avaliando sua presença em laticínios e ainda assim quando avaliadas apresentam resultado negativo como

encontrado em nossas análises. Ausência em leite cru (MOBASSERI et al., 2021) e mesmo em queijo Surk, um tipo de queijo árabe (KÜREKCI; ARKADAŞ; AVŞAR, 2016).

Portanto, considerando o resultado geral de integrons, metade dos queijos apresentavam pelo menos uma das plataformas genéticas integron classe 1 ou integron classe 2. Também já encontradas em amostras de leite cru, com *P. aeruginosa* com presença simultânea de integron 1 e 2 em 13,3% destas (MOBASSERI et al., 2021). Em nossas análises estes números alcançaram 4,7% (8/170) das MGNs, porém, 30% (6/20) dos queijos e fomentam o questionamento sobre o potencial de disseminação de RA em amostras de alimento com presença de integron.

#### 5.4.2 Genes de Resistência a tetraciclina

Em nossas análises os genes *tet* foram identificados em 3 dos 5 tipos de queijo. Os queijos parmesão e prato, os de menor umidade do estudo não apresentaram os GRs a tetraciclina. Redução de microbiota resistente à antibióticos, por efeito da maturação, já foi demonstrada em carne (LOPEZ et al., 2020) e pode ter influenciado o resultado negativo para genes *tet* no queijo parmesão e prato.

Genes de resistência a classes de tetraciclina, aminoglicosídeos e cloranfenicóis, surpreendentemente, já foram identificados inclusive em culturas starter (iniciadoras) e em protetoras com capacidade de transferência destes (ZARZECKA; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA; ZADERNOWSKA, 2022).

Os queijos cottage, ricota e minas padrão o de muito alta e alta umidade, respectivamente, apresentaram os dois genes de resistência testados, *tetA* e/ou *tetB*. Hammad (2022) encontrou os genes *tetA* e *tetB* em 2,1% e 0,71% dos isolados de *E. coli* de queijo fresco produzido com leite cru.

Genes *tetA* e *tetB* são os mais comuns genes de resistência identificados em *Salmonella spp.* oriundos de alimentos ou animais de produção sendo mais comumente isolados de frango e porco crus (PAVELQUESI et al., 2021). Comparativamente, *E. coli* isolada de gado apresentou menores taxas de resistência a tetraciclina que as oriundas de outros animais como porcos e frango (SONG et al., 2022).

Flórez (2014) analisando 20 tipos de queijo diferentes constatou que apenas 3 queijos não apresentaram pelo menos 1 dos 6 genes *tet* pesquisados, a maioria apresentou mais que um

gene *tet* simultaneamente. Em nossas análises, dois queijos, sendo uma ricota e um minas padrão apresentaram essa condição, com *tetA* e *tetB* presentes na mesma amostra. A sobreposição pode estar relacionada a dois mecanismos diferentes estabelecidos por cada um desses genes. Bomba de efluxo no caso do gene *tetA* e proteção ribossômica em *tetB* (BERGLUND et al., 2020).

#### 5.4.3 Genes produtores de beta-lactamases

Os antibióticos beta-lactâmicos incluem as penicilinas, as cefalosporinas, carbapenêmicos e os monobactâmicos e estão entre os medicamentos mais comumente prescritos nos EUA para hospitalizados (IMBURGIA; KUSSIN, 2022).

Resistência vem sendo identificada em bactérias que adquiriram a capacidade de produzir enzimas, denominadas beta-lactamases (*bla*), capazes de promover a hidrólise do anel beta-lactâmico presente em todas as classes, inativando-os. A associação com drogas inibidoras de beta-lactamases, como o sulbactam, visam restaurar a ação do antibiótico contra a bactéria produtora da enzima (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012). Ainda assim, nossas análises identificaram resistência frente ao antibiótico ampicilina-sulbactam em todos os tipos de queijo em pelo menos 3 das 4 amostras. Mahanti (2020) identificou que *E. coli* com resistência a beta-lactâmicos foi mais prevalente em leite de animais com mastite ou mastite subclínica que de bovinos saudáveis. Em nossas análises, apenas o queijo parmesão não apresentou gene de resistência a beta-lactâmicos.

Os genes *bla<sub>ctx</sub>*, *bla<sub>tem</sub>* e *bla<sub>shv</sub>* têm reconhecido potencial como ESBL. São, por exemplo, os tipos mais frequentes de genes ESBL identificados na Nigéria (TANKO et al., 2020). Em análise de produtos lácteos a caracterização molecular de prevalência de ESBL encontrou entre as variantes dominantes o gene *tem*, seguidas de *shv* e *ctx-M*, predominantemente presentes em bactérias Gram-negativas (ALKHAFAJE; OLAMA; ALI, 2022). A alta expressão de *bla<sub>ctx-M-27</sub>* tem sido associada à resistência à ceftazidima e cefepima dentre *E. coli* uropatogênicas produtoras de ESBL (MAEYAMA et al., 2018). Em nossas análises, o gene *ctx* foi encontrado em MGN resistente a cefepima (cefalosporina de 4ª geração) em ricota. Porém, testes de confirmação de produção de ESBL são necessárias, considerando que em cefalosporinas de terceira geração, Hammad (2022) identificou cepas de *E. coli* resistentes, porém não produtoras de ESBL em queijo fresco produzido a partir de leite cru, corroborando que a resistência às

cefalosporinas de terceira geração não são um indicador confiável, que possa garantir isoladamente, a produção de ESBL (TAMMA; HUMPHRIES, 2021).

Genes produtores de beta-lactamase vêm sendo isolados na clínica, onde os genes *shv*, *tem* e *ctx* têm sido frequentemente identificados em *E. coli* uropatogênicas (MATINFAR et al., 2021) e também já encontrados em queijo, em análise metagenômica em queijo Minas Frescal, o gene *tem* foi detectado em 91,4% das amostras (DE PAULA et al., 2018).

Em parecer científico encomendado pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) o *ctx-M* foi identificado como um dos genes de prioridade máxima para a saúde pública na produção de alimentos e nos alimentos com contaminação via ambiental (KOUTSOUMANIS et al., 2021). Em nossas análises, *ctx* foi encontrado entre os beta-lactâmicos (penicilina isolada e em associação e cefalosporina) e também em não beta-lactâmicos. Resistência a antibióticos além dos beta-lactâmicos já foram identificadas em outras classes como fluoroquinolonas e trimetoprim-sulfametoxazol de isolados de *E. coli* ST131 produtores de *ctx-M* (ROGERS; SIDJABAT; PATERSON, 2011).

Embora *shv-1* e *tem-1* sejam incapazes de inativar as cefalosporinas de terceira geração, eles são capazes de inativar a ampicilina (MATINFAR et al., 2021). Corroborando os resultados encontrados em nossas análises, onde resistência fenotípica a ceftazidima foi identificada em todos os tipos de queijo, e os genes *shv* e *tem* tiveram sua identificação restrita as MGNs resistentes aos antibióticos ampicilina e ampicilina-sulbactam.

Importante salientar que o padrão de predominância dos genes de resistência pode variar de acordo com a espécie. Ramachandran & Sudharsan (2022) analisando bactérias Gram-negativas isoladas de amostras clínicas, por exemplo, encontrou prevalência do gene *tem* em *E. coli* e *shv* em *Klebsiella spp.*, enquanto o gene *int1* foi mais prevalente em *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os genes *per*, *veb* e *oxa*, também capazes de produzir ESBLs, não foram encontrados nos queijos analisados. São raramente pesquisados em queijos ou mesmo em produtos lácteos. O gene *per* já foi encontrado em amostras de *A. baumannii* de carne animal crua (ELBEHIRY et al., 2021), porém embora já pesquisado não foi encontrado em queijos (GESER; STEPHAN; HÄCHLER, 2012; KHOSHBAKHT; SHAHED; ASKI, 2014), o gene *veb* já foi encontrado em 3,9% de amostras de alimentos prontos para consumo da China, abrigados em integron de classe 1 (LEI et al., 2020), também identificado em poucas amostras de produtos lácteos (KHOSHBAKHT; SHAHED; ASKI, 2014) e em 0,28% de amostras de leite (BANDYOPADHYAY et al., 2018). O gene *oxa* já identificado em pequeno número de produtos lácteos fermentados vendidos em escolas secundárias em Benin (MAJOIE et al., 2021)

e também em queijo no Egito (HAMMAD; ISHIDA; SHIMAMOTO, 2009) porém não identificado em isolados de *E. coli* de leite cru em queijo artesanal no Sul do Brasil (PARUSSOLO et al., 2019).

#### 5.4.3.1 *Beta-lactamase com ação em carbapenêmicos*

Os carbapenêmicos são considerados uma das últimas opções de tratamento restantes para pacientes infectados com bactérias resistentes a vários outros medicamentos disponíveis. Quando a resistência aos carbapenêmicos é encontrada, o tratamento geralmente é limitado a antibióticos como a colistina, que podem ser menos eficazes e ter mais efeitos colaterais (EFSA, 2017b; RAGHEB; GOVINDEN; OSEI SEKYERE, 2022).

Além do efeito esperado sobre as penicilinas, algumas beta-lactamases como as de classe D hidrolisam carbapenêmicos. O gene *oxa-48*, por exemplo, codifica uma carbapenemase importante e foi descoberto em um isolado hospitalar de *K. pneumoniae* resistente a todos os antibióticos beta-lactâmicos em 2001 (ALKHAFAJE; OLAMA; ALI, 2022; POIREL et al., 2004), e permanece sendo encontrado em isolados hospitalares em *K. pneumoniae* e *E. coli* (NABTI et al., 2021).

*Oxa-48* foi designado como um dos genes de prioridade máxima para a saúde pública na produção de alimentos e alimentos com contaminação via ambiental. Têm sido frequente a ocorrência de *oxa-48*, entre outros genes de resistência à antibióticos críticos, em água de irrigação contaminada e esterco e que são também comuns em isolados humanos clínicos (KOUTSOUMANIS et al., 2021).

Pode haver variação de acordo com a região produtora ou mesmo da produção, uma vez que *oxa-48* tenha sido identificado em cepas de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL isoladas de 150 amostras de leite de vaca cru coletadas na Turquia (UYANIK et al., 2022), onde o próprio autor ressalta que os valores estão acima do encontrado em outros estudos semelhantes. Al (2020) não encontrou *oxa-48* em membros da família *Enterobacteriaceae* de 427 amostras de leite cru, também na Turquia.

Em nossas análises *oxa-48* foi identificado apenas no queijo minas padrão, frente ao antibiótico ertapenem, um carbapenêmico, em amostra de queijo produzido no estado do Rio de Janeiro.

No Brasil, embora *oxa-48* já tenha sido encontrado previamente em ambiente hospitalar

em Porto Alegre (SCHERER; CALVETTI, 2017) em outras regiões do país não têm sido encontrados recentemente, como em *K. pneumoniae* em pacientes de hospitais em Manaus (NAKAMURA-SILVA et al., 2022) e mesmo em bactérias Gram-negativas de hospitais de Pernambuco (SOARES et al., 2021) e em *P. mirabilis* com resistência clínica a carbapenêmicos (OLIVEIRA et al., 2020).

Embora raramente encontrado em alimentos no mundo (MAIRI et al., 2018) já foi identificado em carne de frango na Argélia (CHAALAL et al., 2021). No Brasil é pouco pesquisado. Não foi identificado em peixe (PROIETTI- JUNIOR et al., 2021) mas encontrado em queijo Minas Frescal (SILVA et al., 2020a).

Os genes *kpc*, *ndm*, *imp*, *vim*, e *ges* também com ação em carbapenêmicos não foram identificados nos queijos analisados. A pesquisa destes genes em queijo é rara e não tem sido encontrada, embora *imp*, *vim* e *kpc* já tenham sido identificados em cepas Gram-negativas isoladas de leite cru na Turquia (UYANIK et al., 2022). O gene *ndm*, entre bactérias Gram-negativas de amostras clínicas, não tem sido identificado ou encontrado em número reduzido de amostras (NABTI et al., 2021; RAMACHANDRAN; SUDHARSAN, 2022), porém, já foi identificado em leite mastítico (GHATAK et al., 2013).

## 5.5 RESISTÊNCIA FENOTÍPICA E GENOTÍPICA POR TIPO DE QUEIJO

### 5.5.1 Queijo Parmesão

Todas as nossas análises foram realizadas em queijos inteiros ou fracionados de fábrica e em embalagem original e não a granel, de forma a permitir resultados que melhor representem a influência do processo produtivo sobre a presença de microrganismos e não os oriundos de possíveis contaminações provenientes de manipulação durante sua comercialização, e que poderiam ainda agravar os resultados encontrados, nesta pesquisa, para o consumidor final. De

acordo com os resultados encontrados em análises comparativas entre formas de comercialização em queijo parmesão ralado mostrando menor qualidade microbiológica e maior número de amostras ultrapassando os limites da legislação em produtos vendidos a granel em relação a produtos embalados de fábrica (AGUILAR et al., 2016; ANDRADE et al., 2022)

Estudos que avaliam a qualidade microbiológica de queijo parmesão são escassos,

apesar da relevância diante de seu consumo significativo no país. Características do produto como a baixa umidade, podem estar relacionadas com os resultados encontrados em Campos Gerais (PR) em que as amostras se mostravam dentro dos parâmetros exigidos pela legislação embora quantidade significativa de bactérias mesófilas tenha sido encontrada entre as amostras (JASTER et al., 2014). Entretanto, Queijo parmesão com umidade acima da regulamentada foi identificado em Belo Horizonte, em amostra apresentando contaminação, com valor para coliformes totais (35°C) acima do padrão estabelecido pela legislação (ANDRADE; MACHADO; GOMES, 2022). Pereira (2016) também encontrou umidade acima da permitida em metade das marcas avaliadas, mas sem avaliação de crescimento bacteriano. Na região metropolitana do Rio de Janeiro 53,3% dos queijos parmesão avaliados estavam com valores acima do permitido pela legislação que regulamenta a qualidade microbiológica, 20% estavam com umidade superior ao limite máximo permitido (TROMBETE; FRAGA; SALDANHA, 2012). Nesta perspectiva, é possível que esta associação entre maior umidade do que a legislação estabelece e maior contaminação no queijo parmesão (QPms) sejam uma condição também encontrada em nossas análises, embora a umidade não tenha sido avaliada.

No caso, do queijo parmesão ralado (Q1, Q2 e Q3) a legislação permite o uso de aditivos (BRASIL, 1997f). Alguns aditivos possuem atividade antimicrobiana conhecida como o Ácido Sórbico (FARIAS et al., 2021) e a Natamicina (ATTA et al., 2015) e podem ter contribuído para a qualidade microbiológica encontrada.

Algumas bactérias podem resistir a todo o processo de produção do QPms desde suas etapas mais basais. Milani (2019) após identificar as comunidades microbianas em amostras retiradas de cinco diferentes locais da cadeia de produção do queijo parmesão, confirmou que o queijo continha microrganismos do intestino bovino, leite e mesmo do ambiente onde este queijo foi produzido. Desta forma, bactérias abrigadas pela microbiota intestinal bovina ou pelo ambiente modulavam a microbiota do leite bovino e, conseqüentemente, do queijo. Além disso, identificou-se a colonização transitória do intestino humano por cepa presente neste queijo.

Avaliação de perfil de RA em 4 amostras de queijo parmesão nas espécies *Salmonella anatum*, *S. infantis* e *S. schwarzengrund* não identificou nenhuma das espécies alvo do estudo e, portanto, não houve avaliação de RA (CUNHA- NETO et al., 2020). Artigos avaliando RA em microbiota de QPms não foram encontrados para estabelecer comparações. Embora diferentes em sua produção e maturação o queijo parmesão possui semelhanças, como sabor e textura, com os queijos Grana Padano e Parmigiano Reggiano. Sendo estes produzidos na Itália e com denominação de origem protegida. Embora alguns estudos recentes avaliem microbiologicamente o Grana Padano, estes estão frequentemente restritos à sua influência

sobre as características nutricionais, tecnológicas e organolépticas (GIRAFFA, 2021). Avaliação de RA em Grana Padano e Parmigiano Reggiano feita apenas para as espécies de Gram-positivas, *Lactobacillus spp.* encontraram valores expressivos de resistência a beta-lactâmicos, cefalosporinas, aminoglicosídeo (gentamicina) e sulfonamida (sulfametoxazol-trimetoprima). GRs não foram avaliados (BELLETTI et al., 2009).

Em queijo Grana Padano de 6 genes *tet* testados em 1 amostra, nenhum destes genes foi encontrado (FLÓREZ et al., 2014), em nossas análises QPrm também não apresentou os genes de resistência a tetraciclina testados.

Os resultados da avaliação genotípica no queijo de menor umidade do estudo, o QPms, mostram que 3 das 4 amostras analisadas não apresentaram nenhum dos 20 genes testados o que pode estar relacionado com a redução da microbiota contaminante devido ao seu processo de cura prolongada, uma maturação mínima de 6 meses podendo chegar a 12 meses (BRASIL, 1997). Essa redução da microbiota pode consequentemente reduzir os GRs, além disso, a diminuição dos GRs pode estar relacionada ao custo associado a manter esses GRs em ausência de antibiótico. Como a resistência aos antibióticos geralmente resulta em ganho de função, há um custo biológico associado. Este custo pode, quando em ausência do antibiótico alvo, favorecer bactérias que não possuem ou não expressam este gene, contribuindo assim, para o processo de perda deste gene (DEPARDIEU et al., 2007).

Embora a quantidade de GRs encontradas sejam baixas, pode haver relativa diversidade de resistência em virtude da presença de integron 1 e 2, e, portanto, dois sistemas genéticos na mesma amostra que podem abrigar genes de resistência a diversos antibióticos diferentes.

Importante salientar que a amostra de queijo orgânico não apresentou nenhum dos 20 genes analisados, até onde sabemos somos o primeiro a avaliar resistência a antibióticos em queijo parmesão orgânico no Brasil. No país, pesquisa de genes de resistência em *S. aureus* em outro tipo de queijo orgânico, o minas frescal, com comparação com *S. aureus* de cultivo convencional, não encontrou diferença significativa entre a resistência apresentada entre ambos os cultivos (Abreu, 2021). Essa diferença pode estar relacionada a espécie avaliada, nesse caso, uma bactéria Gram-positiva, ou mesmo aos genes analisados.

Pelo nosso conhecimento essa é a primeira identificação de genes dos sistemas integron de classe 1 e 2 em queijo Parmesão no Brasil.

### 5.5.2 Queijo Prato

Diversos benefícios associados ao consumo de queijo prato com probióticos já foram demonstrados na literatura em modelos animais, como redução de processo inflamatório em pulmão (VASCONCELOS et al., 2019), inibição de crescimento de cálculos (MARTINS et al., 2018). Apesar desses benefícios, queijo prato com qualidade insatisfatória e em desacordo com a legislação foram identificadas em 25% das amostras coletadas no Recife (SILVA, 2011). Em nossas análises, avaliação de resistência apresentou maiores valores entre os antibióticos beta-lactâmicos, que estão entre os antimicrobianos criticamente importantes para a medicina humana (WHO, 2019). Avaliação de RA em 31 amostras de queijo prato foi realizada no Mato Grosso, com identificação de apenas 2 cepas dos Gram-negativos *Salmonella infantis* e *Salmonella schwarzengrund*, apresentando resistência apenas a trimetoprima e sulfonamida (CUNHA- NETO et al., 2020). O resultado pode estar relacionado ao pequeno número de microrganismos identificados e podem não refletir a realidade de resistência apresentada por toda a microbiota do alimento.

O queijo prato está entre os mais populares, o segundo mais consumido no Brasil, usado especialmente em sanduíches e lanches (USDA, 2021). Seu consumo sem processamento térmico ou equivalente pode levar risco a grupos que demandam atenção a saúde. Redução de microrganismos são alvo de pesquisas aplicando tecnologia em queijo prato. Desde embalagem com capacidade de redução de crescimento microbiano por redução de pH (SILVA et al., 2020b) ou mesmo utilização de radiação ultravioleta em queijo prato (QPrt) fatiado processado, sob a ótica do consumidor (DELORME et al., 2021). Apesar disso, a caracterização da microbiota do QPrt é ainda incipiente e maior número de estudos poderiam tornar essa avaliação mais robusta permitindo a busca por soluções e tecnologias adequadas à realidade encontrada no mercado brasileiro.

Nossas análises genotípicas identificaram que houve predominância dos sistemas genéticos integron 1 e 2 em QPrt (gráfico 3), embora já identificados em queijo Minas Frescal (PIRES et al., 2019), até onde sabemos esta é a primeira identificação em queijo prato.

Análise de RA em queijo prato já foi realizada isolando cepa de *Staphylococcus epidermidis* que não apresentou resistência a nenhum dos genes pesquisados. A pesquisa mostrou que 4 de 11 QPrt apresentaram valores acima da legislação para presença de *Staphylococcus* coagulase-positivo (FLEMING et al., 2010).

Em avaliação de contaminação microbiológica, mãos e antebraços dos manipuladores,

superfícies das formas e mesa, água de molho das formas e falhas na higienização da indústria e pasteurização do leite foram identificados como os principais pontos de contaminação ao longo do processamento de queijo prato (ASSUMPÇÃO, 2001). Estes dados, corroboram a percepção de que a contaminação pode estar fortemente relacionada a fatores ambientais do processo produtivo ultrapassando a influência das características intrínsecas de cada tipo de queijo.

Além disso, a interação entre os microrganismos e os alimentos que os abrigam possui desdobramentos complexos. Um estudo identificou que a adição de *Lactobacillus helveticus* afetou o perfil de peptídeos do queijo prato, favorecendo a liberação de peptídeos bioativos derivados de  $\beta$ -caseína. Ademais foi identificado também que melhores resultados podem ser alcançados se esse microrganismo passa por um processo de ativação em temperatura de 40°C por 18 horas, salientando a importância da condição do microrganismo mesmo antes de entrar no processo produtivo (BAPTISTA; GIGANTE, 2022). Considerando que o acréscimo de apenas um microrganismo no QPrT tem a capacidade de alterar significativamente sua composição, é possível inferir que a consequência da presença da microbiota encontrada nos QPrT avaliados se estenda para além da RA. Portanto, é importante que mais estudos sejam realizados, que permitam conhecer o conjunto de microrganismos do queijo e de que forma estes microrganismos se relacionam entre si e com o próprio alimento.

### 5.5.3 Queijo Minas Padrão

Apesar de ser um queijo tipicamente brasileiro e de seu consumo significativo no país, avaliações microbiológicas de RA em queijo minas padrão tem sido escassas.

Em nossas análises teve destaque em razão de suas MGNs resistentes a 8/11 (72,7%) dos antibióticos testados. Análises microbiológicas em queijo minas padrão (QMP) apresentando qualidade insatisfatória já foram encontradas no Maranhão, sendo o resultado de grande parte dos 30 QMP avaliados (MELO; ALVES; COSTA, 2009). Em Minas Gerais, RODRIGUES (2016) identificou a presença de coliformes a 45°C em parte das 20 amostras, porém, sem que a contagem excedesse o limite máximo tolerado pela legislação. Entretanto as amostras apresentaram altas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios.

Em avaliação de RA realizada por ROSARIO (2021) entre março de 2017 e setembro de 2018, identificou *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em QMP apresentando

resistência fenotípica à estreptomicina e resistência intermediária a ampicilina, embora não tenha apresentado os genes de resistência pesquisados. Valores muito superiores foram encontrados em nossa pesquisa. O QMP apresentou a maior quantidade de genes identificados entre os queijos analisados, tendo detectado 7 dos 20 genes testados (gráfico 4). Foram identificados, dois sistemas genéticos (que podem conter genes de resistência a diversos outros antibióticos), resistência à tetraciclina, à beta-lactâmicos e inclusive à carbapenêmicos, através do gene *oxa-48*, um gene estabelecido como prioridade máxima para a saúde pública na produção de alimentos (KOUTSOUMANIS et al., 2021). A oxacilinase-48 é um dos principais grupos de enzimas com ação em carbapenêmicos. Os principais mecanismos pelos quais as *Enterobacteriaceae* ganham resistência aos carbapenêmicos incluem principalmente, a produção de enzimas, mas também as bombas de efluxo e mutações da porina, uma proteína transmembrana responsável pela difusão de pequenos metabólitos (TILAHUN et al., 2021).

Relevante destacar que a legislação recente que regulamenta o queijo minas padrão estabelece um prazo maior de maturação, de no mínimo 20 dias (em temperatura superior a 10°C e inferior a 16°C (BRASIL, 2020b), em relação ao processo usual que estabelecia mínimo de 10 dias (RODRIGUES; FERREIRA, 2019). Essa mudança pode ter trazido efeitos benéficos para a qualidade microbiológica do QMP. Porém, mais estudos com análise microbiológica de QMP são necessárias para esta avaliação, uma vez que o maior período de maturação tem demonstrado estar relacionado com redução de possível microbiota contaminante em alimentos (LOPEZ et al., 2020).

Avaliações microbiológicas com resultados insatisfatórios em QMP provenientes do processo produtivo comumente estão relacionados às condições higiênico-sanitárias do leite utilizado, às más condições de fabricação e à ineficiência do sistema de refrigeração ao longo da cadeia (RODRIGUES; FERREIRA, 2019).

Há surpreendentemente pouca literatura de avaliação microbiológica de queijo minas padrão e até onde podemos conhecer nenhuma sobre avaliação de MGN resistente. Especialmente relevante em um queijo já bastante consumido, frequentemente cru, e que tem apresentado iniciativas para aumentar o mercado, inclusive para atender um público mais exigente apresentando inovações que agregam valor no mercado, como QMP orgânico, com certificação de bem-estar animal e mesmo QMP com emissão de carbono zero (MILKPOINT, 2021).

Embora em sua produção o QMP não passe por cozimento, apenas agitação em temperatura entre 36°-37°C e com maior temperatura alcançada ainda na fase de pasteurização do leite (RODRIGUES; FERREIRA, 2019), e que, portanto, poderiam ter influenciado sua

qualidade microbiológica, os valores significativos encontrados nos QMP analisados podem representar a realidade de onde foram produzidos, e mais estudos com análise de RA e avaliação de GRs em QMP são necessários para estabelecer um comparativo razoável e mesmo um perfil de qualidade deste queijo no Brasil.

#### 5.5.4 Ricota

Poucos estudos avaliam resistência à antibióticos em ricota (Rct). Em nossas análises os resultados genotípicos em MGN de Rct revelaram os maiores valores encontrados em todo o estudo do sistema genético integron 2, relevante já que esses possibilitam a aquisição de resistência para inúmeros antibióticos entre outras substâncias. Destaque também para presença do gene *ctx* associado a resistência em beta-lactâmicos.

Na Bahia, a presença de STEC foi confirmada em cinco, sendo 4% do total de amostras de laticínios, originando nove isolados: dentre estes uma ricota. Avaliação de resistência nesta cepa de STEC revelou susceptibilidade a todos os antibióticos testados, incluindo ampicilina e gentamicina (ROSARIO et al., 2021). A ausência de resistência encontrada pode estar relacionada ao baixo número de amostras e cepas pesquisadas.

Resultados encontrados em nosso estudo são comparáveis ao encontrado em estudo com abordagem metagenômica com queijo branco fresco (Minas Frescal) em Minas Gerais. O estudo metagenômico permite a identificação da comunidade microbiana e apresentou resultados de resistência a aminoglicosídeos e beta-lactâmicos, com destaque para identificação de integron de classe 2 em 97% das amostras corroborando os resultados encontrados em nossa pesquisa (DE PAULA et al., 2018).

Embora a ricota possa ser produzida a partir do soro de qualquer tipo de queijo, é importante que o soro não tenha altos índices de acidez para que possa permitir a coagulação da proteína do soro através da acidificação (TEIXEIRA SILVA, 1997). Além da acidificação o processo produtivo é constituído de tratamento térmico alcançando temperaturas entre 85°C e 95°C (DE GIORGI et al., 2018). Embora sejam parâmetros que tradicionalmente tem capacidade para redução de carga microbiana, ainda assim a Rct é um produto bastante perecível, devendo ser consumida rapidamente. A capacidade de tolerância ao aquecimento pode estar relacionada, por exemplo, à formação de biofilmes por um grupo de bactérias, e uma vez que o biofilme se torna uma fonte crônica de contaminação durante o processo produtivo

de um alimento pode gerar prejuízos financeiros a indústria e à saúde do consumidor (CARVALHO et al., 2019). Alguns microrganismos podem também sobreviver a temperaturas elevadas, como as bactérias termodúricas, por exemplo, capazes de tolerar altas temperaturas, tendo sido identificadas inclusive em queijo e outros derivados lácteos (BHANDURIYA et al., 2022).

A resistência a variação de temperatura pode também estar associada a relações complexas de proteção cruzada, já identificadas em *E. coli* e associando pH com subsequente variação de temperatura (RIVERA-REYES; CAMPBELL; CUTTER, 2019). É possível que essa proteção cruzada ocorra em alimentos, contra estressores como atividade de água reduzida, baixas temperaturas de resfriamento ou presença de antimicrobianos, como resultado da adaptação ácida. A adaptação ácida foi demonstrada em *E. coli* onde cepas que cresceram em pH 5,5 durante a noite e com posterior inativação tiveram sua resistência a temperatura aumentada. Por exemplo, as células adaptadas ao ácido resistiram a 58°C por 6 minutos em média, enquanto o grupo controle resistiu por 4 minutos apenas, apresentando uma correlação significativa entre a capacidade de crescimento sob pH baixo e resistência ao calor (HABERBECK et al., 2017).

Embora possua alta umidade entre suas características, a literatura tem apresentado resultados no sentido de estabelecer a contaminação oriunda especialmente da matéria prima e dos ambientes de produção. Em 19 ricotas comercializadas na região do triângulo mineiro e no interior do estado de São Paulo, 18 (94,7%) delas revelaram-se em condições impróprias para o consumo. Neste caso, as bactérias analisadas estavam associadas à má qualidade da matéria-prima e à precariedade higiênica na produção (MOREIRA; OKURA, 2017). Avaliação na linha de processamento de ricota no estado de São Paulo concluíram que as amostras de água, leite pasteurizado, massa, soro e a própria ricota apresentaram-se impróprias pela legislação, com presença de coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva nestas amostras (APARECIDA; SANTOS; LEITE HOFFMANN, 2010). Na região sul de Minas Gerais, contaminação durante o processo produtivo de Rct foi identificado como proveniente da planta da indústria. Esta foi responsável por contaminação persistente por *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* com perfil de resistência a pelo menos um antibiótico em 19,3% e 78,0% respectivamente. Corroborando a importância dos fatores ambientais para a má qualidade microbiológica desse alimento (FERNANDES et al., 2015).

### 5.5.5 Queijo Cottage

O queijo cottage já popular em outros países como EUA apresenta crescimento no Brasil entre os consumidores. Isso está relacionado a boa aceitação de seu sabor levemente salgado e ácido e também por ser frequentemente utilizado em dietas de baixas calorias (ABIQ, 2022).

Em nossas análises fenotípicas apenas no queijo cottage, um antibiótico se mostrou efetivo em 4/4 (100%) das amostras. Esse perfil foi alcançado apenas pelo antibiótico ertapenem, um antibiótico injetável de alto custo que é menos usado em produção animal que outros carbapenêmicos, como meropenem e imipenem (ANDRADE, 2017). Além disso, ertapenem é um antibiótico comparativamente recente que teve sua comercialização iniciada aproximadamente em 2001 nos EUA e 2003 na União Européia (SHAH, 2003).

Além dos benefícios já conhecidos do queijo ele apresenta uma matriz alimentar que por sua composição possui capacidade tamponante em contato com acidez do ambiente gástrico que ajuda a fornecer um ambiente adequado para a sobrevivência bacteriana, incluindo as probióticas que possam ter sido eventualmente adicionadas (CORASSIN; PATRICIA; CARLOS, 2017).

É possível que sua acidez característica (aproximadamente 4,5) (KARIYAWASAM et al., 2019) tenha sido, ao menos em parte, responsável pelos resultados de menor resistência encontradas no estudo, ainda que seja um queijo fresco e de muito alta umidade. A acidez tem sido relacionada com maior estabilidade microbiológica. Devido à característica lipofílica dos ácidos orgânicos fracos, a presença desses ácidos frente as bactérias podem danificar a integridade da membrana, bem como interagir com enzimas e proteínas afetando algumas funções metabólicas essenciais (ULLAH et al., 2012). No caso do ácido láctico pode tornar a membrana externa de bactérias Gram-negativas mais permeável, diretamente rompendo a membrana externa ou ainda funcionando como um potencializador dos efeitos de outros compostos antimicrobianos. Favorecendo, inclusive sua característica antibacteriana devido ao pH mais baixo (ALAKOMI et al., 2000).

Embora a presença de ácido láctico entre o queijo cottage possa ter colaborado na melhor qualidade microbiológica encontrada é importante estabelecer que outros parâmetros podem ter influenciado, incluindo fatores não relativos ao tipo de queijo, mas relacionados a qualidade microbiológica do processo produtivo, uma vez que, no caso do ácido láctico, dentre as ricotas avaliadas neste estudo, a ricota com maior número de genes de resistência teve adição de ácido láctico indicada pelo fabricante. Fortalecendo a compreensão de que a boa qualidade

microbiológica de um alimento é estabelecida durante todo o processo produtivo, desde a produção da matéria-prima até o momento em que o alimento é consumido.

Poucos estudos avaliam RA em queijo cottage ou como também é chamado no sul do país, o Kässschmier. Pesquisa realizada na Bahia, em cottage dentre outros laticínios buscou a identificação de coliformes termotolerantes, *E. coli* e STEC e perfil de susceptibilidade frente a antimicrobianos. Uma vez que cottage não apresentou coliformes termotolerantes, não foi possível a avaliação de RA (ROSARIO et al., 2021).

Vale ressaltar que o QCTg foi o único queijo em nossas análises que não apresentou nenhum dos sistemas genéticos integron pesquisados, apresentando apenas 1 GR a tetraciclina e outro para beta-lactâmicos.

Avaliando queijo branco fresco produzido com leite cru, o queijo Karish, Hammad (2022) encontrou *E. coli* cm resistência a cefalosporinas e presença de genes de resistência a beta-lactâmicos, como *shv*, *ctx-M* e à tetraciclina como *tetA* e *tetB*. Além de ser um queijo diferente do analisado em nossa pesquisa é também importante salientar que o queijo cottage utiliza leite pasteurizado em sua produção e pode ter colaborado para os melhores resultados microbiológicos.

Mais estudos sobre avaliação de RA em queijo cottage serão importantes na medida em que possam corroborar a boa qualidade microbiológica deste tipo de queijo, ou estabelecer que os dados encontrados possam estar refletindo características individuais como as boas condições higiênico-sanitárias das indústrias produtoras, processo produtivo adequado, entre outros.

## 5.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

A resistência a antibióticos é um importante problema de saúde mundial necessitando de ação multissetorial para que seu combate seja efetivo, incluindo a área de alimentos e compreendendo que a RA não se limita por fronteiras geográficas, esforços devem contar com ações também internacionais.

Os planos de combate a resistência internacionais como o Plano de ação Global sobre Resistência a antimicrobianos da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015), o Plano de Ação de Saúde Única contra a Resistência Antimicrobiana de iniciativa da União Europeia (EFSA, 2017a) e o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos

Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022 no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018) estabelecem o fortalecimento dos conhecimentos e a base científica por meio da vigilância e pesquisa como um dos objetivos estratégicos para combate a resistência. Nesse caso, pesquisas sobre resistência em alimentos que permitam conhecer a realidade microbiológica desse alimento são fundamentais, e de particular importância considerando um alimento “tipicamente brasileiro”.

Nos EUA, embora a morbidade por RA tenha sido maior do que pressuposto inicialmente, essas mortes estão diminuindo, mostrando que os esforços têm sido efetivos. Entre 2012 e 2017, relatório do CDC estima que as estratégias de prevenção reduziram as mortes por doenças relacionadas à RA em 18% no geral e em 28% nos hospitais. Embora diversos parâmetros estejam relacionados com essa redução, é importante destacar os esforços para controle e redução de infecções, e recebimento das vacinas recomendadas (CDC, 2019).

Estratégias de redução ou eliminação de RA tem buscado novas estratégias para o combate de bactérias resistentes, como a produção de novos antibióticos, de peptídeos antimicrobianos, nanoformulações, com destaque para produtos farmacêuticos à base de plantas, terapia bacteriofágica, CRISPR-Cas9, silenciamento de RNA e conjugados de antibióticos com nanopartícula (FATIMA et al., 2021). Outra estratégia é o desenvolvimento de antibióticos, porém, biodegradáveis, que reduziriam o tempo de exposição de bactérias e gerando menos contaminação em esgoto hospitalar e ambiente de forma geral (WELLINGTON et al., 2013).

A compreensão da fisiologia bacteriana tem permitido também investigar novas ferramentas, uma vez que a resistência pode estar interligada com aspectos gerais da fisiologia da bactéria e ser diretamente influenciada por essas (BAQUERO; MARTÍNEZ, 2017). A resistência intrínseca a polimixinas pôde ser eliminada por inibição de uma enzima central no metabolismo, a ATP sintase, em *Staphylococcus aureus*, desafiando o paradigma da resistência intrínseca. Pesquisas têm crescido no sentido de entender este tipo de mecanismo molecular, mas também tornar possível novas aplicações para antibióticos já existentes, seja pelo próprio metabolismo bacteriano como descrito em *S. aureus* (VESTERGAARD et al., 2017) ou pela estrutura bacteriana, como a membrana externa em Gram-negativos (KLOBUCAR; BROWN, 2022).

## 5.7 SEQUENCIAMENTO

A etapa de sequenciamento identificou uma cepa de *Serratia marcescens*, uma bactéria difundida nos mais diversos ambientes, com um rico e dinâmico repertório de genes que lhe permite prosperar em várias funções ecológicas e produzir uma variedade de efeitos dependendo de seus hospedeiros e mesmo de sua interação com outros microrganismos (PETERSEN; TISA, 2013), incluindo seu potencial como bactéria promotora de crescimento de plantas (BPCP) já demonstrado em outras cepas de *S. marcescens* (ALMAGHRABI; MASSOUD; ABDELMONEIM, 2013; NIU et al., 2022).

Os genes codificados no conjunto apresentado na tabela 8 estão envolvidos em uma variedade de processos fisiológicos em plantas que contribuem direta ou indiretamente para o seu crescimento e desenvolvimento, como a via de biossíntese do Triptofano, por exemplo, que está envolvida em várias atividades fisiológicas nas plantas, incluindo a fabricação do fitohormônio ácido indol acético (IAA), uma auxina com capacidade de estimular alongamento celular, alongamento de raízes e pêlos radiculares e consequente aumento de absorção de nutrientes, indução de floração e frutificação ente outros (MOHITE, 2013), além disso, pode induzir a resistência sistêmica induzida, um mecanismo de defesa da planta contra uma série de patógenos, ervas daninhas e insetos herbívoros e que já se mostrou eficiente em outra cepa de *S. marcescens* atuando como BPCP (RYU et al., 2013).

O genoma apresentou genes com potencial expressão do aminoácido ácido gama-aminobutírico (GABA), que regula o crescimento, o desenvolvimento e protege as plantas em situação de estresse (RAMESH et al., 2017). Assim, como a epermidina, fitohormônio essencial de reposta ao estresse com ação já demonstrada, por exemplo, melhorando o metabolismo da sacarose da alface para resistir ao estresse de alta temperatura (YU et al., 2022). Além destes, também foram identificados mecanismos de produção de sideróforos, compostos orgânicos que atuam na absorção de ferro disponibilizando-o para a planta (BURD; DIXON; GLICK, 2000), e também a capacidade de solubilização de outros minerais como fosfato orgânico e inorgânico facilitado pelo sistema de solubilização de fosfato (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999), solubilização de zinco, cuja deficiência pode levar a retardamento no crescimento vegetal clorose, redução no tamanho de folha, aumentar susceptibilidade a infecção por fungos e mesmo afetar a absorção de água (KAMRAN et al., 2017).

Proteção para as plantas contra insetos, através da dissolução de seus exoesqueletos bem como contra fungos pela dissolução de sua parede, pode ocorrer pela atividade de quitinase,

também presente nesta cepa (KHAN et al., 2017).

Outros genes com colaboração indireta para o desenvolvimento de plantas são compostos de origem microbiana com capacidade de proteção contra parasitas (tabela 9), como, por exemplo, o acetaldeído que apresenta ação de fumigação impedindo a eclosão dos ovos e de nematicida contra o nematoide das galhas, organismo que causa prejuízos na produção agrícola mundial (HUANG et al., 2020). Além da presença de genes para produção de serrawetina e quitinase importantes para a cepa atuar no biocontrole em culturas agrícolas (MÉNDEZ-SANTIAGO et al., 2021).

A proposta de utilização dos microrganismos como um inóculo microbiano com potencial de atuar como bioinsumo é ser uma tecnologia verde que é econômica e ambientalmente amigável em comparação com outras ferramentas, como os fertilizantes químicos, por exemplo (RAMAKRISHNA; YADAV; LI, 2019).

Para melhorar o crescimento das plantas, são necessárias condições ambientais saudáveis, como pureza da água e qualidade do solo, tornando importante a capacidade de metabolizar compostos estranhos ao ambiente (tabela 10). Nossa pesquisa identificou no genoma de *S. marcescens*, genes de um sistema de degradação de corantes AZO, um grupo de corantes relacionado com dano ao metabolismo, saúde e crescimento da planta. Esta classe de compostos sintéticos é comumente encontrada em efluentes da indústria têxtil e ainda difícil de ser removido de solos agrícolas em função de sua complexidade estrutural (MAHMOOD et al., 2017). A cepa apresenta também genes relacionadas ao citocromo P450 (CYP), uma superfamília de proteínas enzimáticas encontrada em vários organismos, composto de enzimas essenciais na proteção, metabolismo, crescimento, e desenvolvimento de plantas, além de também ser importante para o processo de detoxificação de herbicidas (STIBOROVÁ; SCHMEISER; FREI, 2000; XU; WANG; GUO, 2015).

Outros sistemas de degradação encontrados estão relacionados a contenção do dano oxidativo, desintoxicação de xenobióticos e muitas a respostas ao estresse, todos importantes no metabolismo e crescimento das plantas.

Em nossas análises genes de resistência a metais e a antibióticos foram identificados (tabela 11). Em situações com alto estresse, BPCPs que exibem genes de resistência a antibióticos e metais em conjunto foram descobertas, onde a bactéria sobrevivente se beneficia ao adquirir resistência a ambos (AHMAD WANI; IJEOMA IRE, 2013).

O excesso de metais presentes no solo gera efeitos nocivos como fertilidade prejudicada, atividade microbiana diminuída e perdas de rendimento (KACÁLKOVÁ; TLUSTOŠ; SZÁKOVÁ, 2009).

A resistência a metais tem sido associada à resistência a antibióticos por meio de um mecanismo de co-seleção, comum em ambientes com estresse por metais. Bactérias promotoras de crescimento de plantas podem adquirir mecanismos para resistir à absorção de metais pesados e/ou presença de antibióticos no solo como resultado da pressão seletiva para viver sob condições de estresse (AHMAD WANI; IJEOMA IRE, 2013). Os mecanismos de co-seleção podem ocorrer em decorrência de genes de RA e de resistência a metais estarem fisicamente ligados um ao outro (GILMOUR et al., 2004), ou também quando o mesmo mecanismo de resistência confere resistência a ambos ou ainda por co-regulação quando os genes de resistência a ambos compartilham a mesma proteína regulatória (BAZZI et al., 2020).

Considerando que a resistência aos antibióticos pode ter consequências negativas se for transmitida a outras bactérias, pesquisas de longo prazo com BPCP contendo genes de resistência são importantes para abordar a presença de resistência a antibióticos em BPCP e de que forma podem impactar o ambiente, particularmente importante, considerando que se espera que a maioria, se não todas as BPCP sejam resistentes a antibióticos (RAMAKRISHNA; YADAV; LI, 2019). Ainda assim, é possível que o processo de aquisição ou mesmo de mutação gerando GRs possa ocorrer durante sua utilização, visto ser este um processo dinâmico. Principalmente se considerarmos que antibióticos vêm sendo identificados em todo o mundo em água, água de irrigação, solo, estrume e mesmo em plantas (PAN; CHU, 2017).

Esse aparente antagonismo de funções foi identificado também em fatores de virulência desempenhando um papel significativo justamente em interações positivas. Este é o caso da capacidade de produção de biofilme e de atividades exoenzimáticas que são também fatores determinantes no mutualismo de cepas de rizobactérias com plantas hospedeiras (RAMAKRISHNA; YADAV; LI, 2019).

Estratégias como a edição de genoma com CRISPR/Cas9, a remoção de plasmídeo ou mesmo alternativas como o uso de bio-formulações com compostos bioativos de BPCPs podem ser opções para evitar a RA, embora precisem de mais estudos para sua utilização (RAMAKRISHNA; YADAV; LI, 2019).

A diversidade funcional de genes presentes em *S. marcescens* revelou também um importante potencial de uso na indústria biotecnológica, que inclui os segmentos alimentício, cosmético, químico e farmacêutico (tabela 12).

A estratégia de usar substâncias produzidas por *S. marcescens* como agentes terapêuticos já é utilizada, exemplo disso é uma cepa marinha apresentando atividade antioxidante e antibacteriana (GANGADHARAN; JOLLY; JOHN, 2020).

O setor de alimentos além de se beneficiar da promoção de crescimento de plantas nos

alimentos de origem vegetal, pode também se beneficiar de substâncias como a L-asparaginase que tem um efeito sobre a toxicidade da acrilamida podendo então ser usada como um componente durante a produção de alimentos (DAMARE; KAJAWADEKAR, 2020). Efeitos benéficos foram também encontrados no peptídeo tirosina que, tem um efeito antifúngico sobre fungos fitopatógenos de importância econômica na agronomia (TROSKE et al., 2014). E da Gramicidina D com efeitos positivos sobre as raízes de aveia (HODGES; DARDING; WEIDNER, 1971), atividade antimicrobiana (PAVITHRRA; RAJASEKARAN, 2020) e antimalárica (GUMILA et al., 1997).

A serralisina, um fator de virulência, tem se mostrado interessante na medicina por seu potencial anticâncer (ARAGHI et al., 2019) mas principalmente por sua capacidade proteolítica em processos inflamatórios (TIWARI, 2017).

Alguns genes codificam para enzimas bastante versáteis e que poderiam atender a diferentes ramos da indústria, este é o caso da lipase. Sendo utilizada na indústria farmacêutica para produzir os principais intermediários do Cloridrato de diltiazem usado em fármacos de distúrbios circulatórios e o anti-inflamatório cetoprofeno (LONG et al., 2007; SHIBATANI et al., 2000) usado também como emulsificante em indústrias cosméticas (ZIED et al., 2018).

A lipase de *S. marcescens* já tem algumas aplicações demonstradas na literatura, como biodegradação de petróleo para regeneração de áreas contaminadas, fabricação de emulsificantes a partir de óleos vegetais baratos e produção de biodiesel (GARCÍA-SILVERA et al., 2018; PEIXOTO et al., 2017; ZIED et al., 2018).

Portanto, a diversidade funcional identificada nesta cepa de *S. marcescens* e também sua capacidade de ocupar nichos diversos é provavelmente influenciada pelo seu genoma altamente dinâmico, enquanto simultaneamente essa pluralidade de ambientes e funções possibilitam pressões seletivas que intervêm no dinamismo do genoma.

Damaceno (2015) em pesquisa com bactérias Gram-negativas isoladas de queijo demonstrou que estas apresentam resistência, mas que também são produtoras de substâncias antimicrobianas com ação mesmo sobre outras bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *Salmonella* spp. O estudo revela uma intrincada relação de interação onde bactérias apresentando resistência a antibióticos também influenciam no controle microbiológico do queijo. Fortalecendo o conhecimento de que uma visão dicotômica das bactérias, com uma definição estática que só permita o estabelecimento como patógeno ou bactéria benéfica não representam a realidade e ainda subestimam as diferentes relações entre os microrganismos e também com o alimento ou ambiente que as abriga. Essa visão exclusivamente binária, traz um obstáculo para nossa compreensão da complexidade de repertório genético onde muitos papéis

e funções são possíveis.

É importante considerar que o repertório genômico de uma bactéria pode nos trazer uma visão mais clara sobre a história evolutiva deste microrganismo e que frequentemente é utilizado para inferir sua origem (BERGLUND et al., 2020). A presença da *S. marcescens*, dentre a microbiota gram-negativa de queijo, com substancial repertório genético, que permitem a promoção de crescimento de plantas levantam a questão de qual seria uma provável via de entrada deste microrganismo no ciclo produtivo do queijo.

Sendo assim, em ambientes de cultivo vegetal, a presença de resíduos antimicrobianos ativos cria pressão de seleção para o estabelecimento de RA. Microrganismos suscetíveis se adaptam à presença desses resíduos, seja por mutações, transferência de elementos genéticos móveis, ou via transferência horizontal de genes. Neste caso, a RA traz uma vantagem adaptativa para a sobrevivência do microrganismo (YOU; SILBERGELD, 2014). Resistência a antibióticos encontrada em microrganismos estão também distribuídas em cadeias de cultura alimentar de várias regiões de todo o mundo (BRUNN et al., 2022).

## 6 CONCLUSÃO

Existe resistência a antibióticos ocorrendo em MGN de queijos no Brasil, nos queijos parmesão, prato, minas padrão cottage e ricota. Dentre estes estão alguns dos mais consumidos do país. Diversos fatores podem interferir neste processo em adição as características intrínsecas, como a umidade, de cada tipo de queijo. Em conjunto os resultados parecem apontar na direção de maior interferência do próprio processo produtivo, porém, maior número de estudos é fundamental para esclarecer a relação causal dos marcadores de resistência encontrados, especialmente investigações que possam avaliar toda a comunidade bacteriana e suas correlações, de forma a compreender a qualidade microbiológica do queijo e não a do microrganismo isoladamente.

A pesquisa identificou 8 entre os 20 diferentes genes de resistência pesquisados, sendo (*ctx*, *tem*, *shv*) com produção de enzimas com ação sobre beta-lactâmicos, com destaque para um carbapenêmico (*oxa-48*), tetraciclinas (*tetA* e *tetB*) e dois sistemas genéticos, o integron 1 e 2 que podem abrigar genes para resistência a diversos antibióticos e são importantes propagadores de resistência.

O queijo é um produto economicamente importante, abrangendo o grande e o pequeno produtor. Esse alimento é socialmente relevante e carrega consigo características únicas e regionais que permitem, em alguns casos, sua caracterização como queijo tipicamente brasileiro. No Brasil esse alimento que é tão importante e rico em benefícios é principalmente consumido, frequentemente cru, por parcelas da população que demandam atenção à saúde como idosos, mas também consumido por pacientes imunosuprimidos e hospitalizados constituindo os grupos de risco de consumo de um alimento com resistência a antibióticos.

O conhecimento microbiológico particularmente de resistência a antibióticos, de cada um dos tipos de queijos que analisamos é ainda incipiente, porém, de particular importância considerando que o conjunto de microrganismos do queijo influenciam tanto o processo tecnológico de produção como a segurança biológica do alimento, logo, impactando produtores e consumidores.

A avaliação do conjunto de bactérias Gram-negativas permitiu comparar os valores encontrados com estudos de metagenômica, trazendo um conjunto de resultados que refletem de forma mais próxima a realidade microbiológica do queijo quando comparado a técnicas de isolamento.

O conjunto de genes presente em uma bactéria permite uma pluralidade de funções

importantes e que devem ser consideradas. Sendo assim, a diversidade genômica apresentada pela cepa de *Serratia marcescens* permitiu estabelecer para além de seu histórico-evolutivo suas potencialidades para utilização em crescimento de plantas, como também, maior produtividade agrícola, controle de doenças e remediação do solo que estão entre os benefícios trazidos pelas enzimas codificadas pelos genes presentes em nossa cepa de *Serratia marcescens* e que estão entre as características desejadas pelo mercado de bioinsumos.

A complexa relação entre microrganismos apresentando resistência a antibióticos e também benefícios já foram descritas na literatura e corroboradas pelo resultado encontrado em nossas análises, ainda assim mais estudos, especialmente de longo prazo, são necessários para que com a compreensão do panorama microbiológico, estratégias para mitigar a resistência possam ser melhor desenvolvidas.

## REFERÊNCIAS

- ABIQ. **Queijo Cottage**. Disponível em: <[https://www.abiq.com.br/queijos\\_1er.asp?codigo=1919&codigo\\_categoria=16&codigo\\_subcategoria=37](https://www.abiq.com.br/queijos_1er.asp?codigo=1919&codigo_categoria=16&codigo_subcategoria=37)>. Acesso em: 27 abr. 2022.
- AGUILAR, C. E. G. et al. Microbial quality of industrial and retail market grated parmesan cheese in the State of São Paulo, Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 12, p. 2257–2263, 1 dez. 2016.
- AHMAD WANI, P.; IJEOMA IRE, O. Screening of Microbes for Their Metal, Antibiotic Resistance and Plant Growth Promoting Activity. **Current Research in Bacteriology**, v. 7, n. 1, p. 22–31, 15 dez. 2013.
- AL, S. et al. A Molecular Investigation of Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae and *blaKPC*, *blaNDM* and *blaOXA-48* genes in raw milk. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 26, n. 3, p. 391–396, 2020.
- ALAKOMI, H.-L. et al. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2001–2005, maio 2000.
- ALKHAFAJE, W. K.; OLAMA, Z. A.; ALI, S. M. Molecular characterization and microbial resistance of different bacterial isolates in some dairy products. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 36, n. 2, p. 333–339, 1 abr. 2022.
- ALMAGHRABI, O. A.; MASSOUD, S. I.; ABDELMONEIM, T. S. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 1, p. 57–61, 1 jan. 2013.
- ALVES, P. G. V. et al. **Formação de biofilme em amostras clínicas de bactérias Gram negativas**. Anais do I Congresso Nacional de Microbiologia Clínica On-Line. **Anais...Revista Multidisciplinar em Saúde**, 14 jun. 2021. Disponível em: <<https://editoraime.com.br/revistas/index.php/rem/s/article/view/1184>>. Acesso em: 13 fev. 2022
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–31, 16 maio 1980.
- AMOAFI, O. Y. et al. Antibiotic resistance and phylogenetic profiling of Escherichia coli from dairy farm soils; organic versus conventional systems. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100088, 1 jan. 2022.
- ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária - Consulta Rápida**. 1. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- ANDRADE, V. M.; MACHADO, A. M. DE R.; GOMES, F. DE C. O. Qualidade físico-química, microbiológica e identificação de compostos voláteis em amostras comerciais de queijo parmesão ralado. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e26811124826, 6 jan. 2022.
- ANVISA. **Programas de Monitoramento dos Teores de Sódio e Açúcares em Alimentos Industrializados**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/programas-nacionais-de-monitoramento-de-alimentos/teores-de-sodio-e-acucares-em-alimentos-industrializados>>. Acesso em: 11 jun. 2022a.
- APARECIDA, V.; SANTOS, Q.; LEITE HOFFMANN, F. Evolução da microbiota contaminante em

linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota Evolution of microbial contaminants in the processing line of Minas frescal and ricotta cheeses. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 38–46, 2010.

ARAGHI, A. et al. Purification and study of anti-cancer effects of *Serratia marcescens* serralysin. **Iranian journal of microbiology**, v. 11, n. 4, p. 320–327, ago. 2019.

ASSUMPÇÃO, E. G. Identificação dos pontos de contaminação microbiológica ao longo do processamento de queijo prato: estudo de caso. 2001.

ATTA, H. M. et al. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 360–371, 1 jul. 2015.

AZIMI, L. et al. Evaluation of Phenotypic Methods for Detection of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. Pneumoniae* in Tehran. **Journal of Medical Bacteriology**, v. 2, n. 3, p. 26–31, 2013.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, abr. 2016.

BANDYOPADHYAY, S. et al. Genomic Identity of Fluoroquinolone-Resistant *bla* CTX-M -15 -Type ESBL and pMampC  $\beta$ -Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* from Buffalo Milk, India. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 9, p. 1345–1353, 12 nov. 2018.

BAPTISTA, D. P.; GIGANTE, M. L. Prato cheese with addition of *Lactobacillus helveticus*: Effect of culture preparation on peptide profile. **Applied Food Research**, v. 2, n. 1, p. 100107, 1 jun. 2022.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.-L. Interventions on Metabolism: Making Antibiotic-Susceptible Bacteria. **mBio**, v. 8, n. 6, 29 dez. 2017.

BARMAN, M. et al. Enteric Salmonellosis Disrupts the Microbial Ecology of the Murine Gastrointestinal Tract. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 907–915, mar. 2008.

BAZZI, W. et al. Heavy Metal Toxicity in Armed Conflicts Potentiates AMR in *A. baumannii* by Selecting for Antibiotic and Heavy Metal Co-resistance Mechanisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 68, 3 fev. 2020.

BELL, A. F. et al. Unwrapping nutrition: Exploring the impact of hospital food and beverage packaging on plate waste/intake in older people. **Appetite**, v. 144, p. 104463, 1 jan. 2020.

BELLETTI, N. et al. Antibiotic Resistance of *Lactobacilli* Isolated from Two Italian Hard Cheeses. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 10, p. 2162–2169, 1 out. 2009.

BERGLUND, F. et al. Comprehensive screening of genomic and metagenomic data reveals a large diversity of tetracycline resistance genes. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 11, p. 1–14, 1 nov. 2020.

BHANDURIYA, K. et al. Effect of midday pasteurizer washing on thermophilic organisms and their progression through Cheddar cheese manufacturing and ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 1, p. 109–122, 1 jan. 2022.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 1 jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, 11 de março de 1996**, 1996.

BRASIL. Ministério da agricultura, do abastecimento e da reforma agrária. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União, DF, de 08 de setembro de 1997**, 1997a.

BRASIL. Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997 Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 de setembro de 1997**, 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, de 04 de setembro de 1997**, 1997c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, 30 de julho de 1997**, 1997d.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 353, de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, de 04 de setembro de 1997**, 1997e.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 357, de 4 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, 4 de setembro de 1997**, 1997f.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 46 de 10 de fevereiro de 1998. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, 10 de fevereiro de 1998**, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001**, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 23 de outubro de 2002**, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 20, de 5 de maio de 2011. **Diário Oficial da União n. 87 de 9 de maio de 2011**, v. Seção 1, p. 39–41, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, 26 de novembro de 2018**, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2019**, 2019a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de dezembro de 2019**, 2019b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 65, de 21 de julho de 2020. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 23 de julho de 2020**, 2020a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 66, de 21 de julho de 2020. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 23 de julho de 2020**, 2020b.

BRASIL. Portaria nº 52, de 15 de março de 2021 - Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção e as listas de substâncias e práticas para o uso nos Sistemas Orgânicos de Produção. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2021.

BRETTIN, T. et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 8365, 10 jul. 2015.

- BROOKS, J. P.; ADELI, A.; MCLAUGHLIN, M. R. Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems. **Water Research**, v. 57, p. 96–103, 15 jun. 2014.
- BRUNN, A. et al. Characteristics and Global Occurrence of Human Pathogens Harboring Antimicrobial Resistance in Food Crops: A Scoping Review. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 3 fev. 2022.
- BRUNTON, L. L.; BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman and Gilman**. 12<sup>a</sup> ed. [s.l.] Hill MacGraw, 2012.
- BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 237–245, 1 mar. 2000.
- BURILLO, A.; BOUZA, E. Faster infection diagnostics for intensive care unit (ICU) patients. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 22, n. 3, p. 347–360, 4 mar. 2022.
- CALBO, E. et al. Foodborne Nosocomial Outbreak of *SHV1* and *CTX-M-15*-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and Control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 6, p. 743–749, 15 mar. 2011.
- CAMINI, A. et al. Características físico-químicas de ricotas comercializadas no Vale do Taquari. **Revista Destaques Acadêmicos**, 2014.
- CARVALHO, A. et al. Formação e resistência do biofilme microbiano em indústrias processadoras de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 30, p. 2019, 15 dez. 2019.
- CARVALHO, J. J. V. DE et al. Bactérias multirresistentes e seus impactos na saúde pública: Uma responsabilidade social. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e58810616303, 10 jun. 2021.
- CDC. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 6, n. 6, p. 7–83, dez. 2000.
- CDC. Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing, *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* from Rectal Swabs. **Centro de Controle e Prevenção de Doenças**, n. 5, p. 1–6, 2008.
- CDC. **What is CDC's role in food safety?** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/cdc-and-food-safety.pdf>>. Acesso em: 6 jan. 2018.
- CDC. **Antibiotic Resistance Threats Report**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>>. Acesso em: 26 maio. 2022.
- CDC. **COVID-19 & Antibiotic Resistance**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html>>. Acesso em: 11 jun. 2022.
- CHAALAL, N. et al. Spread of *OXA-48* and *NDM-1*-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST48 and ST101 in Chicken Meat in Western Algeria. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 4, p. 492–500, 1 abr. 2021.
- CHOWDHURY, A. M. M. A. et al. Screening and Identification of Antibiotic Resistant Gene *int1* in Coliforms Isolated From Drinking Water. **Air, Soil and Water Research**, v. 15, p. 117862212210847, 12 jan. 2022.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, set. 2018.

- COATES, J. Build it back better: Deconstructing food security for improved measurement and action. **Global Food Security**, v. 2, n. 3, p. 188–194, set. 2013.
- CORASSIN, A. G. C.; PATRICIA, B. Z.; CARLOS, A. F. **Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. v. 3
- COUTINHO, H. D. M. et al. Resistência a antibióticos mediada por plasmídeos / Plasmide-mediated resistance to antibiotics. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 4044–4053, 2 mar. 2022.
- CUNHA- NETO, A. et al. Salmonella anatum, S. infantis and S. schwarzengrund in Brazilian Cheeses Occurrence and antibiotic resistance profiles. **International Journal of Dairy Technology**, v. 73, n. 1, p. 296–300, 5 fev. 2020.
- DA SILVA, T. C. M.; SILVA, M. C.; DA CRUZ, A. G. Benefícios conferidos à saúde através do consumo de queijos probióticos. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 2, n. 12, 2022.
- DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 1 mar. 2010.
- DAMACENO, H. F. B. et al. Antibiotic Resistance Versus Antimicrobial Substances Production by Gram-Negative Foodborne Pathogens Isolated from Minas Frescal Cheese: Heads or Tails? **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 4, p. 297–301, 2 abr. 2015.
- DAMARE, V. S.; KAJAWADEKAR, K. G. A preliminary study on L-asparaginase from mangrove detritus-derived fungi and its application in plant growth promotion. **MycoAsia – Journal of modern mycology**, n. 4, 2020.
- DE CAMPOS, A. C. L. P. et al. Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 2, p. 94–100, fev. 2018.
- DE GIORGI, S. et al. Potential use of ricotta cheese whey for the production of lactobionic acid by *Pseudomonas taetrolens* strains. **New Biotechnology**, v. 42, p. 71–76, 25 maio 2018.
- DE OLIVEIRA PINTO, C. L. et al. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 105, 3 set. 2015.
- DE PAULA, A. C. et al. Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrons in White Soft Cheese: Aspects of Clinical Resistome and Potentiality of Horizontal Gene Transfer. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 106, 19 fev. 2018.
- DELORME, M. M. et al. Consumer innovativeness and perception about innovative processing technologies: A case study with sliced Prato cheese processed by ultraviolet radiation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 74, n. 4, p. 768–777, 27 nov. 2021.
- DENISUIK, A. J. et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-, AmpC  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. suppl 1, p. i57–i65, 1 maio 2013.
- DEPARDIEU, F. et al. Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. **Clinical**

**Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 79–114, jan. 2007.

DEYLAM SALEHI, M. et al. Integron-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolated from Intensive Care Unit Patients, Babol, North of Iran. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

ECDC. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA A One Health Response. **Organisation for Economic Co-operation and Development**, 2022.

EFSA. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). **European Food Safety Authority**, p. 24, 2017a.

EFSA. ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. **EFSA Journal**, v. 15, n. 10, 1 out. 2017b.

EMBRAPA. Anuário Leite 2021: Saúde única e total. **Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias**, 2021.

ELBEHIRY, A. et al. *Acinetobacter baumannii* as a community foodborne pathogen: Peptide mass fingerprinting analysis, genotypic of biofilm formation and phenotypic pattern of antimicrobial resistance. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 1158–1166, 1 jan. 2021.

EMBRAPA. Anuário Leite 2019: Novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. **Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias**, 2019.

EMBRAPA. Anuário Leite 2021: Saúde única e total. **Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias**, 2021.

FARIAS, J. Q. et al. Utilização de conservantes alimentícios no combate à ação microbiana em maionese: verificação nos rótulos/ Use of food preservatives to combat microbial action in mayonnaise: verification on labels. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 39986–39996, 18 abr. 2021.

FATIMA, H. et al. Recent strategies for inhibiting multidrug-resistant and  $\beta$ -lactamase producing bacteria: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 205, p. 111901, 1 set. 2021.

FERNANDES, M. DA S. et al. Dissemination of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Ricotta Processing Plant and Evaluation of Pathogenic and Antibiotic Resistance Profiles. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 4, p. M765–M775, 1 abr. 2015.

FGV. **O setor de laticínios no brasil e suas interações com o comércio internacional**. Disponível em: <[https://gvagro.fgv.br/sites/gvagro.fgv.br/files/u115/laticinios\\_fgv\\_PT.pdf](https://gvagro.fgv.br/sites/gvagro.fgv.br/files/u115/laticinios_fgv_PT.pdf)>. Acesso em: 30 abr. 2022.

FLEMING, L. R. et al. Quantificação e resistência a antibióticos de *Staphylococcus* isolados de queijos. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 1–2, 2010.

FLÓREZ, A. B. et al. Molecular Identification and Quantification of Tetracycline and Erythromycin Resistance Genes in Spanish and Italian Retail Cheeses. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

FONSECA, É. L.; VICENTE, A. C. Integron Functionality and Genome Innovation: An Update on the Subtle and Smart Strategy of Integrase and Gene Cassette Expression Regulation. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 224, 20 jan. 2022.

FRANCO, B. G. DE M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. v. 1

GANGADHARAN, A.; JOLLY, J.; JOHN, N. Bioprospecting of novel therapeutic agents from marine bacterium; *Serratia marcescens*. **Materials Today: Proceedings**, v. 25, p. 298–301, 2020.

GARCÍA-SILVERA, E. E. et al. Production and application of a thermostable lipase from *Serratia marcescens* in detergent formulation and biodiesel production. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 156–172, 1 mar. 2018.

GESER, N.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 21, 7 dez. 2012.

GHATAK, S. et al. Detection of New Delhi Metallo-beta-Lactamase and Extended-Spectrum beta-Lactamase Genes in *Escherichia coli* Isolated from Mastitic Milk Samples. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, n. 5, p. 385–389, 1 out. 2013.

GILMOUR, M. W. et al. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. **Plasmid**, v. 52, n. 3, p. 182–202, 1 nov. 2004.

GIRAFFA, G. The Microbiota of Grana Padano Cheese. A Review. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2632, 29 out. 2021.

GUILLAUME, G. et al. PCR typing of tetracycline resistance determinants (*Tet A-E*) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, n. 1, p. 77–85, 1 abr. 2000.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUMILA, C. et al. Characterization of the potent in vitro and in vivo antimalarial activities of ionophore compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 523–529, mar. 1997.

HABERBECK, L. U. et al. Cross-protection between controlled acid-adaptation and thermal inactivation for 48 *Escherichia coli* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 206–214, 16 jan. 2017.

HAMMAD, A. M. et al. Loads of Coliforms and Fecal Coliforms and Characterization of Thermotolerant *Escherichia coli* in Fresh Raw Milk Cheese. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 332, 1 fev. 2022.

HAMMAD, A. M.; ISHIDA, Y.; SHIMAMOTO, T. Prevalence and Molecular Characterization of Ampicillin-Resistant Enterobacteriaceae Isolated from Traditional Egyptian Domiati Cheese. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 3, p. 624–630, 1 mar. 2009.

HARAGUCHI, T. Antibióticos: classificação geral. **RBM Revista Brasileira de Medicina**, 2000.

HERNANDO-AMADO, S.; SANZ-GARCÍA, F.; MARTÍNEZ, J. L. Antibiotic Resistance Evolution Is Contingent on the Quorum-Sensing Response in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 36, n. 10, p. 2238–2251, 1 out. 2019.

HODGES, T. K.; DARDING, R. L.; WEIDNER, T. Gramicidin-D-stimulated influx of monovalent cations into plant roots. **Planta**, v. 97, n. 3, p. 245–256, set. 1971.

HUANG, D. et al. Identification and Characterization of Nematicidal Volatile Organic Compounds from

Deep-Sea *Virgibacillus dokdonensis* MCCC 1A00493. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 744, 9 fev. 2020.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 130, 2010.

IBGE. Pesquisa de Orçamento Familiares 2017-2018. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 125, 2020.

IBGE. Estatística da Produção Pecuária. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2021.

IMBURGIA, T. A.; KUSSIN, M. L. A Review of Extended and Continuous Infusion Beta-Lactams in Pediatric Patients. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 3, p. 214–227, 1 mar. 2022.

INCAPER. **Produção de queijos é a segunda maior em agroindústrias do Espírito Santo**. Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/Not%C3%ADcia/producao-de-queijos-e-a-segunda-maior-em-agroindustrias-do-espírito-santo>>. Acesso em: 21 maio. 2022.

JAIMEE, G.; HALAMI, P. M. Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid bacteria of food origin—an impending menace. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1137–1151, 3 fev. 2016.

JASTER, H. et al. Quality evaluation of parmesan-type cheese: a chemometric approach. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 1, p. 181–188, mar. 2014.

JOY, N. B. et al. Prevalence of integrons in Enterobacteriaceae obtained from clinical samples. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 31 jan. 2021.

KACÁLKOVÁ, L.; TLUSTOŠ, P.; SZÁKOVÁ, J. Phytoextraction of cadmium, copper, zinc and mercury by selected plants. **Plant, Soil and Environment**, v. 55, n. No. 7, p. 295–304, 16 ago. 2009.

KAMRAN, S. et al. Contribution of Zinc Solubilizing Bacteria in Growth Promotion and Zinc Content of Wheat. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, p. 2593, 21 dez. 2017.

KARIYAWASAM, K. M. G. M. M. et al. Characterization of cottage cheese using *Weissella cibaria* D30: Physicochemical, antioxidant, and antilisterial properties. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 3887–3893, 1 maio 2019.

KARUNIAWATI, A.; SAHARMAN, Y.; LESTARI, D. Detection of Carbapenemase Encoding Genes in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients at Intensive Care Unit Cipto Mangunkusumo Hospital in 2011. **Acta medica Indonesiana**, v. 45, p. 101–106, 2013.

KASPER, D.; FAUCI, A. **Doenças Infecciosas de Harrison**. 2. ed. [s.l.] AMGH Editora, 2015.

KEKLIK, N. M. et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 on fresh kashar cheese with pulsed ultraviolet light. **Food Science and Technology International**, v. 25, n. 8, p. 680–691, 4 dez. 2019.

KHAN, M. S. et al. Impact of transgenic *Brassica napus* harboring the antifungal synthetic chitinase (NiC) gene on rhizosphere microbial diversity and enzyme activities. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1307, 25 jul. 2017.

KHOSHBAKHT, R.; SHAHED, A.; ASKI, H. S. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy products. **Journal of Microbiology**,

**Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 4, p. 333–336, 2014.

KLOBUCAR, K.; BROWN, E. D. New potentiators of ineffective antibiotics: Targeting the Gram-negative outer membrane to overcome intrinsic resistance. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 66, p. 102099, 1 fev. 2022.

KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods**. [s.l.] distributed by Edwards Bros., Ann Arbor, Mich., 1966.

KOUTSOUMANIS, K. et al. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. **EFSA Journal**, v. 19, n. 6, p. e06651, 1 jun. 2021.

KRELL, T.; MATILLA, M. A. Antimicrobial resistance: progress and challenges in antibiotic discovery and anti-infective therapy. **Microbial Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 70–78, 5 jan. 2022.

KÜREKCI, C.; ARKADAŞ, M.; AVŞAR, Y. K. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from Sürk samples, a traditional turkish cheese. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 10, n. 3, p. 709–714, 6 set. 2016.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 620–626, maio 2013.

LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 73–84, 2 jan. 2003.

LEI, T. et al. Characterization of class 1 integrons harboring *bla<sub>VEB-1</sub>* in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from ready-to-eat foods in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 318, p. 108473, 2 abr. 2020.

LOLLO, P. C. B. et al. Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. **Food Research International**, v. 76, p. 611–617, 1 out. 2015.

LONG, Z.-D. et al. Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, n. 3–4, p. 105–110, 2 jul. 2007.

LOPES, T. S. et al. Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 42, 2022.

LOPEZ, C. M. et al. Assessment of antibiotic resistance in staphylococci involved in fermented meat product processing. **Current Opinion in Food Science**, v. 31, p. 17–23, 1 fev. 2020.

LOUGE URIARTE, E. L. et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* of the phylogroups A and C in dairy calves with meningitis and septicemia. **Microbial Pathogenesis**, v. 163, p. 105378, 1 fev. 2022.

LU, W. et al. Distribution and Molecular Characterization of Functional Class 2 Integrons in Clinical *Proteus mirabilis* Isolates. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 15, p. 465–474, fev. 2022.

MAEYAMA, Y. et al. Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from canine and feline clinical specimens in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 216, p. 183–189, 1 mar. 2018.

- MAHANTI, A. et al. Milk from healthy or infected cattle as a source of multi-drug resistant, AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 4, p. 343–347, 2020.
- MAHMOOD, F. et al. Potential plant growth-promoting strain *Bacillus* sp. SR-2-1/1 decolorized azo dyes through NADH-ubiquinone:oxidoreductase activity. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 176–184, 1 jul. 2017.
- MAIRI, A. et al. *OXA-48*-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 587–604, 8 abr. 2018.
- MAJOIE, G. T. et al. Virulence and multi-resistance of gram-negative bacilli strains isolated from some artisanal fermented dairy products sold in secondary schools in Benin. **African Journal of Microbiology Research**, v. 15, n. 4, p. 191–202, 30 abr. 2021.
- MARTINS, A. A. et al. Probiotic Prato cheese consumption attenuates development of renal calculi in animal model of urolithiasis. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 378–383, 1 out. 2018.
- MATINFAR, S. et al. Phylogenetic and antibiotics resistance in extended-spectrum B-lactamase (ESBL) Uropathogenic *Escherichia coli*: An update review. **Gene Reports**, v. 23, p. 101168, 1 jun. 2021.
- MCINNES, R. S. et al. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 53, p. 35–43, 1 fev. 2020.
- MELO, A. C. M. DE; ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo minas padrão comercializado na cidade de São Luis, MA. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 547–551, 25 dez. 2009.
- MÉNDEZ-SANTIAGO, E. W. et al. *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 2, p. 549–559, 27 mar. 2021.
- MILANI, C. et al. Colonization of the human gut by bovine bacteria present in Parmesan cheese. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1286, 20 dez. 2019.
- MILKPOINT. **Queijo Minas Padrão e Kefir carbono neutro chegam ao mercado**. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/queijo-minas-padrao-e-kefir-carbono-neutro-chegam-ao-mercado-227436/>>. Acesso em: 26 abr. 2022.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única. **Ministério da Saúde**, 2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha>>. Acesso em: 24 maio. 2022.
- MOBASSERI, P. et al. Detection of Different Types of Class 1, 2 and 3 Integrons among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Raw Milks. **Journal of Medical Bacteriology**, p. 11–18, 2021.
- MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 13, n. ahead, p. 0–0, 2013.
- MONSTEIN, H.-J. et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla SHV*, *bla TEM* and *bla CTX-M* genes in Enterobacteriaceae. **APMIS**, v. 115, n. 12, p. 1400–1408, 1 dez. 2007.

- MOREIRA, M. S.; OKURA, M. H. Qualidade microbiológica de ricotas comercializadas na região do triângulo mineiro e no interior do estado de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, p. 96–101, 2017.
- MUNHOZ, I. G. A. et al. Análise microbiológica comparativa de queijo coalho comercializado em supermercados e feiras livres na Cidade de Maceió – Alagoas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e9410514582, 29 abr. 2021.
- NABTI, L. Z. et al. Molecular Characterization of Clinical Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from Sétif, Algeria. **Microbial Drug Resistance**, v. 28, n. 3, p. 274–279, 2 dez. 2021.
- NAKAMURA-SILVA, R. et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a retrospective study in Manaus, Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 4, p. 202, 4 abr. 2022.
- NASCIMENTO, G. M. DO et al. Propolis in the control of bacterial bovine mastitis: a tool for the production of organic milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 43, n. 2, p. 869–882, 25 fev. 2022.
- NELSON, R. E. et al. National Estimates of Healthcare Costs Associated With Multidrug-Resistant Bacterial Infections Among Hospitalized Patients in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. Supplement\_1, p. S17–S26, 29 jan. 2021.
- NICKLAUS, S. et al. The protective effect of cheese consumption at 18 months on allergic diseases in the first 6 years. **Allergy**, v. 74, n. 4, p. 788–798, 19 abr. 2019.
- NICOLETTI, G.; VERDI, K. J.; ENDRES, C. M. Desenvolvimento de queijo tipo cottage sem lactose com adição de fibras e redução de sódio e gordura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 4, 12 set. 2016.
- NIU, H. et al. The endophytic bacterial entomopathogen *Serratia marcescens* promotes plant growth and improves resistance against *Nilaparvata lugens* in rice. **Microbiological Research**, v. 256, p. 126956, 1 mar. 2022.
- NOBREGA, D. B. et al. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 7210–7224, 1 jun. 2021.
- OLIVEIRA, C. C. et al. *Proteus mirabilis* harboring *bla*<sub>NDM-1</sub> and *bla*<sub>KPC</sub> detected in Minas Gerais, Brasil. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, n. 7, p. 22–25, 2020.
- OMBARAK, R. A. et al. Prevalence and Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Raw Milk and Raw Milk Cheese in Egypt. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 2, p. 226–232, 1 fev. 2018.
- OPAS. Plano Estratégico da Organização Pan-Americana da Saúde 2014-2019. **Organização Pan-Americana da Saúde-OMS**, p. 1–159, 2014.
- OPAS. **Do Campo à mesa obtendo alimentos seguros**. Disponível em: <[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4811:dia-mundial-da-saude-7-de-abril&Itemid=875](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4811:dia-mundial-da-saude-7-de-abril&Itemid=875)>. Acesso em: 6 jan. 2018.
- OPAS. Plano Estratégico da Organização Pan-Americana da Saúde 2020-2025. **Organização Pan-Americana da Saúde - OMS**, 2019.
- OPAS. **Dia Mundial da Segurança dos Alimentos 2021: PANAFTOSA impulsiona a cooperação técnica da segurança dos alimentos para países da região das Américas**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/7-6-2021-dia-mundial-da-seguranca-dos-alimentos-2021-panaftosa>>

impulsa-cooperacao-tecnica>. Acesso em: 24 maio. 2022.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos - Componentes de Alimentos e Processos**. [s.l.] Artmed, 2005. v. 1

OPAS. Surgimento e aumento de novas combinações de carbapenemases em Enterobacterales na América Latina e no Caribe. **OPAS**, 2021.

PAN, M.; CHU, L. M. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. **Science of The Total Environment**, v. 599–600, p. 500–512, 1 dez. 2017.

PARUSSOLO, L. et al. Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 163, 15 fev. 2019.

PASOLLI, E. et al. Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2610, 25 dez. 2020.

PAVELQUESI, S. L. S. et al. Presence of Tetracycline and Sulfonamide Resistance Genes in *Salmonella* spp.: Literature Review. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1314, 28 out. 2021.

PAVITHRRA, G.; RAJASEKARAN, R. Gramicidin Peptide to Combat Antibiotic Resistance: A Review. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 191–199, 26 mar. 2020.

PEIXOTO, F. B. S. et al. Petroleum biodegrading and co-resistance to antibiotics by *Serratia marcescens* strain isolated in Coari, Amazonas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 4, p. 489, 24 nov. 2017.

PENA, R. H. R.; FREITAS, F.; CASTRO, B. G. DE. Hygienic-sanitary quality and antimicrobial sensitivity profile of *Escherichia coli* in milk and cheese sold illegally in municipalities of northern Mato Grosso, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 88, 25 out. 2021.

PEREIRA, S. G. DE F. et al. Avaliação da qualidade de queijo parmesão ralado de diferentes marcas comerciais. **Higiene Alimentar**, v. 30, p. 258–259, 2016.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293–300, abr. 2004.

PETERSEN, L. M.; TISA, L. S. Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 627–640, set. 2013.

PIRES, B. A. D. et al. Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo Minas Frescal no município do Rio de Janeiro – Perfil fenotípico e genotípico. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 7, n. 3, p. 86, 30 ago. 2019.

POIREL, L. et al. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 1 jan. 2004.

POIREL, L. et al. Detection of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 934–936, 1 fev. 2011a.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 1, p. 119–123, 1 maio 2011b.

- POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. *OXA-48*-like carbapenemases: the phantom menace. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1597–1606, 1 jul. 2012.
- PORMOHAMMAD, A. et al. Prevalence of integron classes in Gram-negative clinical isolated bacteria in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 2, p. 118, 1 fev. 2019.
- PROIETTI- JUNIOR, A. A. et al. Experimental co- infection by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* in pirarucu *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). **Aquaculture Research**, v. 52, n. 4, p. 1688–1696, 17 abr. 2021.
- RAGHEB, S. M.; GOVINDEN, U.; OSEI SEKYERE, J. Genetic support of carbapenemases: a One Health systematic review and meta- analysis of current trends in Africa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1509, n. 1, p. 50–73, 9 mar. 2022.
- RAMACHANDRAN, D. U.; SUDHARSAN, M. S. Molecular Characterization of Antibiotic Resistant Genes among Gram Negative Clinical Isolates. **Trends in Sciences**, v. 19, n. 4, p. 2687, 15 fev. 2022.
- RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, K. Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, v. 138, p. 10–18, 1 jun. 2019.
- RAMBLIÈRE, L. et al. Impact of mass and systematic antibiotic administration on antibiotic resistance in low- and middle-income countries. A systematic review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 58, n. 1, p. 106364, 1 jul. 2021.
- RAMESH, S. A. et al.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 9, p. 1577–1603, 12 maio 2017.
- RANDALL, C. P. et al. The Target of Daptomycin Is Absent from *Escherichia coli* and Other Gram-Negative Pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 637–639, 1 jan. 2013.
- RICHARD, E. et al. Unbridled Integrons: A Matter of Host Factors. **Cells**, v. 11, n. 6, p. 925, 8 mar. 2022.
- RIVERA-REYES, M.; CAMPBELL, J. A.; CUTTER, C. N. Survival of acid-adapted and non-adapted Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using an in vitro model. **Food Control**, v. 104, p. 28–33, 1 out. 2019.
- RODRIGUES, C. R. F.; FERREIRA, L. C. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo Minas Padrão produzido no município de Januária-MG. **Caderno de Ciências Agrárias**, 2016.
- RODRIGUES, C. R. F.; FERREIRA, L. C. Controle de qualidade em queijo minas padrão - Métodos físico-químicos, microbiológicos e moleculares. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2019.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4–5, p. 319–339, 1 out. 1999.
- ROGERS, B. A.; SIDJABAT, H. E.; PATERSON, D. L. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p. 1–14, 1 jan. 2011.
- ROSARIO, A. I. L. S. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from pasteurized dairy products from Bahia, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6535–6547, 1 jun. 2021.

- RUSSINI, V. et al. A nosocomial outbreak of invasive listeriosis in an Italian hospital: Epidemiological and genomic features. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 591, 12 maio 2021.
- RYU, C.-M. et al. Modulation of Quorum Sensing in Acyl-homoserine Lactone-Producing or -Degrading Tobacco Plants Leads to Alteration of Induced Systemic Resistance Elicited by the Rhizobacterium *Serratia marcescens* 90-166. **The Plant Pathology Journal**, v. 29, n. 2, p. 182–192, 1 jun. 2013.
- SABBAGH, P. et al. Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 24, n. 2, p. 136, 1 fev. 2021.
- SCHERER, J. D. S.; CALVETTI, R. A. Descrição de casos de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases subtipos *Oxa-48* e *NDM* em hospital público de Porto Alegre. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 7, n. 2, p. 79–84, 8 maio 2017.
- SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.
- SHAH, P. M. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 538–542, 1 set. 2003.
- SHIBATANI, T. et al. Enzymatic resolution of diltiazem intermediate by *Serratia marcescens* lipase: molecular mechanism of lipase secretion and its industrial application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1–3, p. 141–149, 4 out. 2000.
- SHOMA, S. et al. Characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Australia carrying bla<sub>NDM-1</sub>. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 93–97, 1 jan. 2014.
- SILVA. Utilização de coliformes termotolerantes como indicadores higiênico-sanitários de queijo Prato comercializado em supermercados e feiras livres de Recife-PE. **Medicina Veterinária Preventiva**, v. 1, n. 2, p. 21–25, 2011.
- SILVA, C. R. et al. Resistome in gram-negative bacteria from soft cheese in Brazil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 430, 5 dez. 2020a.
- SILVA, F. T. **Queijo Parmesão - Coleção Agroindústria Familiar EMBRAPA**. 1. ed. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2005a.
- SILVA, F. T. **Queijo Prato - Coleção Agroindústria Familiar EMBRAPA**. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2005b. v. 1
- SILVA, N. M. et al. Adição de extrato de casca de jaboticaba no desenvolvimento de embalagem inteligente para queijo prato. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19512–19532, 14 abr. 2020b.
- SIMAS, J. DO V.; AMARAL, G. V. DO; SANTOS, D. A. DOS. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias em queijarias: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e57610211770, 28 fev. 2021.
- SIVIERO, E. et al. Detecção de resíduos de antibióticos em produtos lácteos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 18, n. 37, p. 156, 30 set. 2021.
- SOARES, C. R. P. et al. Epidemiologia molecular de bacilos Gram-negativos multidroga resistente produtores de carbapenemases isoladas de diferentes sítios de infecção. **Research, Society and**

**Development**, v. 10, n. 9, p. e30210918070, 26 jul. 2021.

SONG, H.-J. et al. Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Isolates from Healthy Food Animals in South Korea, 2010–2020. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 524, 28 fev. 2022.

STENTZ, R. et al. Cephalosporinases associated with outer membrane vesicles released by Bacteroides spp. protect gut pathogens and commensals against  $\beta$ -lactam antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 701–709, 1 mar. 2015.

STIBOROVÁ, M.; SCHMEISER, H. H.; FREI, E. Oxidation of xenobiotics by plant microsomes, a reconstituted cytochrome P450 system and peroxidase: a comparative study. **Phytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 353–362, 1 jun. 2000.

SUNDE, M. et al. Integron, Plasmid and Host Strain Characteristics of Escherichia coli from Humans and Food Included in the Norwegian Antimicrobial Resistance Monitoring Programs. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128797, 5 jun. 2015.

TAMMA, P. D.; HUMPHRIES, R. M. PRO: Testing for ESBL production is necessary for ceftriaxone-non-susceptible Enterobacterales: perfect should not be the enemy of progress. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 2, 8 abr. 2021.

TANKO, N. et al. A systematic review on the prevalence of extended-spectrum beta lactamase-producing Gram-negative bacteria in Nigeria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 488–496, 1 set. 2020.

TEIXEIRA SILVA, F. Recomendações práticas para produção de Ricota. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 1997.

THUM, C. et al. Effects of microwave processing conditions on microbial safety and antimicrobial proteins in bovine milk. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 3, p. e14348, 17 mar. 2020.

TILAHUN, M. et al. Emerging Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infection, Its Epidemiology and Novel Treatment Options: A Review. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 14, p. 4363–4374, out. 2021.

TIWARI, M. The role of serratiopeptidase in the resolution of inflammation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 209–215, 1 maio 2017.

TOENGES, R. et al. Current practice in nutrition after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation – Results from a survey among hematopoietic stem cell transplant centers. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 4, p. 1571–1577, 1 abr. 2021.

TORNIMBENE, B. et al. WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System early implementation 2016–17. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 241–242, mar. 2018.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782–7, 1 mar. 1990.

TROCADO, N. D. et al. Phenotypic and genotypic detection of antibiotic-resistant bacteria in fresh fruit juices from a public hospital in Rio de Janeiro. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 4, p. 1471–1475, 4 maio 2021.

TROMBETE, F. M.; FRAGA, M. E.; SALDANHA, T. Avaliação da qualidade química e microbiológica de queijo parmesão ralado comercializado no Rio de Janeiro. **Revista do Instituto de**

**Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 11–16, 2012.

TROSKIE, A. M. et al. Inhibition of agronomically relevant fungal phytopathogens by tyrocidines, cyclic antimicrobial peptides isolated from *Bacillus aneurinolyticus*. **Microbiology**, v. 160, n. 9, p. 2089–2101, 1 set. 2014.

ULISSES, A. DE F. et al. Leite cru refrigerado: qualidade microbiológica, físico-química e detecção de resíduos de antibióticos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e48111123708, 12 jan. 2022.

ULLAH, A. et al. Quantitative Analysis of the Modes of Growth Inhibition by Weak Organic Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8377–8387, dez. 2012.

USDA. **Dairy and Products Annual**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://usdabrazil.org.br/relatorios/>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

UYANIK, T. et al. Investigation of major carbapenemase genes in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from raw milk in Black Sea region of Turkey. **International Dairy Journal**, v. 128, p. 105315, 1 maio 2022.

VAN DER BIJ, A. K.; PITOUT, J. D. D. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2090–2100, 1 set. 2012.

VASCONCELOS, F. M. et al. Probiotic Prato cheese attenuates cigarette smoke-induced injuries in mice. **Food Research International**, v. 123, p. 697–703, 1 set. 2019.

VESTERGAARD, M. et al. Inhibition of the ATP Synthase Eliminates the Intrinsic Resistance of *Staphylococcus aureus* towards Polymyxins. **mBio**, v. 8, n. 5, 8 nov. 2017.

VICENSKI, P. P.; ALBERTI, P.; AMARAL, D. J. C. DO. Dietary recommendations for immunosuppressed patients of 17 hematopoietic stem cell transplantation centers in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 2, p. 86–93, 2012.

WANG, W. et al. Antibiotic susceptibility, biofilm-forming ability, and incidence of class 1 Integron of *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* isolated from various foods in a school canteen in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 4, p. 269–275, 1 abr. 2020.

WELLINGTON, E. M. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–165, 1 fev. 2013.

WELSH, J. A. et al. Production-related contaminants (pesticides, antibiotics and hormones) in organic and conventionally produced milk samples sold in the USA. **Public Health Nutrition**, v. 22, n. 16, p. 2972–2980, 26 nov. 2019.

WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. **World Health Organization Press**, p. 1–28, 2015.

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**, p. 7, 2017a.

WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report Early implementation. **WHO**, 2017b.

WHO. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 6th Revision 2018. Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. **World Health Organisation**, p. ISBN 978-92-4-151552-8, 2018.

WHO. WHO list of Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. **WHO**, 2019.

XU, J.; WANG, X.; GUO, W. The cytochrome P450 superfamily: Key players in plant development and defense. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 9, p. 1673–1686, 1 set. 2015.

YANG, X. et al. Occurrence, serovars and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. in retail ready-to-eat food products in some Chinese provinces. **LWT**, v. 154, p. 112699, 15 jan. 2022.

YELIN, I.; KISHONY, R. Antibiotic Resistance. **Cell**, v. 172, n. 5, p. 1136- 1136.e1, fev. 2018.

YOON, S.; LEE, Y. J. Molecular characteristics of *Escherichia coli* from bulk tank milk in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 23, n. 1, 2022.

YOU, Y.; SILBERGELD, E. K. Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JUN, 2014.

YU, E. W. et al. **Microbial Efflux Pumps: Current Research**. [s.l.] Caister Academic Press, 2013.

YU, Q. et al. Exogenous spermidine improves the sucrose metabolism of lettuce to resist high-temperature stress. **Plant Growth Regulation**, v. 96, n. 3, p. 497–509, 7 abr. 2022.

ZAGUI, G. S. et al. Tertiary hospital sewage as reservoir of bacteria expressing MDR phenotype in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2640–2644, 1 nov. 2012.

ZARZECKA, U.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A. Microorganisms from starter and protective cultures - Occurrence of antibiotic resistance and conjugal transfer of tet genes in vitro and during food fermentation. **LWT**, v. 153, p. 112490, 1 jan. 2022.

ZEIGHAMI, H.; HAGHI, F.; HAJIAHMADI, F. Molecular characterization of integrons in clinical isolates of betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Iran. **Journal of Chemotherapy**, v. 27, n. 3, p. 145–151, 27 jun. 2015.

ZIED, Z. et al. Monoacylglycerol and diacylglycerol production by hydrolysis of refined vegetable oil by- products using an immobilized lipase from *Serratia* sp. W3. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 23, p. 4323–4330, 16 dez. 2018.

**APÊNDICE A - GENOMIC ANALYSIS AND PLANT GROWTH-PROMOTING POTENTIAL OF A *SERRATIA MARCESCENS* ISOLATED FROM FOOD**  
 Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e29611124799, 2022 (CC BY 4.0)  
 ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24799>

**Genomic analysis and plant growth-promoting potential of a *Serratia marcescens* isolated from food**

*Análise genômica e potencial de promoção de crescimento vegetal de uma *Serratia marcescens* isolada de alimento*

*Análisis genómico y potencial de promoción del crecimiento vegetal de una *Serratia marcescens* aislada de alimento*

Received: 15/12/2021 | Reviewed: 22/12/2021 | Accept: 29/12/2021 | Published: 01/07/2022

**Cristiane Rodrigues Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6306-4998>  
 Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brazil  
 E-mail: [cristiane.silva@unirio.br](mailto:cristiane.silva@unirio.br)

**Rafael Monção Miller**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2760-8748>  
 Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brazil  
 E-mail: [moncaomiller@gmail.com](mailto:moncaomiller@gmail.com)

**Bárbara Costa Peixoto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8228-0194>  
 Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brazil  
 E-mail: [baabicp@gmail.com](mailto:baabicp@gmail.com)

**Lílian Aveleda**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0876-0974>  
 Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brazil  
 E-mail: [lili.aveleda@gmail.com](mailto:lili.aveleda@gmail.com)

**Victor Augustus Marin**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9827-6552>  
 Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brazil  
 E-mail: [victor.marin@unirio.br](mailto:victor.marin@unirio.br)

**Abstract**

A genomic analysis of the potential application of a *Serratia marcescens* strain in the plant-growth promotion. We performed whole-genome sequencing of *Serratia marcescens* isolated from a Minas Frescal Cheese. The genomic repertoire revealed a bacterium of agricultural and biotechnological interest. In the plant-growth promotion traits, we highlight genes encoding proteins possibly responsible for the biosynthesis of phytohormone indole acetic acid, organic compounds that act in iron uptake, and the Phosphate solubilization system. Genes encoding for enzymes like the versatile L-asparaginase stimulates the development of seeds and grains and can benefit the food industry due to a mitigation effect on acrylamide and notably, has medical applications as a chemotherapeutic agent or is applicable by its antimicrobial and anti-inflammatory properties. Moreover, functional diversity of genes encoding for resistance to different metals and metabolism of xenobiotics genes can be found in this strain, reinforcing its biotechnological potential. The versatile enzymes that can be produced by *S. marcescens*

benefit the food, pharmaceutical, textile, agronomic, and cosmetic industries. The relevant genetic systems of *S. marcescens* described here may be used to promote plant growth and health and improve the environment. To the best of our knowledge, this is the first genome sequence report on *S. marcescens* isolated from cheese, with potential application as promoting plant growth and providing a baseline for future genomic studies on the development of this species.

**Keywords:** *Serratia marcescens*; Plant Growth-Promotion; Biotechnology.

### Resumo

Análise genômica do potencial de aplicação de uma cepa de *Serratia marcescens* na promoção de crescimento vegetal. Foi realizado o sequenciamento do genoma completo de *Serratia marcescens* isolada de queijo Minas Frescal. O repertório genômico revelou uma bactéria de interesse agrícola e biotecnológico. Dentre as características de promoção do crescimento de plantas, destacamos genes que codificam proteínas possivelmente responsáveis pela biossíntese do fitohormônio ácido indol acético, compostos orgânicos que atuam na captação de ferro e o sistema de solubilização de Fosfato. Genes que codificam enzimas como a versátil L-asparaginase estimulam o desenvolvimento de sementes e grãos e podem beneficiar a indústria de alimentos devido ao efeito de mitigação da acrilamida e, notadamente, tem aplicações médicas como agente quimioterápico ou é aplicável por seus agentes antimicrobianos e propriedades anti-inflamatórias. Além disso, uma diversidade funcional de genes que codificam para resistência a diferentes metais e metabolismo de xenobióticos pôde ser encontrada nesta linhagem, reforçando seu potencial biotecnológico. As enzimas versáteis que podem ser produzidas em *S. marcescens* beneficiam as indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil, agrônômica e cosmética. Os sistemas genéticos relevantes de *S. marcescens* descritos aqui podem ser usados para promover o crescimento e a saúde das plantas e melhorar o meio ambiente. Até onde sabemos, este é o primeiro relato de sequência de genoma de *S. marcescens* isolado de queijo, com potencial aplicação como promotor de crescimento de plantas e fornecendo uma linha de base para futuros estudos genômicos sobre o desenvolvimento desta espécie.

**Palavras-chave:** *Serratia marcescens*; Promoção de Crescimento Vegetal; Biotecnologia.

### Abstracto

Un análisis genómico de la posible aplicación de una cepa de *Serratia marcescens* en la promoción del crecimiento vegetal. Métodos: Se realizó la secuenciación del genoma completo de *Serratia marcescens* aislada de un queso Minas Frescal. El repertorio genómico reveló una bacteria de interés agrícola y biotecnológico. En los rasgos de promoción del crecimiento de las plantas, destacamos los genes que codifican proteínas posiblemente responsables de la biosíntesis del ácido acético indol fitohormono, compuestos orgánicos que actúan en la absorción de hierro y el sistema de solubilización de fosfato. Los genes que codifican para enzimas como la versátil L-asparaginasa estimulan el desarrollo de semillas y granos y pueden beneficiar a la industria alimentaria debido a un efecto de mitigación sobre la acrilamida y, en particular, tiene aplicaciones médicas como agente quimioterapéutico o es aplicable por sus propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias. Además, una diversidad funcional de genes que codifican para la resistencia a diferentes metales y el metabolismo de los genes xenobióticos se puede encontrar en esta cepa, reforzando su potencial biotecnológico. Las enzimas versátiles que pueden ser producidas por *Serratia marcescens* benefician a las industrias alimentaria, farmacéutica, textil, agronómica y cosmética. Los sistemas genéticos relevantes de *S. marcescens* descritos aquí pueden utilizarse para promover el crecimiento y la salud de las plantas y mejorar el medio ambiente. Hasta donde sabemos, este es el primer informe de secuencia del genoma de *S. marcescens* aislado del queso, con potencial aplicación como promotor del crecimiento vegetal y proporcionando una línea de base para futuros estudios genómicos sobre el desarrollo de esta especie.

**Palabras clave:** *Serratia marcescens*; Promoción del crecimiento vegetal; Biotecnología.

## 1 INTRODUCTION

*Serratia marcescens*, classified under the family *Yersiniaceae* of the order *Enterobacterales* (Adeolu, Alnajjar, Naushad, & S. Gupta, 2016), is capable of thriving in a broad range of environments.

The wide variety of gene repertoire enables *S. marcescens* to be a ubiquitous microorganism, successful in diverse environments and with multipurpose applications or effects. For example, marine *S. marcescens* demonstrated antioxidant and antibacterial activity against some Gram-positive and Gram-negative bacteria (Gangadharan, Jolly, & John, 2020). Moreover, oil spills in aquatic ecosystems can be bioremediated by a biodispersant produced by *S. marcescens* characterized by low toxicity, high biodegradability, and good ecological acceptability (dos Santos et al., 2021).

In the terrestrial environment, the species can act as a pathogen to animals (Friman, Eklund, Pitkälä, Rajala-Schultz, & Rantala, 2019; Ishii et al., 2012). However is agronomically relevant with its antifungal effect (Troskie, de Beer, Vosloo, Jacobs, & Rautenbach, 2014). Furthermore, it can be considered a biocontrol agent with herbicidal activity (Kamran et al., 2017) and as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), improving the health and development of their host plant by acting on the solubilization of inorganic P present in the soil (Rodríguez & Fraga, 1999).

Alternative approaches can improve the soil and global water healthy, once continuously contaminated by the human being, to maintain the exorbitant life cycle. Due use of bacteria systems in biotechnology plus the promise of *S. marcescens* role in several mechanisms, it could be used in different scenarios, including azo dyes degradation to soil decontamination (Mahmood et al., 2017).

Functional diversity of genes encoding for enzymes have evidenced an important assignment for *S. marcescens* in the biotechnological industry, including segments such as food, cosmetics, chemical, and pharmaceutical (dos Santos et al., 2021; Falade & Ekundayo, 2021).

Both disease and therapy are present in the dual role of *S. marcescens* in the clinic, responsible for outbreaks (Cristina, Sartini, & Spagnolo, 2019) was even identified as an opportunist in outbreaks during covid-19 treatment (Amarsy et al., 2020). However, it has shown an extensive presence of enzymes with antimicrobial and anti-inflammatory properties proving effective to even resistant microorganisms and with the possibility of use as a chemotherapeutic agent in different cancer cell lines (Abdel- Razik, EL-Baghdady, EL-Shatoury, & G Mohamed, 2019; Pavithrra & Rajasekaran, 2020).

The broad niche and functional diversity of the *S. marcescens* are probably influenced by and, at the same time, influence on the highly dynamic genome (Cristina et al., 2019), turning relevant the periodical investigation of the genetic background of emerging *S. marcescens* strains from various sources. Moreover, the potential application of the strain to promote plant growth was explored from the genotypic perspective.

## **2 Material and methods**

### **2.1 Isolation and characterization of the *Serratia marcescens***

The *Serratia marcescens* strain was isolated from a Gram-negative pool of bacteria from a previous analysis of Minas Frescal Cheese according to the methodology of Silva et al., 2020. Subsequently, the strain was isolated in Mueller Hinton Agar. Genomic DNA of the bacterial strain was extracted with a NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany, 2018) in conformity with the manufacturer's protocol.

### **2.2 Whole genome sequence analysis**

A genomic library was constructed using a Nextera XT Kit (Illumina Inc., San Diego, CA) by Genone Company. Total genomic DNA was sequenced using a MiSeq platform from Illumina Inc. (Genone Company). The sequence was assembled and the draft genome using Prokka (Seemann, 2014) in the Galaxy site <https://www.usegalaxy.org> and RAST (Brettin et al., 2015) in the site <http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>. The DFAST - Prokaryotic genome annotation pipeline from the site <https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/dfc/> (Tanizawa, Fujisawa, Kaminuma, Nakamura, & Arita, 2016; Tanizawa, Fujisawa, & Nakamura, 2018) and PATRIC in the site <https://www.patricbrc.org/> (Davis et al., 2020).

## **3 Results**

### **3.1 Characterization of the *Serratia marcescens***

The bacterial strain was identified to be *Serratia marcescens* and was deposited at the Genbank under the number SUB9616311, BioProject and Biosample accession number are PRJNA729465 and SAMN19116778, respectively. The genome has Total Length (bp) 4,969,854 and GC Content 59.6%; 4,722 CD; 4 rRNA; 81 tRNA; 2 CRISPR.

### **3.2 Genomic repertoire**

The diversified genomic repertoire of *S. marcescens* made it possible to group them into different sets of genes according to the benefits presented. Table 1 presents genes related to

several systems involved in plant-growth promotion.

**Table 1-** Genes involved in the plant growth promotion traits.

Location	G ene	Product	Pathway	
71101..72780	<i>pdC1</i>	<sup>i</sup> Indole-3-pyruvate decarboxylase	<b>Synthesis of the phytohormone indole acetic acid (IAA)</b>	
1745616..1747277	<i>pdC2</i>	<sup>i</sup> Indole-3-pyruvate decarboxylase		
1348409..1349596	<i>tyrB1</i>	Aromatic-amino-acid aminotransferase		
2400258..2401487	<i>tyrB2</i>	Aromatic-amino-acid aminotransferase		
841137..842327	<i>aspC</i>	aspartate aminotransferase		
1317606..1319021	-	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase		
3385706..33 86512	<sup>t</sup> <i>rpA</i>	tryptophan synthase alpha chain	<b>Tryptophan biosynthesis pathway</b>	
3386512..33 87702	<sup>t</sup> <i>rpB</i>	tryptophan synthase beta chain		
3387744..33 89105	<sup>t</sup> <i>rpC</i>	bifunctional indole-3-glycerol phosphate synthase/phosphoribosylanthranilate isomerise		
3389109..33 90107	<sup>t</sup> <i>rpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase		
3390124..33 90705	<sup>t</sup> <i>rpG</i>	anthranilate synthase component 2		
3390705..33 92267	<sup>t</sup> <i>rpE</i>	anthranilate synthase component 1		
3392647..33 93528	<sup>t</sup> <i>rpH</i>	hypothetical protein		
1346991..1348388	<sup>g</sup> <i>abP</i>	GABA permease		<b>GABA transport</b>
2555735..2557189	<sup>g</sup> <i>abD</i>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] GabD		<b>GABA degradation</b>
1496042..1497370	<sup>p</sup> <i>uuA1</i>	Gamma-glutamylputrescine synthetase PuuA		<b>GABA biosynthesis</b>
2065828..2067198	<sup>p</sup> <i>uuA2</i>	Gamma-glutamylputrescine synthetase PuuA		
3048881..3050299	<sup>p</sup> <i>uuA3</i>	Gamma-glutamylputrescine synthetase PuuA		
2035575..2036876	<sup>p</sup> <i>uuB1</i>	Gamma-glutamylputrescine oxidoreductase		
3044542..3045822	<sup>p</sup> <i>uuB2</i>	Gamma-glutamylputrescine oxidoreductase		
3045834..3047330	<sup>p</sup> <i>uuC</i>	NADP/NAD-dependent aldehyde dehydrogenase PuuC		
3047900..3048661	<sup>p</sup> <i>uuD</i>	Gamma-glutamyl-gamma-aminobutyrate hydrolase PuuD		

2554457..2555722	uuE	<sup>p</sup> 4-aminobutyrate aminotransferase PuuE	
1497856..1498413	uuR1	<sup>p</sup> HTH-type transcriptional regulator PuuR	
3047346..3047903	uuR2	<sup>p</sup> HTH-type transcriptional regulator PuuR	
4129206..4130669	rr1	<sup>p</sup> Gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	
4134757..4136181	rr2	<sup>p</sup> Gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	
707261..708193	buA	<sup>g</sup> Guanidinobutyrase	
751743..752852	otF	<sup>p</sup> Putrescine-binding periplasmic protein	
2139577..2140893	otE	<sup>p</sup> Putrescine transporter PotE	
2998784..2999827	otD	<sup>p</sup> Spermidine/putrescine transport system substrate-binding protein PotD	
3003984..3004766	otC	<sup>p</sup> Spermidine/putrescine transport system permease protein PotC	<b>Polyamine transport</b>
3004763..3005623	otB	<sup>p</sup> Spermidine/putrescine transport system permease protein PotB	
3005607..3006722	otA	<sup>p</sup> Spermidine/putrescine transport system ATP-binding protein PotA	
3050608..3051978	uuP	<sup>p</sup> Putrescine importer	
2229642..2230538	iaA	<sup>m</sup> tRNA dimethylallyltransferase	<b>Cytokinin biosynthesis</b>
281151..282575	iaB	<sup>m</sup> tRNA-2-methylthio-N(6)-dimethylallyladenosine synthase	
2812914..2814890	peA	<sup>s</sup> Biosynthetic arginine decarboxylase	
2815085..2816005	peB	<sup>s</sup> Agmatinase	
2732182..2734347	peC	<sup>s</sup> Ornithine decarboxylase	
2772843..2773637	peD	<sup>s</sup> S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	<b>Putrescine biosynthesis</b>
2773665..2774528	peE1	<sup>s</sup> Polyamine aminopropyltransferase	
3724779..3725567	peE2	<sup>s</sup> Polyamine aminopropyltransferase	
2137352..2139514	peF	<sup>s</sup> Inducible ornithine decarboxylase	
2810851..2812005	etK	<sup>m</sup> S-adenosylmethionine synthase	

4488192..4490330	<i>ada</i>	<sup>c</sup> Inducible lysine decarboxylase	
4486753..4488096	<i>adB</i>	<sup>c</sup> putative cadaverine/lysine antiporter	<b>Cadaverine, putrescine biosynthesis</b>
4484830..4486383	<i>adC</i>	<sup>c</sup> Transcriptional activator CadC	
2772843..2773637	<i>peD</i>	<sup>s</sup> S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	
2773665..2774528	<i>peE1</i>	<sup>s</sup> Polyamine aminopropyltransferase	
3724779..3725567	<i>peE2</i>	<sup>s</sup> Polyamine aminopropyltransferase	<b>Spermidine/Sper mine biosynthesis</b>
906353..906919	<i>peG1</i>	<sup>s</sup> Spermidine N(1)-acetyltransferase	
1734415..1734954	<i>peG2</i>	<sup>s</sup> Spermidine N(1)-acetyltransferase	
4243961..4244512	<i>peG3</i>	<sup>s</sup> Spermidine N(1)-acetyltransferase	
3336851..3338128	<i>hiA1</i>	<sup>c</sup> Chitinase	
3889421..3891112	<i>hiA</i>	<sup>c</sup> Chitinase	<b>Chitin degradation</b>
4797788..4799287	<i>hiB</i>	<sup>c</sup> Chitinase	
286807..288246	<i>hid</i>	<sup>C</sup> Chitinase	
4841474..4842253	<i>udA</i>	<sup>b</sup> Alpha-acetolactate decarboxylase	
4842286..4843971	<i>udB</i>	<sup>b</sup> Acetolactate synthase, catabolic	
1902321..1904015	<i>ilvB1</i>	Acetolactate synthase isozyme 1 large subunit	<b>Acetoin Synthesis</b>
2829574..2831214	<i>ilvB2</i>	Acetolactate synthase isozyme 1 large subunit	
4878208..4879854	<i>lvG</i>	<sup>i</sup> Acetolactate synthase isozyme 2 large subunit	
1882701..1884500	<i>lvI</i>	<sup>i</sup> Acetolactate synthase isozyme 3 large subunit	
1904019..1904312	<i>ilvN</i>	Acetolactate synthase isozyme 1 small subunit	
4877954..4878211	<i>ilvM</i>	Acetolactate synthase isozyme 2 small subunit	
1882297..1882788	<i>ilvH</i>	Acetolactate synthase isozyme 3 small subunit	
1395126..1396316	<i>ntC1</i>	<sup>e</sup> Isochorismate synthase	
2301840..2303045	<i>ntC2</i>	<sup>e</sup> Isochorismate synthase	<b>Siderophore Production</b>
2300204..2301832	<i>ntE</i>	<sup>e</sup> Enterobactin synthase subunit E	

2304690..2308634	<i>ntF</i>	<sup>e</sup>	Enterobactin synthase subunit F	
2299340..2300200	<i>ntB</i>	<sup>e</sup>	Enterobactin synthase subunit B	
2303257..2304513	<i>ntS1</i>	<sup>e</sup>	Enterobactin exporter	
3630309..3631592	<i>ntS2</i>	<sup>e</sup>	Enterobactin exporter	
2050892..2051299	<i>xbD1</i>	<sup>e</sup>	Biolpolymer transporter protein	
2623298..2623714	<i>xbD2</i>	<sup>e</sup>	Biolpolymer transporter protein	
2622308..2623288	<i>xbB</i>	<sup>e</sup>	Biolpolymer transporter protein	
4916366..4916845	<i>fr</i>	<sup>B</sup>	Bacterioferritin	
2540910..2542397	<i>xaA</i>	<sup>u</sup>	Altronate dehydrolase	
2539477..2540889	<i>xaC</i>	<sup>u</sup>	Uronate isomerise	<b>Plant polymer degradation enzymes</b>
3907226..3908329	<i>csZ</i>	<sup>b</sup>	Endoglucanase (cellulase)	
1361417..1363789	<i>cd</i>	<sup>G</sup>	Quinoprotein glucose dehydrogenase	
2197430..2197960	<i>pa</i>	<sup>P</sup>	Inorganic pyrophosphatase	<b>Inorganic P solubilisation</b>
4233863..4235413	<i>px</i>	<sup>P</sup>	Exopolyphosphatase	
1113239..1114927	<i>ppA1</i>	<sup>a</sup>	Oligopeptide-binding protein AppA	
1534333..1536141	<i>ppA2</i>	<sup>a</sup>	Oligopeptide-binding protein AppA	
2127176..2127904	<i>hnF</i>	<sup>p</sup>	phosphonate metabolism transcriptional regulator PhnF	
2127905..2128348	<i>hnG</i>	<sup>p</sup>	phosphonate C-P lyase system protein PhnG	
2128352..2128933	<i>hnH</i>	<sup>p</sup>	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnH	<b>Organic P mineralization and glyphosate degradation</b>
2128933..2130018	<i>hnI</i>	<sup>p</sup>	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnI	
2130011..2130871	<i>hnJ</i>	<sup>p</sup>	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-phosphate C-P lyase	
2130871..2131659	<i>hnK</i>	<sup>p</sup>	Putative phosphonates utilization ATP-binding protein PhnK	
2131676..2132380	<i>hnL</i>	<sup>p</sup>	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnL	

2132380..2133516	<i>hmM</i>	<i>P</i>	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate diphosphatase
2133516..2134085	<i>hnN</i>	<i>P</i>	Ribose 1,5-bisphosphate phosphokinase PhnN
254558..254986	<i>hnO</i>	<i>P</i>	Aminoalkylphosphonate N-acetyltransferase
2134697..2135479	<i>hnP</i>	<i>P</i>	Phosphoribosyl 1,2-cyclic phosphate phosphodiesterase
3102067..3103170	<i>hnW</i>	<i>P</i>	2-aminoethylphosphonate--pyruvate transaminase
3103180..3103986	<i>hnX</i>	<i>P</i>	Phosphonoacetaldehyde hydrolase
595332..596759	<i>hoA1</i>	<i>P</i>	Alkaline phosphatase
2579746..2581278	<i>hoA2</i>	<i>P</i>	Alkaline phosphatase
62219..62941	<i>hoC1</i>	<i>P</i>	Acid Phosphatase
2519813..2520520	<i>hoC2</i>	<i>P</i>	Acid Phosphatase
3069061..3069759	<i>hy</i>	<i>P</i>	Phloretin hydrolase
3995977..3996864	<i>gpA</i>	<i>u</i>	sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein UgpA
3994579..3995898	<i>gpB</i>	<i>u</i>	sn-glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein UgpB
409995..411041	<i>gpC1</i>	<i>u</i>	sn-glycerol-3-phosphate import ATP-binding protein UgpC
3515382..3516494	<i>gpC2</i>	<i>u</i>	sn-glycerol-3-phosphate import ATP-binding protein UgpC
3997712..3998782	<i>gpC3</i>	<i>u</i>	sn-glycerol-3-phosphate import ATP-binding protein UgpC
3996861..3997706	<i>gpE</i>	<i>u</i>	sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein UgpE
3998782..3999519	<i>gpQ</i>	<i>u</i>	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase
486980..487813	<i>hnC</i>	<i>P</i>	Phosphate-import ATP-binding protein PhnC
487855..488787	<i>hnD</i>	<i>P</i>	Phosphate-import protein PhnD
488866..489729	<i>hnE1</i>	<i>P</i>	Phosphate-import permease protein PhnE
489726..490625	<i>hnE2</i>	<i>P</i>	Phosphate-import permease protein PhnE
3783048..3783938	<i>stA1</i>	<i>P</i>	Phosphate transport system permease protein PstA

**Transporters**

4240052..4241701	<i>stA2</i>	<i>P</i>	Phosphate transport system permease protein PstA	
3783987..3784763	<i>stB</i>	<i>P</i>	Phosphate import ATP-binding protein PstB	
3782090..3783046	<i>stC</i>	<i>P</i>	Phosphate transport system permease protein PstC	
4237923..4240055	<i>stC1</i>	<i>P</i>	Phosphate transport system permease protein PstC1	
117742..118704	<i>stS1</i>	<i>P</i>	Phosphate-binding protein PstS	
3780958..3781998	<i>stS2</i>	<i>P</i>	Phosphate-binding protein PstS	
115697..116386	<i>hoB</i>	<i>p</i>	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB	
2349154..2349864	<i>hoR1</i>	<i>P</i>	Phosphate regulon sensor protein PhoR	<b>Regulatory Genes</b>
3101192..3101911	<i>hoR2</i>	<i>P</i>	Phosphate regulon sensor protein PhoR	
3692913..3693824	<i>qqB</i>	<i>P</i>	Coenzyme PQQ synthesis protein PqqB	
3693834..3694589	<i>qqC</i>	<i>P</i>	Pyroloquinoline-quinone synthase	
3694589..3694867	<i>qqD</i>	<i>P</i>	Coenzyme PQQ synthesis protein PqqD	<b>Coenzyme PQQ synthesis</b>
3694860..3695996	<i>qqE</i>	<i>P</i>	Coenzyme PQQ synthesis protein PqqE	
3694860..3695996	<i>qqF</i>	<i>P</i>	Coenzyme PQQ synthesis protein PqqF	
1233855..1235876	<i>heA</i>	<i>c</i>	Chemotaxis protein CheA	
1233322..1233822	<i>heW</i>	<i>C</i>	Chemotaxis protein CheW	
1227314..1227703	<i>heY</i>	<i>c</i>	Chemotaxis protein CheY	
1228855..1229685	<i>heR</i>	<i>c</i>	Chemotaxis protein methyltransferase	
1227806..1228855	<i>heB</i>	<i>c</i>	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	<b>Chemotaxis</b>
1226659..1227303	<i>heZ</i>	<i>c</i>	Protein phosphatase CheZ	
1231458..1233128	<i>se</i>	<i>T</i>	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer	
1231458..1233128	<i>asl</i>	<i>t</i>	Methyl-accepting chemotaxis aspartate transducer	
1229765..1231381	<i>Tap</i>		Methyl-accepting chemotaxis protein IV	

1231458..1233128	<i>sr1</i>	<i>t</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein I	
2195616..2197169	<i>sr2</i>	<i>t</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein I	
2252585..2254210	<i>sr3</i>	<i>t</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein I	
3733251..3734873	<i>sr4</i>	<i>t</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein I	
3840672..3842600	<i>ar</i>	<i>T</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein II	
1039135..1040082	<i>nuA</i>	<i>z</i>	High-affinity zinc uptake system protein ZnuA	
1040913..1041698	<i>nuB</i>	<i>z</i>	High-affinity zinc uptake system membrane protein	ZnuB
183244..183957	<i>nuC1</i>	<i>z</i>	High-affinity zinc uptake system ATP-binding protein	ZnuC
1040158..1040916	<i>nuC2</i>	<i>z</i>	High-affinity zinc uptake system ATP-binding protein	ZnuC
110912..3111802	<i>nuC3</i>	<i>z</i>	High-affinity zinc uptake system ATP-binding protein	ZnuC
3532752..3534362	<i>itA1</i>	<i>P</i>	Low-affinity inorganic phosphate transporter 1	
4649865..4651367	<i>itA2</i>	<i>P</i>	Low-affinity inorganic phosphate transporter 1	Zinc
4488192..4490330	<i>adA</i>	<i>c</i>	Inducible lysine decarboxylase	solubilisation
4486753..4488096	<i>adB</i>	<i>c</i>	putative cadaverine/lysine antiporter	
4484830..4486383	<i>adC</i>	<i>c</i>	Transcriptional activator CadC	
3972332..3974650	<i>ntA</i>	<i>z</i>	Zinc/cadmium/lead-transporting P-type ATPase	
3469580..3470563	<i>ntB1</i>	<i>z</i>	Zinc transport protein ZntB	
3534549..3535577	<i>ntB2</i>	<i>z</i>	Zinc transport protein ZntB	
4931416..4931847	<i>ntR</i>	<i>z</i>	HTH-type transcriptional regulator ZntR	
220203..222914	<i>opA</i>	<i>c</i>	Cu <sup>+</sup> exporting ATPase	Copper
2940939..2941868	-	-	rhizopine-binding protein	
2944548..2945468	-	-	rhizopine-binding protein	Rhizopine
3659835..3660758	-	-	rhizopine-binding protein	degradation and transport
499977..501107	<i>iolG2</i>		Myo-inositol 2-dehydrogenase	

4613990..4615003	iolG2	Inositol 2-dehydrogenase/D-chiro-inositol 3-dehydrogenase	
1188384..1189376	cyD	D-cysteine desulphydrase	D-cysteine desulphydrase

Source: Data from the research using the bioinformatics tools already described in the methodology.

The genes encoded in the set described in table 1 are related to several physiological processes in plants and contribute directly or indirectly to their growth and development, including mechanisms as the solubilization of minerals and siderophores that act in iron uptake.

The sequence analysis indicated that in the present *Serratia marcescens* genome was observed interesting genes for industries (Table 2).

**Table 2.** Genes involved in the antimicrobial activities or important enzymes for industry.

Location	Gene	Product	Pathway
1490734..1491864	<i>grD1</i>	Linear gramicidin synthase subunit D	Gramicidin synthesis
2106391..2109378	<i>grD2</i>	Linear gramicidin synthase subunit D	
2287830..2289554	<i>grD3</i>	Linear gramicidin synthase subunit D	
3621738..3630248	<i>grD4</i>	Linear gramicidin synthase subunit D	
2321416..2324511	<i>ycB</i>	Tyrocidine synthase 2	Tyrocidine synthesis
3339016..3340038	<i>nsA</i>	L-asparaginase 1	Asparaginase synthesis
810898..811944	<i>nsB</i>	L-asparaginase 2	
3305129..3306745	<i>prA1</i>	Serralysin C	Serralysin
3975333..3976796	<i>prA2</i>	Serralysin	
2419429..2423367	<i>wrW</i>	Serrawetin W1 synthetase	Serrawettin
1935071..1936036	<i>vcA</i>	paerucumarin biosynthesis protein PvcA	Paerucumarin
1934111..1934974	<i>vcB</i>	pyoverdine chromophore biosynthetic protein PvcB	Pioverdin
3492125..3493030	<i>dmC</i>	Aclacinomycin methylesterase	Aclacinomycin
1793656..1794648	<i>gb</i>	Virginiamycin B lyase	Virginiamycin
4541527..4542810	<i>odA</i>	Cytosine deaminase	Cytosine

1932827..1934086	ebG	4'-demethylrebeccamycin synthase	<b>Rebeccamycin</b>
2384684..2385199	biC	Chorismate pyruvate-lyase	<b>4-hydroxybenzoate Production</b>
1087373..1088089		Laccase domain protein	<b>Laccase</b>
1758635..1759366		Laccase domain protein	<b>Laccase</b>
1365960..1366358	ulS	Pullulanase secretion protein	<b>Pullulanase</b>
3193302..3195146		Lipase	<b>Lipase</b>
3825243..3827231	peE	Lipase	<b>Lipase</b>
1304805..1305767	feX1	putative deferrochelataase/peroxidase YfeX	<b>Predicted dye-decolorizing peroxidase (DyP), YfeX-like subgroup</b>
4817785..4818684	feX2	putative deferrochelataase/peroxidase YfeX	<b>Predicted dye-decolorizing peroxidase (DyP), YfeX-like subgroup</b>
160868..162139	lpX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	
160103..160726	lpP1	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	
2965578..2966171	lpP2	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	<b>Protease</b>
785408..785728	lpS	ATP-dependent Clp protease adapter protein ClpS	
2177784..2179724	tsH	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	
162286..164688	on	Lon protease	
503103..503648		antibiotic biosynthesis monooxygenase	<b>Antibiotic biosynthesis</b>
599468..599815		antibiotic biosynthesis monooxygenase	<b>Antibiotic biosynthesis</b>
905395..905697		antibiotic biosynthesis monooxygenase	<b>Antibiotic biosynthesis</b>
2877296..2877583		antibiotic biosynthesis monooxygenase	<b>Antibiotic biosynthesis</b>
2719913..2721460	acC	Levanase	<b>Levanase</b>
3493198..3494697		Carboxypeptidase M32	<b>Carboxipeptidase</b>
128463..129065	hpC/Prx1	Alkyl hydroperoxide reductase C	
505946..506422	smC/Ohr	OsmC/Ohr family protein	<b>Redox-relevant proteins</b>
4681856..4682587	rx5	Hybrid peroxiredoxin hyPrx5	<b>Peroxiredoxin</b>
4260562..4261026	cp	Peroxiredoxin Bcp	

1630232..1631041	<i>xyR1</i>	Hydrogen peroxide-inducible genes activator	
2417256..2418143	<i>xyR2</i>	Hydrogen peroxide-inducible genes activator	
4680787..4681704	<i>xyR3</i>	Hydrogen peroxide-inducible genes activator	
793069..794040	<i>rxB</i>	Thioredoxin reductase	
3922748..3923074	<i>rxA</i>	thioredoxin-1	
4036817..4037236	<i>rxC</i>	thioredoxin-2	
3685812..3687032		FMN oxidoreductase / NADH oxidase	
1426084..1428279	<i>atG</i>	Catalase-peroxidase	
1602395..1603831	<i>atA</i>	Catalase	
3132548..3133099	<i>tuE</i>	Thioredoxin/glutathione peroxidase BtuE	
555140..555643	<i>ps</i>	DNA protection during starvation protein	<b>Redox-relevant proteins</b>
3182642..3183220	<i>odB</i>	Superoxide dismutase [Fe]	
3195388..3195909	<i>odC</i>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	
3842725..3843345	<i>odA</i>	Superoxide dismutase [Mn]	
748967..749230	<i>rxA</i>	Glutaredoxin 1	
1065094..1065741	<i>rxB</i>	Glutaredoxin 2	
3184654..3185001	<i>rxD</i>	Glutaredoxin 4	
4062518..4062748	<i>rdH</i>	Glutaredoxin-like protein NrdH	
4668552..4669904	<i>or</i>	Glutathione reductase	
1305840..1306949	<i>ybdK</i>	Putative glutamate--cysteine ligase 2	
1774900..1776462	<i>gshA</i>	Glutamate--cysteine ligase	
891799..892272	<i>soxR</i>	Redox-sensitive transcriptional activator SoxR	
2314122..2317031		Non Ribosomal Peptide Synthetase	<b>NRPS</b>
2141301..2143492		CRISPR with 37 repeat units	<b>Crispr</b>
2151971..2152778		CRISPR with 14 repeat units	
2060837..2062021	<i>hIA</i>	Beta-ketothiolase	<b>Butanol Biosynthesis</b>
1699934..1701244	<i>adI</i>	3-ketoacyl-CoA thiolase FadI	<b>Fosmidomicyn</b>

4021254..4022417	<i>adA</i>	3-ketoacyl-CoA thiolase	
2059895..2060818	<i>bd</i>	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	
4858741..4859607	<i>aaF</i>	2,3-dehydroadipyl-CoA hydratase	
2291302..2293044		putative acyl-CoA dehydrogenase fadE25	
2293034..2294734		Cyclohexane-1-carbonyl-CoA dehydrogenase	
3359406..3362078	<i>dhE</i>	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	
3716600..3718120	<i>ld1</i>	Long-chain-aldehyde dehydrogenase	
2617805..2618833	<i>dh1</i>	Alcohol dehydrogenase	
3670580..3671665	<i>dh2</i>	Alcohol dehydrogenase	
3718188..3719204	<i>dhA</i>	Alcohol dehydrogenase 1	
213877..215097	<i>sr</i>	Fosmidomycin resistance protein	
251867..253057	<i>cr1</i>	Bicyclomycin resistance protein	<b>Bicyclomycin</b>
1540827..1542023	<i>cr2</i>	Bicyclomycin resistance protein	

Source: Data from the research using the bioinformatics tools already described in the methodology.

The wide variety of gene repertoire allows *S. marcescens* to arouse the interest of different branches of the industry, especially food, chemical, and pharmaceuticals. In the latter, the emphasis would be on agents with antimicrobial capacity that are increasingly important in this sector.

Some sets of genes can indirectly support plant growth promotion. Table 3 displays genes that enable the degradation of xenobiotics substances in the environment.

**Table 3.** Selected metabolism xenobiotics genes.

Position	ene	Pathway
244791..245300	<i>bhC</i>	Biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase <b>Biphenyl degradation</b>
3359406..3362078	<i>bhJ2</i>	Aldehyde-alcohol dehydrogenase
1431084..1432136		nitronate monoxygenase <b>Degradation of nitronates</b>

270893..271597	<i>zoR1</i>	FMN-dependent NADH-azoreductase	
1197216..1197815	<i>zoR2</i>	FMN-dependent NADH-azoreductase	<b>Degradation of azo dyes</b>
3483743..3484348	<i>zoR3</i>	FMN-dependent NADH-azoreductase	
1385273..1385860		Nitroreductase	
2028972..2030684	<i>tsA</i>	Arylsulfatase	<b>Degradation of aryl sulfates</b>
2789519..2791282		Arylsulfatase	
3296973..3297431	<i>iorA</i>	isoquinoline 1-oxidoreductase alpha subunit (EC 1.3.99.16)	<b>N-heterocyclic aromatic compound degradation</b>
3294751..3296973	<i>orB</i>	isoquinoline 1-oxidoreductase beta subunit (EC 1.3.99.16)	
2434314..2434766	<i>roQ</i>	3-dehydroquinate dehydratase	<b>Quinate degradation</b>
4552790..4553890	<i>roB</i>	3-dehydroquinate synthase	
598436..599455		Cytochrome P450	<b>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</b>
2295600..2296796		Cytochrome P450	
1819025..1820365	<i>caK</i>	4-hydroxybenzoate transporter PcaK	<b>Hydroxybenzoate degradation</b>
4302728..4304077	<i>hbT</i>	3-hydroxybenzoate transporter MhbT	
1333277..1335343	<i>aaZ</i>	Bifunctional protein PaaZ	<b>Phenylacetate degradation</b>
1335661..1336599	<i>aaA</i>	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit A	
1336621..1336908	<i>aaB</i>	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit B	
1336917..1337675	<i>aaC</i>	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit C	
1337685..1338182	<i>aaD</i>	Putative 1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit D	
1338196..1339254	<i>aaE</i>	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit E	
1339263..1340036	<i>aaF1</i>	2,3-dehydroadipyl-CoA hydratase	
1340040..1340831	<i>aaG</i>	1,2-epoxyphenylacetyl-CoA isomerise	
1340834..1342363	<i>aaH</i>	3-hydroxyadipyl-CoA dehydrogenase	

1342360..1342800	aaI	Acyl-coenzyme A thioesterase PaaI	
1342797..1344002	aaJ	3-oxoadipyl-CoA/3-oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA thiolase	
1344018..1345325	aaK	Phenylacetate-coenzyme A ligase	
1345404..1346342	aaX	Transcriptional repressor PaaX	
4858741..4859607	aaF2	2,3-dehydroadipyl-CoA hydratase	
3548984..3550480	aeA		
3703319..3704146	bfK	Carboxylesterase	<b>Organophosphates, Carbamates and Pyrethroids Degradation</b>
1108361..1109335	hl1		
3730397..3731275	hl2		
499125..499748	stB1		
525352..526008	stB2	Glutathione S-transferase	
713294..713914	stB3		
1351981..1352598	stB4		
903120..903623	qjA1	Inner membrane protein YqjA	
2535596..2536276	qjA2	Inner membrane protein YqjA	
2534611..2534982	qjC	Protein YqjC	<b>Degradation of various xenobiotics compounds</b>
2534141..2534446	qjD1	putative protein YqjD	
4065045..4065353	qjD2	putative protein YqjD	
2531706..2532692	qjG	Glutathionyl-hydroquinone reductase YqjG	
2533737..2534138	qjE	Inner membrane protein YqjE	
2532763..2533158	qjF	Inner membrane protein YqjF	
309356..310000	qjI	Transcriptional regulator YqjI	
599468..599815	qjZ	putative protein YqjZ	

Source: Data from the research using the bioinformatics tools already described in the methodology.

Healthy environmental conditions are essential for plant survival and growth. For example, the set of genes in Table 3 supports the degradation of substances discarded by industries, such as synthetic textile dyes and heavy metals, helping to support the soil quality.

Growth-promoting bacteria that have the ability to survive in places with the presence of antibiotics and heavy metals have greater added value. Table 4 presents some relevant genes in this context.

**Table 4.** Genes responsible for the resistance to different metals and antibiotics.

Position	ene	Product	Pathway
3559798..3561174	<i>zcD</i>	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein	<b>Cobalt-zinc-cadmium resistance</b>
3259449..3259841		transcriptional regulator	
4722901..4724295	<i>pxA1</i>	Sensor histidine kinase CpxA	<b>Multidrug Resistance Cascade</b>
4824636..4825931	<i>pxA2</i>	Sensor histidine kinase CpxA	
4721578..4722057	<i>pxP</i>	Periplasmic protein CpxP	
4722206..4722904	<i>pxR1</i>	Transcriptional regulatory protein CpxR	
4823922..4824602	<i>pxR2</i>	Transcriptional regulatory protein CpxR	
4231962..4233395	<i>gtE</i>	Magnesium transporter MgtE	
277974..278876	<i>orC</i>	Magnesium and cobalt efflux protein CorC	<b>Magnesium and cobalt efflux protein</b>
3972332..3974650	<i>ntA</i>	zinc/cadmium/mercury/lead-transporting ATPase	<b>Zinc/cadmium/mercury/lead-transporting</b>
356111..357073	<i>ntB</i>	zinc transporter ZitB	<b>Zinc transporter</b>
1039135..1040082	<i>nuA</i>	zinc ABC transporter substrate-binding protein	
1040158..1040916	<i>nuC</i>	zinc import ATP-binding protein ZnuC	
1040913..1041698	<i>nuC</i>	zinc ABC transporter permease	
220203..222914	<i>opA</i>	Copper-exporting P-type ATPase	<b>Copper Resistance</b>
1054097..1054855	<i>utC</i>	copper homeostasis protein CutC	

1679204..1679566)	<i>csA</i>	copper resistance protein	
2927427..2928308	<i>rd</i>	copper resistance protein D	
4495263..4495946	<i>utF</i>	copper homeostasis/adhesion lipoprotein NlpE	
1679204..1679566	<i>scsA</i>	copper resistance protein	
1677118..1679154	<i>csB</i>	protein-disulfide reductase	
1676405..1677121	<i>csC</i>	thioredoxin domain-containing protein	
1675912..1676412	<i>csD</i>	protein disulfide oxidoreductase	
2560078..2560518	<i>ac6'-Ic</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	<b>Aminoglycoside</b>
3238359..3239495	<i>rt-2</i>	Beta-lactamase	<b>Cefotaxime, cephalosporin</b>
3578532..3579713	<i>et(41)</i>	Tetracycline efflux pump	<b>Tetracycline</b>
4526805..4527437	<i>rp</i>	Regulator of MdtEF multidrug efflux pump expression.	<b>Fluoroquinolone, macrolide, penam</b>
893514..896538	<i>exI</i>	Inner membrane transporter of the efflux complex MexGHI-OpmD	<b>Fluoroquinolone, tetracycline</b>
2907627..2910747	<i>qxB</i>	Efflux pump	<b>Fluoroquinolone, glycylcycline, nitrofurans, tetracycline</b>
3357594..3357995	<i>-ns</i>	Repressor of the membrane fusion protein genes	<b>Cephalosporin, cephamycin, fluoroquinolone, macrolide, penam, tetracycline</b>

Source: Data from the research using the bioinformatics tools already described in the methodology.

Bacterial resistance to metals and antimicrobials present in *S. marcescens* can bring advantages and allow the plant to survive in environments with multiple stresses, making the bacteria attractive, even for use in bioremediation of the environment.

Complementary characteristics in PGPR bacteria, such as the ability to defend against plant parasites, which can play an important role, are described in table 5.

**Table 5.** Genes responsible for the nematicidal and larvicidal kill genes.

Position	ene	Product	Pathway
4140944..4142197	<i>lyA</i>	Serine hydroxymethyl transferase	<b>Acetaldehyde</b>

3359406..3362078	<i>dhE</i>	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	
3670580..3671665	<i>dh</i>	Alcohol dehydrogenase	
3045834..3047330	<i>uuC</i>	NADP/NAD-dependent aldehyde dehydrogenase PuuC	
919496..919756	<i>cnA</i>	Hydrogen cyanide synthase subunit HcnA	
919749..921017	<i>cnB</i>	Hydrogen cyanide synthase subunit HcnB	Cyanide
918375..919499	<i>cnC</i>	Hydrogen cyanide synthase subunit HcnC	
1655365..1656882	<i>urF</i>	Amidophosphoribosyltransferase	Member of the purine/pyrimidine phosphoribosyltransferase family
3336851..3338128	<i>hiA1</i>	Chitinase	
3889421..3891112	<i>hiA</i>	Chitinase	
4797788..4799287	<i>hiB</i>	Chitinase	Chitin degradation
286807..288246	<i>hid</i>	Chitinase	
2419429..2423367	<i>wrW</i>	Serrawetin W1 synthetase	Serrawettin

Source: Data from the research using the bioinformatics tools already described in the methodology.

The presence of compounds of microbial origin with insecticidal and larvicide potential is interesting for plant growth promoter candidates because it also allows its use in biocontrol activity.

## 4 Discussion

### 4.1 Genes involved in the plant growth promotion traits

In the present *Serratia marcescens* genome was observed genes related to several systems involved in plant-growth promotion (table 1). Among the systems found, the Tryptophan biosynthesis pathway, a system related to several physiological processes in plants, including the biosynthesis of phytohormone indole acetic acid (IAA) (Khan et al., 2017), another system also observed in the present sample. Unfortunately, IAA biosynthesis does not have its mechanism fully elucidated. However, it is known that phytohormones such as auxins and cytokinins are involved in critical physiological processes of plants such as cell wall elongation and cell division stimulus, respectively (Xie, Essemine, Pang, Chen, & Cai, 2020). The IAA

can act as an inducer compound of Induced Systemic Resistance (ISR). The ISR is an important plant defense mechanism against a broad range of pathogens, parasitic weeds, and even insect herbivores. PGPR producing IAA may enhance the resistance against pathogens. The ISR has already been shown to be effective in rhizobacterium *S. marcescens* acting as a PGPR (Ryu et al., 2013).

The present genome also contains genes that express the non-protein amino acid gamma-aminobutyric acid (GABA), a well-known neurotransmitter in the mammalian body first isolated in 1949, but with less than 20 years of study in plant organisms. Until no less than six years ago, the influence of GABA in the plant-growth was described (Ramesh, Tyerman, Gilliam, & Xu, 2017) identify a plant 'GABA receptor' that inhibits anion passage through the aluminum-activated malate transporter family of proteins (ALMT) and propose that GABA regulation of ALMT activity could function as a signal that modulates plant growth, development, and stress response.

This study also demonstrates other growth promoters in plants that act indirectly, such as the biosynthesis and transport capacity of several polyamines, more precisely putrescine, cadaverine, and spermine, which stimulate the endogenous production of growth promoters such as IAAs and reducing growth inhibitors (A. A. Amin, Gharib, El-Awadi, & Rashad, 2011). Chitin degradation is also an indirect growth mechanism present in this *Serratia* strain, proving to be an important factor in several microbiological agents in controlling pathogenic fungi in several plant species (Das et al., 2010). The capacity of acetoin synthesis complements promoting indirect growth as a precursor agent of volatile bacterial compounds (Sharifi & Ryu, 2018).

It also has a mechanism for the production of siderophores, organic compounds that act in iron uptake. Since iron is abundant in its insoluble form in the soil, siderophores act on the excretion of substances, forming soluble compounds with iron and then being absorbed (Parmar & Chakraborty, 2016). The siderophores that the present strain produces are Bacterioferritin, enterobactin, and isochorismate.

Another system for promoting plant growth found in this genome involving the solubilization of minerals is the Phosphate solubilization system, both organic and inorganic. Phosphate is commonly found in the soil in its insoluble form (Rodríguez & Fraga, 1999), so the performance of these mechanisms becomes essential for the absorption of the mineral. It is worth noting that the present strain also contains the *gcd* and *pqq* gene complex, which respectively code for glucose dehydrogenase and pyrroloquinoline quinone, also called the quinoprotein glucose dehydrogenase complex. A complex that acts in the release of gluconic

acid in the soil, helping in the solubilization of inorganic phosphate. Highlighting that the *pqq* gene acts as a cofactor for the performance of glucose dehydrogenase (Abreo & Altier, 2019). Although phosphate is rarely present in its organic form in the soil, with average measurements around 1 ppm or even less in some cases, its role is also crucial in promoting plant growth. To be absorbed, soil bacteria act by hydrolyzing organic phosphate to inorganic phosphate and then proceed to absorption with the originally inorganic phosphate (Rodríguez & Fraga, 1999).

Still, on mineral solubilization, the present *S. marcescens* genome has zinc solubilization genes, which in turn have a direct relationship with gross growth. Bearing in mind that zinc deficiency can cause plant growth retardation, chlorosis, reduced leaf size, greater susceptibility to heat and fungal infections, it can affect grain and pollen yield, water uptake, and, in some plant species, the yellowing of the leaves (Kamran et al., 2017). Moreover, the solubilization of zinc also ends up helping in the production of siderophores.

Other genes presented by this strain promote chemotaxis activity. This activity is important because it is known that PGPR tends to have positive chemotaxis towards higher concentrations of sugars, thus being able to bring more substrates to plants and directly influence growth (Pedraza et al., 2010).

#### **4.2 Genes involved in antimicrobial activities or important enzymes for industry**

The functional diversity of the *S. marcescens* genome presents genes of interest for the pharmaceutical and medical sector, likewise the food, cosmetics, and fuel industries (table 2).

Among some products, we can highlight the versatile enzyme L-asparaginase that includes the medical application of its antimicrobial and anti-inflammatory properties besides its use as a chemotherapeutic agent in different cancer cell lines (Abdel- Razik et al., 2019). The strategy of using novel therapeutic agents isolated from *S. marcescens* has been previously demonstrated in a marine strain with antioxidant and antibacterial activity against some Gram-positive and Gram-negative bacteria. (Gangadharan et al., 2020).

The food sector benefits from L-asparaginase mitigation effect due to toxic acrylamide, making it an essential component in food processing industries. This sector can demand the enzyme either considering its application in plant growth promotion. The L-Asparagine is the most abundant metabolite for the storage and transport of nitrogen in plants and impacts vegetable production. The L-asparaginase breaks down asparagine into aspartic acid and ammonia, providing nutrition directly and indirectly as a precursor of other amino acids that stimulate plant growth. Furthermore, the L-asparaginase is essential for developing seeds and grains (Damare and Kajawadekar, 2020).

The antimicrobial property is also of particular interest in Gramicidin D, a natural antimicrobial peptide produced by the soil microorganism *Bacillus brevis* ATCC 8185 during its sporulation phase. This ionophoric antibiotic forms membrane channels resulting in pores' formation, leading to cell disruption and loss of solutes and ions. The Gramicidin D has been effective against antibiotic resistant microorganisms, inhibiting the genetic material synthesis and respiration and reducing ATP, leading to cell death (Pavithrra and Rajasekaran, 2020).

The high hemolytic activity of Gramicidin D turns it more suitable where there is low hemolytic activity, as in antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* (Gumila et al., 1997) and plants with some benefits already been demonstrated in oat roots (Hodges et al., 1971).

The food sector can also benefit from the presence of the peptide tyrocidine that has an unexplored antifungal effect against some agronomically relevant fungal phytopathogens (Troskie et al., 2014). The tyrocidines can be associated with gramicidin, either encoded by our *S. marcescens* strain in an antimicrobial compound called tyrothricin that shows activity against bacteria, fungi, and some viruses. This antibiotic demonstrated a low risk of resistance development in vitro, turning it a valuable therapeutic option to consider against the antibiotic resistance process (Stauss-Grabo et al., 2014).

Additionally, even new strategies proposed to treat antibiotic resistance, like bacterial predation, effective against some Gram-negative bacteria (Rames, 2020), find a barrier in our strain as a result of the metalloprotease serralyisin that can reduce the ability of some predators to attach to the *S. marcescens*, conferring protection (Garcia et al., 2018). Serralyisin, a virulence factor used medicinally as a proteolytic enzyme, is therapeutically useful in the management of pain and inflammation as a broad spectrum anti-inflammatory drug (Tiwari, 2017), digests non-living tissue, blood clots, cysts, and arterial plaque (Rouhani et al., 2020) and has an anticancer potential (Araghi et al., 2019).

Our *S. marcescens* sample revealed the peroxiredoxins OsmC/Ohr, Prx5, and Prx6 proteins. Peroxiredoxins are ubiquitous peroxidases that play an important role in antioxidant defense and regulating cell signaling pathways (Perkins et al., 2015). Ohr is involved in the host-pathogen interface, while OsmC participates more in the oxidative defense (Alegria et al., 2017). Moreover, Prx5 and Prx6 are being related to cancer prevention, although more studies are necessary to understand the interaction pattern with cancer cells (Forshaw et al., 2019).

For the best of our knowledge, all the four proteins associated with peroxiredoxins discussed above (OsmC/Ohr, Prx5, and Prx6) were not reported in *Serratia marcescens* before, revealing its potential and possible use in the host-pathogen interface and cancer management.

The use of substances produced by the *Serratia* genus and present in our lineage has benefits, including agronomy. Plant protecting properties of the biosurfactant serrawettin, for example, turns the *S. marcescens* an interesting candidate for controlling and preventing Oomycete pathogens infestation of plants (Strobel et al., 2002). Mechanisms of plant growth promotion include the synthesis of siderophores which can solubilize and sequester iron from the soil. The presence of the siderophore pyoverdine may provide iron to plants. This supply helps the bacteria to protect plants against the inhibitory effects of high concentrations of nickel, lead, and zinc (Burd et al., 2000).

The *S. marcescens* genome also carries genes encoding enzymes like Laccase, a component of prokaryotic lignin-degrading systems. This ligninolytic genetic repertoire is reinforced by the gene YefX encoding dye-decolorizing peroxidase (DyP). This heme peroxidase is more efficient in degrading lignin than classical peroxidase considering the ability of DyP to degrade aromatic compounds that constitute approximately 90% of the lignin (Melo-Nascimento et al., 2020). Thus, the industry can benefit from lignin uses. Additions of alkali lignin to pet and human food can be an important fiber source, especially considering that high nutritional fiber relates to low occurrences of colon cancer (Naseem et al., 2016).

The DyP ability to degrade lignin can benefit its utilization as a carbon source. Considering that lignin is one of the most abundant organic macromolecules in the biosphere, it can constitute a renewable carbon feedstock, potentially reducing the use of petroleum-derived chemicals (Brown and Chang, 2014).

The dye-decolourizing activity that gives name to the peroxidase may also benefit the industry operating in bioremediation, degrading synthetic dyes, and remediating phenolic environmental pollutants. Particularly important considering that synthetic dyes are employed in diverse industries such as food, textile, plastics, food, and pharmaceutical (Falade and Ekundayo, 2021). Bioremediation strategies using *S. marcescens* have been developed as a promising alternative for marine ecosystems impacted by petroderivatives (dos Santos et al., 2021).

The versatility is also present in Lipases, ubiquitous enzymes that hydrolyze ester bonds of triglycerides at oil-water. Its enantioselectivity in biocatalytic hydrolysis is being used in the pharmaceutical industry to produce key intermediates of the diltiazem hydrochloride used in circulatory disorders pharmacos and the anti-inflammatory ketoprofen (Long et al., 2007; Shibatani et al., 2000). Another application of the enzyme is its use to produce monoacylglycerols and diacylglycerols, which have the advantage of being biodegradable and non-toxic and are widely used as emulsifiers in food, pharmaceutical, and cosmetic industries

(Zied et al., 2018). In addition, the lipases are known for their ability in the industry of oil and lipid processing, detergent production, and biotransformation (García-Silvera et al., 2018; Zied et al., 2018). Some studies have shown some applicability for *S. marcescens* lipase, such as petroleum biodegradation regenerating contaminated areas, generation of emulsifiers from cheap vegetable oils, and biodiesel production (García-Silvera et al., 2018; Peixoto et al., 2017; Zied et al., 2018).

Some microorganisms have been using the Butanol biosynthesis system for biofuel production. Butanol is a sustainable technology for alternate and renewable energy, being less corrosive and with higher energy content per unit mass than traditional fuels. The butanol potential includes its use as a solvent and a platform chemical in the cosmetic and pharmaceutical industry (Lv et al., 2021).

### **4.3 Selected metabolism of xenobiotics genes**

#### **4.3.1 Degradation of azo dyes and hydroxybenzoate degradation**

There is a need for healthy environmental conditions, such as water purity and soil integrity and strength, to promote plant growth. The global aquatic resources undergo endless threats due to the discharge of several substances such as synthetic textile dyes and heavy metals, mainly from industries (Mahmood et al., 2017).

The azo dyes are a group of synthetic chemicals present in wastewaters dumped by textile industries. The water contaminated by this group of dyes affects the nearby waters used for agriculture and other purposes. Moreover, it is hard to remove from agricultural soils because of their complex structure (Mahmood et al., 2017).

Following these lines, the contaminated water irrigates plants that incorporate these chemical substances bringing harmful effects both for the plant and for the consumer (Mahmood et al., 2017).

Our group found in the *S. marcescens* genome the system of degradation azo dyes (Table 3). It is of common knowledge that this system is responsible for decolorized azo dyes through NADH-ubiquinone: oxidoreductase enzyme activity. This group of dyes is associated with impaired plant metabolism, health, and growth (Mahmood et al., 2017).

The *S. marcescens* use may provide the soil and plant azo dyes decontamination, which can be associated with plant growth and metabolism improvement. Besides, healthy soil is essential to promote a whole agriculture quality (Ahmed et al., 2016).

Plants naturally contain relevant levels of phenolic compounds that are essential to many metabolism events, such as growth, reproduction, and protection against pathogens (Wang et al., 2015). In these lines, the *S. marcescens* genome showed a hydroxybenzoate degradation gene set, which must be considered.

#### **4.3.2 Degradation of nitro compounds, degradation of arylsulfatase and N-heterocyclic aromatic compound degradation**

Other harmful substances are released in the environment, such as 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT), released from demilitarization facilities. This compound is highly toxic and hazardous to all organisms, plants, and humans included. The nitroreductase protein family is involved in reducing nitrogen-containing compounds, such as TNT (You et al., 2015). Some bacteria strains are already used in plants as a detoxifying tool for this kind of environment. Here we report the presence of the nitroreductase protein family in the *S. marcescens* genome, which can also be used for the plant environment decontamination and improvement.

It is common knowledge that arylsulfatase is important to  $\text{SO}_4^{2-}$  plant uptake throughout the mineralization of organic sulfur (S) to  $\text{SO}_4^{2-}$  and it is from bacteria strains (Knauff, Schulz, & Scherer, 2003). Sulfur plays a fundamental role in plant metabolic processes and protein production, which prompts the plant growth or development and filling of grains, for example (Hawkesford, 2007). The S absence is harmful to the plant, and the arylsulfatase is essential to provide this nutrient for the plant (Knauff et al., 2003).

Besides, heterocyclic compounds are a group of chemicals also found in the environment. Some of these compounds can accumulate in the soil, leading to toxicity to plants and humans (Seo, Keum, & Li, 2009). The *S. marcescens* genome sequencing showed the arylsulfatase system and N-heterocyclic aromatic compound degradation system presence, which indicates one more important role of this bacterium in promoting plant growth and health.

#### **4.3.3 Quinate degradation**

Quinate is an important compound produced and used by plants. It is a precursor for chlorogenic acids (CGAs) biosynthesis. The CGAs act in leaves and fruits as a protective agent against pathogens and fungus and play an antioxidant role, protecting the plant against UV radiation damage (Gritsunov, Peek, Diaz Caballero, Guttman, & Christendat, 2018).

The quinate degradation system is essential to provide the active compound from the quinate pathway and could be used to help in plant protection promotion, which could allow their growth and metabolism improvement.

#### **4.3.4 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 and hydroxybenzoate degradation and degradation of various xenobiotics compounds**

The cytochrome P450 (CYP) is an enzymatic protein superfamily found in several organisms, such as mammals, fungi, plants, and bacteria. It is composed of enzymes essential in many plant metabolic pathways, plant growth, development, and defense (Xu, Wang, & Guo, 2015). The CYP family is also important in the detoxication of herbicides in plants (Stiborová, Schmeiser, & Frei, 2000).

Although the cytochrome P450 is already found in plants, exogenous origin use could be an essential tool for improving plant metabolism. Our group described, throughout the genome *S. marcescens* sequencing, the presence of this xenobiotics metabolism system. When applied in plant improvement, this strain could be used to deliver this system to the plant, and it can be applied in several contexts. For example, the use of contaminated soil for agriculture or plant cultures that demand high herbicide doses require a robust detox mechanism, which could not be sufficient (Gong, Jiao, Hu, & Pua, 2005). In these scenarios, the use of exogenous systems of xenobiotics metabolism could allow this kind of culture and even improve plant growth and health.

Besides, many systems of degradation of xenobiotics compounds were found in *S. marcescens* sequencing. These pathways are essential in restraining oxidative damage, xenobiotics detox, and many stress responses that are important in plant metabolism and growth (Gong et al., 2005). These systems are composed of several proteins, such as glutathione S-transferases (GSTs). Gong and colleagues (2005) showed that in vivo, the GSTs expression was related to changes in plant growth and shoot regeneration in vitro. These data demonstrate de GSTs influence in plant growth and metabolism, which could be applied in biotechnological approaches through *S. marcescens* usage.

#### **4.3.5 Phenylacetate degradation**

The Phenylacetic acid (PAA), also known as phenylacetate, belongs to a group called auxins, a class of hormones essential in plant metabolism (Cook, 2019).

PAA was described as a growth-promoting hormone, and later studies, comparing PAA with the auxin IAA, demonstrated PAA's higher activity in stimulating lateral root. The few studies with this auxin suggest PAA's predominant role in root growth and plant regular growth maintenance (Cook, 2019). Possibly PAA is important in other plant mechanisms, but more studies must deep investigate its whole function.

The *S. marcescens* sequencing showed a phenylacetate degradation system which must be considered in its biotechnology use, once this strain characteristic could promote the antagonist effect proposed.

#### **4.4 Genes responsible for the resistance to different metals and antibiotics**

*The success of bioremediation is related to the bacteria's ability to survive in a contaminated environment, among others, by antimicrobials and heavy metals (table 4). It is the case of our strain. For example, the Cpx Regulatory System Up-regulates the Multidrug Resistance Cascade. The Cpx Stress Response has a global effect in a diversity of signal transduction pathways, including the bacterial resistance to antimicrobials (Guest & Raivio, 2016).*

The excessive presence of heavy metals in the environment leads to several problems in soil, such as impaired fertility, decreased microbial activity, and yield losses. This problem affects plant growth and metabolism and carries toxicity to human health (Kacálková, Tlustoš, & Száková, 2009). The *S.marcescens* sequencing showed some relevant genes in heavy metals transporting and zinc/cadmium/mercury/lead-transporting ATPase. These systems are important to transport these heavy metals and could be used in a biotechnology approach to a detox tool for plants that grow in the contaminated soil.

Besides these systems, the copper resistance system was also found in *S. marcescens* sequencing. The excessive copper accumulation in plants leads to several deleterious effects, such as reduced seed germination, impaired plant growth, low yield, and formation of ROS (reactive oxygen species) (H. Amin et al., 2021). Therefore, the presence of an exogenous system could control copper plant concentration and promote plant growth and health.

Metal resistance has been described in a co-selection mechanism with antibiotic resistance, particularly relevant under environmental conditions of metal stress. The selective pressure to survive under stress conditions might contribute to plant growth-promoting bacteria evolve mechanisms to tolerate the uptake of heavy metal and/or the antibiotic presence in soil, for example (Yang et al., 2021).

PGPR bacteria presenting antibiotic and metal resistance genes in parallel have been identified in environments with multiple stress in which the survivor bacterium is probably benefited by acquiring resistance to both causes of stress (Wani & Irene, 2013).

This co-selection may occur as a co-resistance when genes encoding resistance to heavy metals and antimicrobial agents are physically linked to each other (Bazzi et al., 2020). This association has already been described in *S. marcescens* with tetracycline resistance and also to

chloramphenicol and kanamycin in this case, which is genetically linked to As, Cu, Hg, and Ag resistance genes (Gilmour, Thomson, Sanders, Parkhill, & Taylor, 2004).

Other ways occur with the Cross-resistance when the same resistance mechanism confers resistance to both heavy metals and antimicrobial agents. Frequently related to multi-drug efflux pumps and the least common mechanism of co-selection, the Co-regulatory resistance occurs when resistant genes to antimicrobial agents and heavy metals are controlled by a mutual regulatory protein (Bazzi et al., 2020). These mechanisms of co-selection support the direct correlation between antibiotic resistance genes with the concentration of antibiotics and metals found in the manure of Chinese swine farms (Yang et al., 2021).

#### **4.5 Genes responsible for the nematicidal and larvicidal kill genes**

Compounds of microbial origin have been showing a positive protection effect combating plant-parasites (table 5). For example, in the root-knot nematode that impacts the global agricultural production, acetaldehyde demonstrated nematicidal activity by direct contact killing besides the fumigation inhibiting egg hatching (Huang et al., 2020).

The nematicidal effect of other substances as serrawettin and chitinase potentially produced by our strain has already been found in *Serratia* sp. genetically related to *S. marcescens*. The presence of these compounds, according to the author, is important to turn this strain into an attractive candidate as a sustainable alternative for biocontrol in crops of agricultural interest (Méndez-Santiago et al., 2021).

The broad niche and functional diversity of the *S. marcescens* are probably influenced by the highly dynamic genome (Cristina et al., 2019), turning relevant a periodical investigation of the genetic background from various sources, concerning its possible pathogenicity. This research collaborates in this context with the genetic repertoire of a *Serratia marcescens* isolated from food. In addition, the potential application of this strain as a plant growth promoter was evaluated from a genotypic perspective.

#### **Conclusion**

The *S. marcescens* systems described here are relevant in the plant biotechnology approach representing an alternative in promoting plant growth and health. All these systems could improve different mechanisms, both in the plants and their environment. In addition, understanding the genetic background governing this strain may bring new insights into the ecology of *Serratia marcescens*.

To the best of our knowledge, this is the first genome sequence report on *S. marcescens*

isolated from cheese, with potential application as promoting plant growth and providing a baseline for future genomic studies. Future investigations of others *Serratia marcescens* isolated from food will allow comparative analysis that may help to establish a model of the genetic background of the association between *S. marcescens* with plants and the food production process.

## References

- Abdel-Razik, N. E., EL-Baghdady, K. Z., EL-Shatoury, E. H., & G Mohamed, N. (2019). Isolation, optimization, and antitumor activity of l-asparaginase extracted from *Pectobacterium carotovorum* and *Serratia marcescens* on human breast adenocarcinoma and human hepatocellular carcinoma cancer cell lines. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 332–337. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i2.29646>
- Abreo, E., & Altier, N. (2019). Pangenome of *Serratia marcescens* strains from nosocomial and environmental origins reveals different populations and the links between them. *Scientific Reports*, 9(1), 46. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37118-0>
- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., & S. Gupta, R. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacteriales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Ahmed, F., Arshad, M., Ditta, A., Hussain, A., Naveed, M., Hasnain, M., & Nazir, Q. (2016). Combining Textile Effluent Wastewater with Organic Fertilizer for Improved Growth and Productivity of Wheat and Soil Health. *Journal of Environmental and Agricultural Sciences*, 8, 14–20.
- Alegria, T. G. P., Meireles, D. A., Cussiol, J. R. R., Hugo, M., Trujillo, M., de Oliveira, M. A., ... Netto, L. E. S. (2017). Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxyxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2), E132–E141. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619659114>
- Amarsy, R., Pean de Ponfilly, G. ., Benmansour, H. ., Jacquier, H., Cambau, E. ., & Mégarbane, B. (2020). *Serratia marcescens* outbreak in the intensive care unit during the COVID-19 pandemic: A paradoxical risk? *Médecine et Maladies Infectieuses*, 50(8), 750–751. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.05.004>
- Amin, A. A., Gharib, F. A. E., El-Awadi, M., & Rashad, E.-S. M. (2011). Physiological response of onion plants to foliar application of putrescine and glutamine. *Scientia Horticulturae*, 129(3), 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.052>
- Amin, H., Arain, B. A., Jahangir, T. M., Abbasi, A. R., Mangi, J., Abbasi, M. S., & Amin, F. (2021). Copper (Cu) tolerance and accumulation potential in four native plant species: a comparative study for effective phytoextraction technique. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 5(1), 53–64. <https://doi.org/10.1080/24749508.2019.1700671>
- Araghi, A., Hashemi, S., Sepahi, A. A., Faramarzi, M. A., & Amin, M. (2019). Purification and study of anti-cancer effects of *Serratia marcescens* serralysin. *Iranian Journal of Microbiology*, 11(4), 320–327. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31719964>
- Bazzi, W., Abou Fayad, A. G., Nasser, A., Haraoui, L.-P., Dewachi, O., Abou-Sitta, G., ... Matar, G. M. (2020). Heavy Metal Toxicity in Armed Conflicts Potentiates AMR in *A. baumannii* by Selecting for Antibiotic and Heavy Metal Co-resistance Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 11, 68. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00068>
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., ... Xia, F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5(1), 8365. <https://doi.org/10.1038/srep08365>
- Brown, M. E., & Chang, M. C. Y. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.11.015>
- Burd, G. I., Dixon, D. G., & Glick, B. R. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(3), 237–245. <https://doi.org/10.1139/w99-143>
- Cook, S. D. (2019). An Historical Review of Phenylacetic Acid. *Plant and Cell Physiology*, 60(2), 243–254. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz004>
- Cristina, M., Sartini, M., & Spagnolo, A. (2019). *Serratia marcescens* Infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(4), 610. <https://doi.org/10.3390/ijerph16040610>
- Damare, V. S., & Kajawadekar, K. G. (2020). *A preliminary study on L-asparaginase from mangrove detritus-derived fungi and its application in plant growth promotion – MycoAsia*. Retrieved from <http://mycoasia.org/a-preliminary-study-on-l-asparaginase-from-mangrove-detritus-derived-fungi-and-its-application-in-plant-growth-promotion/>

- Das, S. N., Dutta, S., Kondreddy, A., Chilukoti, N., Pullabhotla, S. V. S. R. N., Vadlamudi, S., & Podile, A. R. (2010). Plant Growth-Promoting Chitinolytic *Paenibacillus elgii* Responds Positively to Tobacco Root Exudates. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(4), 409–418. <https://doi.org/10.1007/s00344-010-9152-1>
- Davis, J. J., Wattam, A. R., Aziz, R. K., Brettin, T., Butler, R., Butler, R. M., ... Stevens, R. (2020). The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D606–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz943>
- dos Santos, R. A., Rodríguez, D. M., Ferreira, I. N. da S., de Almeida, S. M., Takaki, G. M. de C., & de Lima, M. A. B. (2021). Novel production of biodispersant by *Serratia marcescens* UCP 1549 in solid-state fermentation and application for oil spill bioremediation. *Environmental Technology*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.1910733>
- Falade, A. O., & Ekundayo, T. C. (2021). Emerging biotechnological potentials of DyP- type peroxidases in remediation of lignin wastes and phenolic pollutants: a global assessment (2007–2019). *Letters in Applied Microbiology*, 72(1), 13–23. <https://doi.org/10.1111/lam.13392>
- Forshaw, T. E., Holmila, R., Nelson, K. J., Lewis, J. E., Kemp, M. L., Tsang, A. W., ... Furdul, C. M. (2019). Peroxiredoxins in Cancer and Response to Radiation Therapies. *Antioxidants*, 8(1), 11. <https://doi.org/10.3390/antiox8010011>
- Friman, M. J., Eklund, M. H., Pitkälä, A. H., Rajala-Schultz, P. J., & Rantala, M. H. J. (2019). Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 61(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0488-7>
- Gangadharan, A., Jolly, J., & John, N. (2020). Bioprospecting of novel therapeutic agents from marine bacterium; *Serratia marcescens*. *Materials Today: Proceedings*, 25, 298–301. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.465>
- García-Silvera, E. E., Martínez-Morales, F., Bertrand, B., Morales-Guzmán, D., Rosas-Galván, N. S., León-Rodríguez, R., & Trejo-Hernández, M. R. (2018). Production and application of a thermostable lipase from *Serratia marcescens* in detergent formulation and biodiesel production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(2), 156–172. <https://doi.org/10.1002/bab.1565>
- Garcia, C. J., Pericleous, A., Elsayed, M., Tran, M., Gupta, S., Callaghan, J. D., ... Kadouri, D. E. (2018). Serralyisin family metalloproteases protects *Serratia marcescens* from predation by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus*. *Scientific Reports*, 8(1), 14025. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32330-4>
- Gilmour, M. W., Thomson, N. R., Sanders, M., Parkhill, J., & Taylor, D. E. (2004). The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid*, 52(3), 182–202. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.06.006>
- Gong, H., Jiao, Y., Hu, W., & Pua, E.-C. (2005). Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development in vivo and shoot morphogenesis in vitro. *Plant Molecular Biology*, 57(1), 53–66. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-4516-1>
- Gritsunov, A., Peek, J., Diaz Caballero, J., Guttman, D., & Christendat, D. (2018). Structural and biochemical approaches uncover multiple evolutionary trajectories of plant quinate dehydrogenases. *The Plant Journal*, 95(5), 812–822. <https://doi.org/10.1111/tpj.13989>
- Guest, R. L., & Raivio, T. L. (2016). Role of the Gram-Negative Envelope Stress Response in the Presence of Antimicrobial Agents. *Trends in Microbiology*, 24(5), 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.001>
- Gumila, C., Ancelin, M. L., Delort, A. M., Jeminet, G., & Vial, H. J. (1997). Characterization of the potent in vitro and in vivo antimalarial activities of ionophore compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(3), 523–529. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.523>
- Hawkesford, M. J. (2007). *Sulfur and plant ecology: a central role of sulfate transporters in responses to sulfur availability*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5887-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5887-5_1)
- Hodges, T. K., Darding, R. L., & Weidner, T. (1971). Gramicidin-D-stimulated influx of monovalent cations into plant roots. *Planta*, 97(3), 245–256. <https://doi.org/10.1007/BF00389205>
- Huang, D., Yu, C., Shao, Z., Cai, M., Li, G., Zheng, L., ... Zhang, J. (2020). Identification and Characterization of Nematicidal Volatile Organic Compounds from Deep-Sea *Virgibacillus dokdonensis* MCCC 1A00493. *Molecules*, 25(3), 744. <https://doi.org/10.3390/molecules25030744>
- Ishii, K., Adachi, T., Imamura, K., Takano, S., Usui, K., Suzuki, K., ... Sekimizu, K. (2012). *Serratia marcescens* Induces Apoptotic Cell Death in Host Immune Cells via a Lipopolysaccharide- and Flagella-dependent Mechanism\*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), 36582–36592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399667>
- Kacálková, L., Tlustoš, P., & Száková, J. (2009). Phytoextraction of cadmium, copper, zinc and mercury by selected plants. *Plant, Soil and Environment*, 55(No. 7), 295–304. <https://doi.org/10.17221/100/2009-PSE>
- Kamran, S., Shahid, I., Baig, D. N., Rizwan, M., Malik, K. A., & Mehnaz, S. (2017). Contribution of Zinc Solubilizing Bacteria in Growth Promotion and Zinc Content of Wheat. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 2593. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02593>
- Khan, A. R., Park, G.-S., Asaf, S., Hong, S.-J., Jung, B. K., & Shin, J.-H. (2017). Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PLOS ONE*, 12(2), e0171534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171534>
- Knauff, U., Schulz, M., & Scherer, H. W. (2003). Arylsulfatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. *European Journal of Agronomy*, 19(2), 215–223. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(02\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00035-7)

- Long, Z.-D., Xu, J.-H., Zhao, L.-L., Pan, J., Yang, S., & Hua, L. (2007). Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioreolution of racemic ketoprofen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 47(3–4), 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.04.004>
- Lv, Y., Jiang, Y., Peng, W., Fang, Y., Dong, W., Zhou, J., ... Jiang, M. (2021). Genetic manipulation of non- solvent- producing microbial species for effective butanol production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(1), 119–130. <https://doi.org/10.1002/bbb.2152>
- Mahmood, F., Shahid, M., Hussain, S., Shahzad, T., Tahir, M., Ijaz, M., ... Babar, S. A. K. (2017). Potential plant growth-promoting strain *Bacillus* sp. SR-2-1/1 decolorized azo dyes through NADH-ubiquinone:oxidoreductase activity. *Bioresource Technology*, 235, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.098>
- Melo-Nascimento, A. O. dos S., Sant'Anna, B. M. M., Gonçalves, C. C., Santos, G., Noronha, E., Parachin, N., ... Bruce, T. (2020). Complete genome reveals genetic repertoire and potential metabolic strategies involved in lignin degradation by environmental ligninolytic *Klebsiella variicola* P1CD1. *PLOS ONE*, 15(12), e0243739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243739>
- Méndez-Santiago, E. W., Gómez-Rodríguez, O., Sánchez-Cruz, R., Folch-Mallol, J. L., Hernández-Velázquez, V. M., Villar-Luna, E., ... Wong-Villarreal, A. (2021). *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Archives of Microbiology*, 203(2), 549–559. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02051-2>
- Naseem, A., Tabasum, S., Zia, K. M., Zuber, M., Ali, M., & Noreen, A. (2016). Lignin-derivatives based polymers, blends and composites: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 296–313. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.030>
- Parmar, H. Y., & Chakraborty, H. (2016). Effect of siderophore on plant growth promotion. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture*, 2(3). Retrieved from <https://ijapsa.com/papers/volume-2/issue-3/effect-of-siderophore-on-plan-growth-promotion/>
- Pavithra, G., & Rajasekaran, R. (2020). Gramicidin Peptide to Combat Antibiotic Resistance: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 191–199. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09828-0>
- Pedraza, R. O., Motok, J., Salazar, S. M., Ragout, A. L., Mentel, M. I., Tortora, M. L., ... Díaz-Ricci, J. C. (2010). Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 265–272. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0169-1>
- Peixoto, F. B. S., Peixoto, J. C. D. C., Assunção, E. N. de, Peixoto, E. M., Pereira, J. O., & Astolfi-Filho, S. (2017). Petroleum biodegrading and co-resistance to antibiotics by *Serratia marcescens* strain isolated in Coari, Amazonas. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 39(4), 489. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v39i4.36223>
- Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2015). Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(8), 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.001>
- Rames, A. (2020). Predatory Bacteria: A Possible Key for the Lock of Antibiotic Resistance. In *Transactions on Science and Technology* (Vol. 7). Retrieved from <http://tost.unise.org/>
- Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Gilliam, M., & Xu, B. (2017).  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(9), 1577–1603. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2415-7>
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- Rouhani, M., Valizadeh, V., Molasalehi, S., & No-Rouzian, D. (2020). Production and Expression Optimization of Heterologous Serratiopeptidase. *Iranian Journal of Public Health*, 931–939. Retrieved from <http://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/20663>
- Ryu, C.-M., Choi, H. K., Lee, C.-H., Murphy, J. F., Lee, J.-K., & Kloepper, J. W. (2013). Modulation of Quorum Sensing in Acyl-homoserine Lactone-Producing or -Degrading Tobacco Plants Leads to Alteration of Induced Systemic Resistance Elicited by the Rhizobacterium *Serratia marcescens* 90-166. *The Plant Pathology Journal*, 29(2), 182–192. <https://doi.org/10.5423/PPJ.S1.11.2012.0173>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., & Li, Q. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(1), 278–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>
- Sharifi, R., & Ryu, C.-M. (2018). Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of Botany*, 122(3), 349–358. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy108>
- Shibatani, T., Omori, K., Akatsuka, H., Kawai, E., & Matsumae, H. (2000). Enzymatic resolution of diltiazem intermediate by *Serratia marcescens* lipase: molecular mechanism of lipase secretion and its industrial application. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1–3), 141–149. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00122-3)
- Silva, C. R., Okuno, N. T., Macedo, V. H. L. de M., Freire, I. D. R., Miller, R. M., & Marin, V. A. (2020). Resistome in gram-negative bacteria from soft cheese in Brazil. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 19(3), 430. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v19i3.35460>
- Stauss-Grabo, M., Atiye, S., Le, T., & Kretschmar, M. (2014). Decade-long use of the antimicrobial peptide combination tyrothricin does not pose a major risk of acquired resistance with gram-positive bacteria and candida spp. *Pharmazie*, 69(11), 838–841. <https://doi.org/10.1691/ph.2014.4686>
- Stiborová, M., Schmeiser, H., & Frei, E. (2000). Oxidation of xenobiotics by plant microsomes, a reconstituted cytochrome P450 system and

- peroxidase: a comparative study. *Phytochemistry*, 54(4), 353–362. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00123-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00123-0)
- Strobel, G. A., Morrison, S. L., & Cassella, M. (2002). *Protecting plants from oomycete pathogens by treatment with compositions containing serratamolide and oocycin a from Serratia marcescens*. <https://doi.org/C07D493/08>
- Tanizawa, Y., Fujisawa, T., Kaminuma, E., Nakamura, Y., & Arita, M. (2016). DFAST and DAGA: web-based integrated genome annotation tools and resources. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 35(4), 173–184. <https://doi.org/10.12938/bmfh.16-003>
- Tanizawa, Y., Fujisawa, T., & Nakamura, Y. (2018). DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics*, 34(6), 1037–1039. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx713>
- Tiwari, M. (2017). The role of serratiopeptidase in the resolution of inflammation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.01.003>
- Troskie, A. M., de Beer, A., Vosloo, J. A., Jacobs, K., & Rautenbach, M. (2014). Inhibition of agronomically relevant fungal phytopathogens by tyrocidines, cyclic antimicrobial peptides isolated from *Bacillus aneurinolyticus*. *Microbiology*, 160(9), 2089–2101. <https://doi.org/10.1099/mic.0.078840-0>
- Wang, J.-Y., Zhou, L., Chen, B., Sun, S., Zhang, W., Li, M., ... He, Y.-W. (2015). A functional 4-hydroxybenzoate degradation pathway in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* is required for full pathogenicity. *Scientific Reports*, 5(1), 18456. <https://doi.org/10.1038/srep18456>
- Wani, P. A., & Irene, O. I. (2013). Screening of Microbes for Their Metal, Antibiotic Resistance and Plant Growth Promoting Activity. *Current Research in Bacteriology*, 7(1), 22–31. <https://doi.org/10.3923/crb.2014.22.31>
- Xie, Q., Essemine, J., Pang, X., Chen, H., & Cai, W. (2020). Exogenous application of abscisic acid to shoots promotes primary root cell division and elongation. *Plant Science*, 292, 110385. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110385>
- Xu, J., Wang, X., & Guo, W. (2015). The cytochrome P450 superfamily: Key players in plant development and defense. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(9), 1673–1686. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60980-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60980-1)
- Yang, F., Zhang, F., Li, H., Wu, H., Zhao, H., Cheng, X., ... Zhu, J. (2021). Contribution of environmental factors on the distribution of antibiotic resistance genes in agricultural soil. *European Journal of Soil Biology*, 102, 103269. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103269>
- You, S.-H., Zhu, B., Han, H.-J., Wang, B., Peng, R.-H., & Yao, Q.-H. (2015). Phytoremediation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Arabidopsis* plants expressing a NAD(P)H-flavin nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *Plant Biotechnology Reports*, 9(6), 417–430. <https://doi.org/10.1007/s11816-015-0379-y>
- Zied, Z., Edahech, A., Rigano, F., Micalizzi, G., Mondello, L., Kharrat, N., ... Cacciola, F. (2018). Monoacylglycerol and diacylglycerol production by hydrolysis of refined vegetable oil by- products using an immobilized lipase from *Serratia* sp. W3. *Journal of Separation Science*, 41(23), 4323–4330. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800432>

**RESISTOME IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA FROM SOFT CHEESE IN BRAZIL**  
**RESISTOMA EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL NO BRAZIL**

**ABSTRACT**

**Objectives:** evaluation of antibiotic resistance in Gram-negative microbiota from ready-to-eat cheese samples.

**Methodology:** this research applied a specific method to evaluate the phenotypic susceptibility to antibiotics in a viable Gram-negative microbiota. The selected food was a cheese that is commonly consumed without thermal processing, the Minas Frescal cheese. The evaluation was followed by a PCR screening in this resistant microbiota, for genes that provide resistance to antibiotics and also to the quaternary ammonium.

**Results:** all cheese samples demonstrated a resistant microbiota. In 13.3% of the cheese samples analyzed, the resistance reached all ten different antibiotics tested and, in 80%, 8 to 10 different antibiotics. In antibiotics considered critics as the carbapenems: ertapenem presented resistant microbiota in 86.7% of the samples. In cephalosporins, the resistance reached 100% in the third generation (ceftazidime) and almost half of the samples (46.7%) in the fourth generation (cefepime). In genotypic research, seven different resistance genes were found in 69.2% of the bacterial pools, including the beta-lactamase-producing genes *ctx*, *tem*, *shv*, tetracycline resistant genes and a high rate of integrons class 1 and 2.

**Conclusions:** the results indicate phenotypically and genotypically that the Minas frescal cheese can present potential resistant microbiota. Therefore, the methodology used is a viable possibility and with a broader answer about the food microbiota role in resistance. This research corroborates the food area as an important sector to be managed to reduce the process of antibiotic resistance.

**Keywords**

Antibiotic Resistance, food, resistome, Gram-negative bacteria, cheese.

## RESUMO

**Objetivos:** avaliação da resistência a antibióticos em microbiota Gram-negativa de amostras de queijo prontas para consumo.

**Metodologia:** esta pesquisa aplicou um método específico para avaliar a suscetibilidade fenotípica a antibióticos em microbiota Gram-negativa viável. O alimento selecionado foi um queijo frequentemente consumido sem processamento térmico, o queijo Minas Frescal. A avaliação foi seguida de uma triagem por PCR, nesta microbiota resistente, para genes que fornecem resistência aos antibióticos e também ao quaternário de amônio.

**Resultados:** todas as amostras de queijo demonstraram microbiota resistente. Em 13,3% dos queijos analisados essa resistência alcançou todos os 10 diferentes antibióticos testados e, em 80% entre 8 e 10 antibióticos diferentes. Em antibióticos considerados críticos como os carbapenêmicos: ertapenem apresentou microbiota resistente em 86,7% das amostras. Nas cefalosporinas, a resistência atingiu 100% na terceira geração (ceftazidima) e quase metade dos amostras (46,7%) na quarta geração (cefepime). Na pesquisa genotípica, sete diferentes genes de resistência foram encontrados em 69,2% dos pools bacterianos, incluindo o genes produtores de beta-lactamase, genes de resistência à tetraciclina, *ctx*, *tem*, *shv* e uma alta taxa de integron classe 1 e 2.

**Conclusões:** os resultados indicam fenotipicamente e genotipicamente que o queijo Minas Frescal pode apresentar uma potencial microbiota resistente. Portanto, a metodologia utilizada é uma possibilidade viável e com uma resposta mais ampla sobre o papel da microbiota na resistência. Esta pesquisa corrobora a área de alimentos como um setor importante a ser gerenciado para redução no processo de resistência a antibióticos.

### Palavras-chave

Resistência a antibióticos, alimento, resistoma, bactéria Gram-negativa, queijo.

## **Introduction**

Resistant bacteria can be found virtually everywhere: in the environment, humans, animals, water, and food. The latter, though, is often wrongly neglected (WHO, 2017). One Health approach highlights the need for coordination between human and animal surveillance systems aiming an integrated strategy to limit the spread of resistance. Use of antibiotics in food-producing animals provides a potentially significant risk factor for selection and dissemination of antimicrobial-resistant microorganisms to humans, which makes animal-derived food of particular concern. (EFSA, 2017)

In Brazil, cheese, a ready-to-eat dairy product is widely consumed by the adult population and, above all, by the elderly population (IBGE, 2010). Minas Frescal cheese is a traditional Brazilian white and soft cheese with high moisture content (<55%) made with pasteurized milk. It has its own rich and diverse microbiota that impacts its quality and safety (BRASIL, 1997). Moreover, they are usually consumed without any further thermal processing, including nosocomial patients (VICENSKI, PAOLA PASINI ALBERTI, PALOMA AMARAL, 2012).

The research of individual species underestimates the total microbial community and its potential antimicrobial resistance risks (ESCOBAR-ZEPEDA; SANCHEZ-FLORES; QUIRASCO BARUCH, 2016). Since a rapid phenotypic detection of resistance can prevent delays in the selection of optimal therapy (AZIMI et al., 2013), in this study, a methodology to evaluate the resistance present in the food was prevalent over the identification of resistant species.

The World Health Organization recognized the multidrug and extensively drug-resistant Gram-negative bacteria as the most critical microorganisms that researches should focus on (WHO, 2017). In this work, we present an evaluation of the phenotypic resistance and the presence of antibiotic resistant genes in Gram-negative bacteria population in Minas Frescal cheese available in retail stores in Rio de Janeiro city.

## **2 Material and methods**

### **2.1 Sampling**

Fifteen Minas Frescal cheese from 13 different commercial brands was sampled from fifteen supermarket chains in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Exclusively cheese samples in their original intact packaging with the surface temperature at low temperature (less than 8°C) and containing the Federal or State Inspection Seal (sanitary certifications) were purchased. Samples were transported in a thermal container to the Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da Escola de Nutrição (LACOMEN) of the Departamento de Ciência de Alimentos of the Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) no later than 24 hours after collection.

### 2.1 Pre-selection method

Cheese samples were incubated at  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  in GN broth (Oxoid, Basingstoke, UK) for 24 hours. After this enrichment stage, aliquots from each cheese (sample) were diluted in tryptone soya broth (Oxoid, Basingstoke, UK) containing antibiotic discs (Oxoid, Basingstoke, UK) in triplicate (CDC, 2008). The ten antibiotics used in testing were representative of Ambler Classification: Cefepime (30 µg), Ertapenem (10 µg), Gentamicin (10 µg), Ampicillin (10 µg), Ampicillin-sulbactam (10/10 µg), Chloramphenicol (30 µg), Tetracycline (30 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Ceftazidime (30 µg), Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg).

The 15 cheese samples tested with 10 antibiotics result in 150 possible pools of bacteria. Each pool considered positive may contains one or more microorganisms.

### 2.1 Antibiotic Resistance

Positive pools (with growth) followed to disc diffusion based on the guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for antimicrobial disk susceptibility test and Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* from Rectal Swabs (CDC, 2008; CLSI, 2017). The reference strains used in this step were *E. coli* ATCC 25922.

### 2.1 DNA extraction

DNA samples were extracted from the resistant and intermediate pools by using a NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany, 2016) according to the manufacturer's protocol for DNA extraction from Gram-negative bacteria.

## 2.1 PCR

Molecular characterization of phenotypically screened bacterial pools were performed by PCR by using previously published primers and protocols (Table 1). Primers were synthesized by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) and Invitrogen Thermo Fisher Scientific (California, USA). Primer pair ent826/uni515 was used to identify Enterobacteriaceae.

Table 1 - Primers: sequence of nucleotides, amplicon size and references.

Primer	Primer sequence (5' - 3')	Amplicon (bp) <sup>a</sup>	Reference
tem (F) <sup>b</sup>	CATTTCGTCGCGCCCTTATTC	800	(DALLEENNE et al., 2010)
tem (R) <sup>b</sup>	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
shv (F) <sup>b</sup>	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713	(DALLEENNE et al., 2010)
shv (R) <sup>b</sup>	ATCCCGCAGATAAATCACCA		
oxa (F) <sup>b</sup>	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	564	(DALLEENNE et al., 2010)
oxa (R) <sup>b</sup>	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG		
int - 1 (F)	CTGCGTTCGGTCAAGGTTCT	882	(LANZ; KUHNERT; BOERLIN, 2003)
int - 1 (R)	GGAATGGCCGAGCAGATCCT		
int - 2 (F)	CACGGATATGCGACAAAAAGG	788	(LANZ; KUHNERT; BOERLIN, 2003)
int - 2 (R)	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG		
int - 3 (F)	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	979	(LANZ; KUHNERT; BOERLIN, 2003)
int - 3 (R)	ACGGATCTGCCAAACCTGACT		
kpc (F)	GTATCGCCGTCTAGTTCTGC	635	(AZIMI et al., 2013)
kpc (R)	GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC		
ndm (F)	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	(POIREL et al., 2011)
ndm (R)	CGGAATGGCTCATCACGATC		

tet - a (F)	GGCCTCAATTCCTGACG	372	(GUILLAUME et al., 2000)
tet - a (R)	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC		
tet - b (F)	GAGACGCAATCGAATTCGG	228	(GUILLAUME et al., 2000)
tet - b (R)	TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC		
ges-1 to 9, 11 (F) <sup>b</sup>	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399	(DALLEENNE et al., 2010)
ges-1 to 9, 11 (R) <sup>b</sup>	TTTGTCCGTGCTCAGGAT		
per-1, 3 (F) <sup>b</sup>	GCTCCGATAATGAAAGCGT	520	(DALLEENNE et al., 2010)
per-1, 3 (R) <sup>b</sup>	TTCGGCTTGACTCGGCTGA		
veb -1,6 (F) <sup>b</sup>	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	648	(DALLEENNE et al., 2010)
veb -1,6 (R) <sup>b</sup>	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG		
imp (F)	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	188	(DALLEENNE et al., 2010)
imp (R)	CCAAACCACTACGTTATCT		
vim (F)	GATGGTGTGGTTCGCATA	390	(KARUNIAWATI; SAHARMAN; LESTARI, 2013)
vim (R)	CGAATGCGCAGCACCAG		
oxa 48 (F)	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	(POIREL et al., 2011)
oxa 48 (R)	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
uni515 (F)	GTGCCAGCMGCCGCGGTA <sup>c</sup>	312	(BARMAN et al., 2008)
ent826 (R)	GCCTCAAGGGCACAACCTCCAAG		
qacEΔ1 (F)	AATCCATCCCTGTCGGTGTT	175	(GUO et al., 2015)
qacEΔ1 (R)	CGCAGCGACTTCCACGATGGGGAT		
ctx - M (F)	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC <sup>c</sup>	593	(LEFLON-GUIBOUT et al., 2004)
ctx - M (R)	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG <sup>c</sup>		
ctx - M15(F)	ATAAAACCGGCAGCGGTG	483	(LEFLON-GUIBOUT et al., 2004)
ctx - M15 (R)	GAATTTTGACGATCGGGG		
ctx - M1 (F)	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	415	(LEFLON-GUIBOUT et al., 2004)
ctx - M1 (R)	AGCTTATTCATCGCCACGTT		
ctx - M2 (F)	CGACGCTACCCCTGCTATT	552	(LEFLON-GUIBOUT et al., 2004)
ctx - M2 (R)	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG		
ctx - M8 (F)	TCGCGTTAAGCGGATGATGC	327	(LEFLON-

ctx - M8 (R)	AACCCACGATGTGGGTAGC		GUIBOUT et al., 2004)
ctx - M9 (F)	CAAAGAGAGTGCAACGGATG		(LEFLON-
ctx - M9 (R)	ATTGGAAAGCGTTCATCACC	205	GUIBOUT et al., 2004)
ctx - M25 (F)	GCACGATGACATTCGGG		(LEFLON-
ctx - M25 (R)	AACCCACGATGTGGGTAGC	327	GUIBOUT et al., 2004)
mcr-1 (F)	ATTATCCGACTTGGGGCAAGG		(CAVACO; MORDHORST;
mcr-1 (R)	CGCACGATGTGACATTGCTAA	309	HENDRIKSEN, 2016)

a. bp: base pairs;

b. ges, per and veb (multiplex PCR); tem, shv and oxa (multiplex PCR);

c. S = g or c; Y = c or t; K = g or t; M = a or c; R = g or a.

The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis in Tris-borate-EDTA buffer. They were stained with Blue-Green Loading Dye I (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil) and visualized under ultraviolet light.

### 3 Results

#### 3.1 Sample characteristics

All 15 cheese samples analyzed were within all parameters established by the research, allowing to investigate potential failures that occurred during the production process. The cheeses composition was similar: pasteurized milk, sodium chloride, calcium chloride, lactic acid, and rennet, apart from a sample (sample N) added with lactic acid bacteria and without salt. Thirteen different brands, produced in three different states from Brazil were analyzed.

#### 3.2 Phenotypic resistance

In the pre-selection phase, 98% (147/150) of pools were considered resistant. Susceptibility occurred only in ciprofloxacin pools.

Microbiota from all cheese samples showed a high phenotypic resistance, according to the CLSI guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility (CLSI,

2017). Resistance proportions varied from 60% to 100%. The disc diffusion test revealed that Gram-negative microbiota was resistant to at least eight different antibiotics in 80% (12/15) of the cheese samples, and resistant to all tested antibiotics in 13.3% (2/15) (Figure 1).

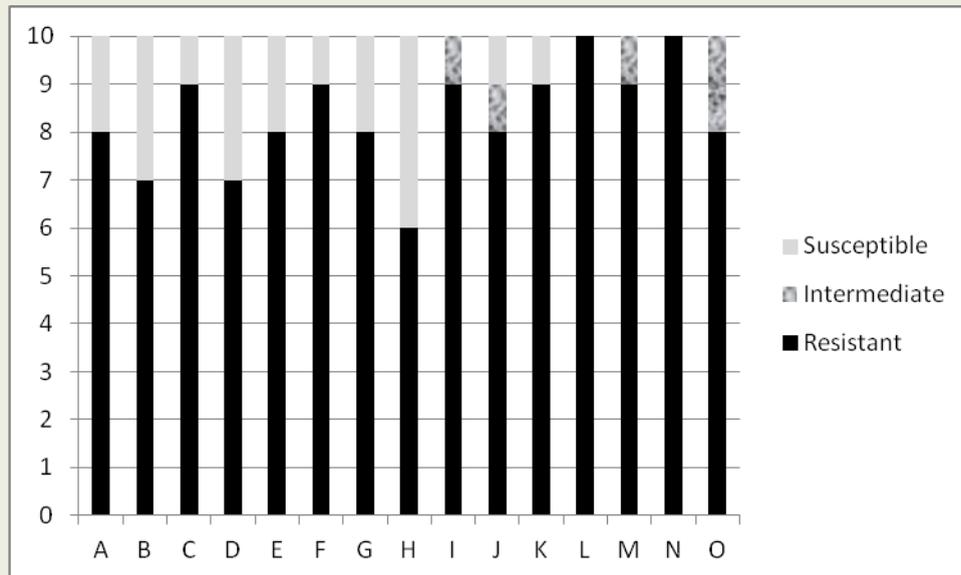


Figure 1 - Phenotypic resistance per sample according to CLSI. In X-axis cheese samples (A-O). In Y-axis the number of antibiotics tested.

An alarming resistance profile to 6 antibiotics - chloramphenicol, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, and the beta-lactams ceftazidime, ampicillin, and ampicillin-sulbactam - was identified. Also, even in the effective antibiotics, samples were resistant in 86.7% to ertapenem (carbapenem), 66.7% to gentamicin, 46.7% to cefepime (4th generation cephalosporin) and 33.3% to ciprofloxacin (fluoroquinolone). Intermediate results or SDD (susceptible dose-dependent), which are therefore dependent on concentration and dose frequency, occurred only in the ciprofloxacin (6.7%) and in cefepime (26.7%).

In total, 130 distinct pools (phenotypically resistant and intermediate) were selected for further PCR investigation.

### 3.3 Comparing breakpoint parameters

Analyses revealed high rates of resistance according to the CLSI breakpoints. Nevertheless, the resistance indexes would reach even higher rates if cutoff points of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)(EUCAST, 2018) were adopted. In this case, the number of susceptible pools would be reduced by half, representing only 10 (7.4%) susceptible pools in the total, the number of intermediate pools would duplicate, and the resistant would reach (83,7%) of the pools, in this case, only three antibiotics would be considered effective.

In order to perform an accurate comparison between CLSI and EUCAST, results of resistance tests to tetracycline were not used, since EUCAST does not recommend its use for Enterobacteriaceae.

Although the two cutoff points are different for all antibiotics tested, resistance results of samples were altered only for 4 antibiotics, less than half (Figure 2). The EUCAST parameter would increase the resistant and intermediate numbers, and decrease the number of susceptible pools to all antibiotics tested. In gentamicin, for example, the 33.3% susceptible samples would turn into zero according to this parameter.

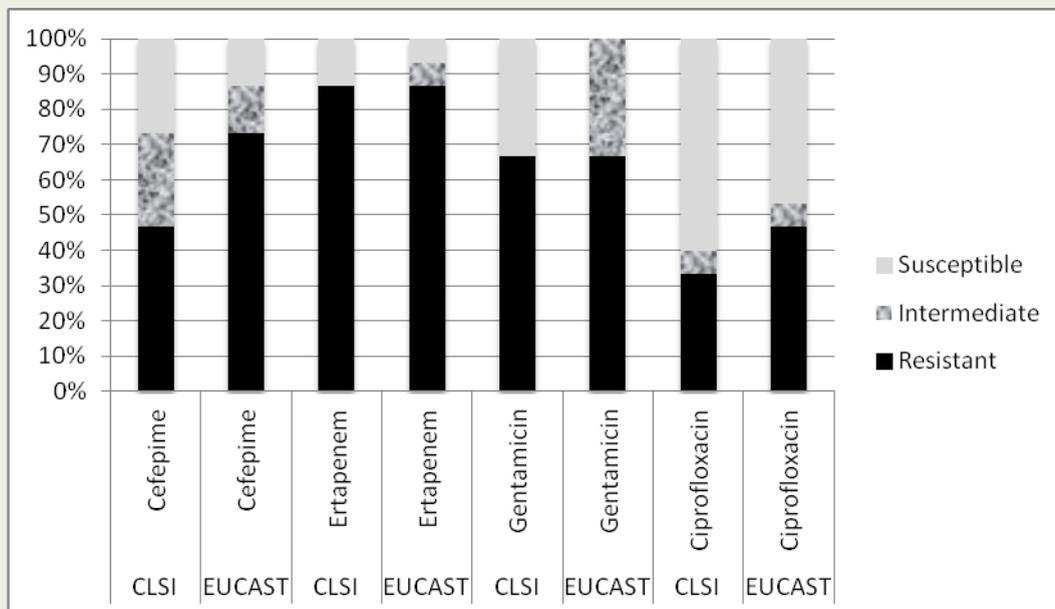


Figure 2 - Variations in susceptibility according to CLSI and EUCAST. In Y-axis the percentage value.

The high prevalence of resistance found in cheese microbiota revealed that there was no measurable inhibition zone formation in 62.2% (84/135) of the pools.

### 3.4 Genotypic Resistance

The PCR assay was performed with multi-species DNA samples. In total, a subset of 130 pools (resistant or intermediate) was tested for the presence of 25 resistance genes. Seven different resistance genes were found in 90 (69.2%) pools totalizing 225 genes (table 2).

Table 2 - Resistance genes quantity in cheese samples and in bacterial pools.

Gene	Cheese samples	Quantity in pools
int 1	93% (14/15)	48.5% (63/130)
tet b	80% (12/15)	80.0% (12/15)
int 2	73% (11/15)	20.0% (26/130)
shv	73% (11/15)	33.1% (43/130)
tet a	73% (11/15)	73.3% (11/15)
ctx – M	67% (10/15)	19.2% (25/130)
tem	67% (10/15)	34.6% (45/130)
ctx- M15	6.7 % (1/15)	12.5 % (3/24)
oxa – 48	6.7% (1/15)	2.4% (1/84)

The genes *ges*, *per*, *veb*, *imp*, *vim*, *kpc*, *ndm*, *oxa*, *oxa-48*, *ctx-M1*, *ctx-M2*, *ctx-M8*, *ctx-M9*, *ctx-M25*, *qacEΔ1*, *mcr-1* and integron class 3 were not found in the samples.

The most frequent identified gene was the genetic element class 1 integron (*int 1*), found in 93.3% (14/15) of cheese samples and 48.5% (63/130) of the pools. It was found in resistant pools to all antibiotics tested, including an isolate considered intermediate to the fourth-generation cephalosporin.

All cheeses samples harbored at least one of the resistance genes searched. Notably, 80% (12/15) of cheese presented at least 4 different resistance genes, reaching 7 genes in 20% (3/15) of cheese samples. Table 3 shows the distribution of the total 225 genes detected in each pool. In only 30.8% (40/130) of the pools, the genes investigated were not found.

#### 3.4.1 Detection of *Enterobacteriaceae* family

The *Enterobacteriaceae* family was identified by PCR in all 130 positive pools tested.

Table 3 - Summary of the genes found in each pool.

Cheese	Cefepime	Ertapenem	Gentamicin	Ampicillin	Ampicillin-Sulbactam	Chloramphenicol	Tetracycline	Ciprofloxacin	Ceftazidime	Sulfamethoxazol Trimethoprim
A			-	shv, int1, ctx	int 1	int 1	ctx	-		int 1
B	-	-	int1	shv, int1	shv, int1	int1		-		int 1
C			shv, tem, int1, int2	shv, ctx, int2	ctx, int2	shv,int2	shv, tem, tet a, tet b, int1, int2	-	int2	int1
D	-		-	shv	shv, tem		shv, tem, tet a, tet b, int2	-	int1	shv, tem, int1, int2
E			-				tet b	-		
F		int1	-	shv, int1,int2	shv,tem, int1	shv, tem	shv, tem, tet a, tet b, int1, int2			ctx, int1
G	-		ctx, int1	ctx	ctx, int1	int1	ctx, tet a, tet b, int2	-		int1
H	-	-	-	ctx, int1,int2	ctx, int1		tet a	-		ctx, int1
I			shv, tem, int1	shv, tem, int1, int2	shv, tem, int1	shv	shv, tem, tet a, tet b, int1, int2			tem, ctx
J			ctx, int1	shv, int1	ctx	shv, int1	shv, tem, tet a, tet b, int1, int2	shv		ctx, int1, int2
K		int1	shv, tem, int1, int2	shv, tem, int1, int2	shv, tem, int1, int2	shv, tem, int1, int2	shv, tem, tet b, int1, int2	-		shv, int1, int2
L		int1	tem	tem, int1	tem, int1	tem, int1	tem, tet a, tet b, int1	tem, int1	tem	tem, int1
M				shv, ctx, int2	shv, tem, ctx, int2	shv, tem	tem, tet a, tet b, int2	tem, int1	tem	shv, tem
N	tem	tem, int1	tem, int2	shv, tem, ctx, int1	shv, tem, ctx, int1	shv, tem, int1	shv, tem, ctx, tet a, tet b			ctx, int1
O	int1	int1	int1	ctx-M15, int1	shv, tem, ctx-M15, int1	shv, tem, int1	shv, tem, tet a, tet b, int1			tem, ctx-M15, shv, int1

Blank frames represent resistant pools, in which the genes tested were not found; (-) represents pools that were not considered phenotypically resistant.

## 4. Discussion

Minas Frescal cheese is a ready-to-eat dairy product, not requiring post-purchase thermal processing which could contribute to a reduction in its microbiota. In Brazil, it is available for the vulnerable population, mostly consumed by the elderly (EFSA, 2017) and also offered to immunosuppressed patients (VICENSKI, PAOLA PASINI ALBERTI, PALOMA AMARAL, 2012).

Evaluation of antibiotic resistant microbiota, although not usually researched in food, can convey more complete data than those obtained with isolation techniques, corroborated by metagenomics research presenting more than 500 genera in a ripened cheese (BRASIL, 1997).

### 4.1 Phenotypic Resistance

So far to our knowledge, this study presents the first phenotypic identification of resistance to ertapenem in Minas Frescal cheese in Brazil. The percentage of 86.7% of resistance found in a ready-to-eat food is a high rate, especially considering that Enterobacteriaceae family resistant to carbapenems are ranked as a priority group to development and research of new antibiotics according to priority pathogens list (PPL). Another group established as critic is the Enterobacteriaceae resistant to the third-generation cephalosporin (WHO, 2017). In this paper, this resistance reached 100% (15/15) of the cheese samples, a high percentage when compared to the 35% found in soft cheese by Omshaba et al., 2018. It is noteworthy that, even in cephalosporin of fourth-generation resistance was observed in 46.7% of cheese samples.

It is alarming that besides the ceftazidime, five different antibiotics, namely, ampicillin, ampicillin-sulbactam, chloramphenicol, tetracycline, and trimethoprim-sulfamethoxazole demonstrated no susceptibility in all different cheese samples from 13 different brands. Values are higher than those found in multidrug-resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from milk tanks (PEXARA et al., 2016).

### 4.2 Comparing parameters

The startling growth (of the majority of the pools) to the limit of detection - 6 mm (the disk diameter), allows only the categorization as resistant, irrespective of the cut off applied emphasizing the high prevalence of resistance found in cheese microbiota.

Among the pools in which the difference between the two parameters could be evaluated, there was a significant reduction in the number of susceptible pools and an increasing in the resistant and intermediate by applying the EUCAST criterion as it has more stringent breakpoints for susceptibility, though less widespread than the CLSI standards. In other studies that difference proved to be less clear, although the EUCAST parameter is slightly more rigid (KASSIM et al., 2016).

### 4.3 Genotypic Resistance

Corroborating the high phenotypic resistance found, 100% of cheese samples harbored at least one gene investigated, reaching up to the co-existence of 7 different genes on the same sample.

#### 4.3.1 Integrons

The integrons are genetic elements that have a key role in the adaptation of bacteria to antibiotic therapy. The cells that contain integrons can select in a pool of genes and fix some genes under intense selective pressure imposed by the use of antibiotics in human medicine, veterinary and agriculture (GILLINGS, 2014).

The most studied and identified integron in foods, as well as in other areas, is the class 1 integron, having their cassettes more fully described in the literature (GILLINGS, 2014). Which may explain, its presence in an SDD pool to a broad spectrum antibiotic, the cefepime (fourth generation cephalosporin).

In samples analyzed, the class 1 integron was the most prevalent. The values found in this article are even higher than those found in a study with metagenomics approach, where 77% of 35 Minas Frescal cheese presented class 1 integron (DE PAULA et al., 2018).

Despite the recognized importance in the clinical area, the class 2 integrons are

still poorly surveyed in the food sector. In our study, it was detected in 73% (11/15) of samples, particularly prevalent in tetracycline-resistant pools, which are commonly associated with int 1 (BELAYNEHE; SHIN; YOO, 2018). An alarming amount of 97% has already been found in a metagenomic study with 35 Minas Frescal cheese samples (DE PAULA et al., 2018).

Research of integron class 3 in food is rare. In our research, none of the cheese samples examined presented class 3 integron likewise in a similar study with cheese (DE PAULA et al., 2018)

Though the integrons research is still scarce in the food sector and focused on a small number of bacterial species or class of integron,(GILLINGS, 2014) our analysis revealed that more than half (56.2%) of the pools possessed one integron system, and even two systems simultaneously in the same pool which reinforces the importance of investigate these genetic systems to understand its function in food safety.

#### 4.3.2 Tetracycline resistant genes

In our study, 100% of the samples were categorized as phenotypically tetracycline resistant. The high phenotypic resistance and co-existence of tet a and tet b in 66,7% (10/15) of samples may be related to the high rates of integrons found (BELAYNEHE; SHIN; YOO, 2018).

Comparable values were found in Minas Frescal cheese varying from 15% to 100% of prevalence of tet genes (DE PAULA et al., 2018). Lower values were found even in raw milk Egyptian cheese in which it was found in 5% of the isolates (HAMMAD; HASSAN; SHIMAMOTO, 2015).

Study on the use of antibiotics in cattle herds in Minas Gerais State, the State where most of the samples of this study came from, identified that tetracycline and aminoglycosides were the most frequent antibiotics used against mastitis (VIEIRA et al., 2016). This is particularly crucial in the case of cheese, a product of animal origin. Evidence shows that interventions that restrict the use of antibiotics in food-producing animals are associated with a reduction in the presence of antibiotic-resistant bacteria in those animals (TANG et al., 2017).

#### 4.3.3.1 Beta-lactamase-producing genes

Most extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) evolved from genetic mutations in beta-lactamases *tem* and *shv* types and are considered an important mechanism that confers resistance to penicillins and cephalosporins, including the third and fourth generation (DALLENNE et al., 2010).

In our analysis, the most frequent ESBL encoding gene was the *shv*, present in 73.3% of samples. The *shv* gene was identified in 6 different antibiotic-resistant pools mainly among the penicillins but either among the non-beta-lactams: tetracycline and chloramphenicol. Multiple drug resistance has been commonly observed in the majority of ESBL-producing, and alarmingly the co-resistance to other antibiotics in common use, such as aminoglycosides, fluoroquinolones, and tetracycline has been frequently reported (XU et al., 2015).

The highest count of *tem* genes was found in tetracycline's pools followed by the penicillins. The *tem* gene rates (67% of the samples) were comparable with a metagenomics study in Minas Frescal cheese, present in 91.4% of the samples but without phenotypic evaluation (DE PAULA et al., 2018).

The ESBLs *ctx* family that acts in cephalosporins has been identified in Brazil predominantly in clinical samples, especially in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016). In our study, the *ctx* gene was found in 63.3% of samples, mainly among the penicillins-beta-lactams.

Important to highlight that in the 72 pools with ESBLs encoding genes found in this research, 32 presented simultaneously at least two of *bla* genes described (*tem*, *shv*, and *ctx*). Although the *bla* genes *tem*, *ctx* and *shv* genes have already been found in *E. coli* isolated from cheese and milk, it was restricted to ampicillin resistant pools and in lower proportions (18.0%, 4.0%, and 1.4% respectively) (OMBARAK et al., 2018). The values found in this paper are superior even compared to the ESBL-encoding genes researched in *E. coli* isolated from mastitic milk (EISENBERGER et al., 2018).

The *bla* genes *ges*, *per*, *veb*, *kpc*, *ndm*, *imp*, *vim*, *oxa* and *oxa-48* were not found in samples analyzed. These genes are not commonly investigated in cheese or even dairy products.

#### 4.3.4 Quaternary ammonium resistance

Quaternary ammonium is a class of cationic surfactants present in disinfectants, biocides, and detergents used intensively in hospitals and industry. The resistance genes *qac* can be carried on class1 integron what increases the co-selection of antibiotic resistance. (ZHANG et al., 2015). Although the high prevalence rates of int 1 in this paper, the *qac*ΔE1 gene was not found.

#### 4.3.5 Polymyxin E resistance

The *mcr-1* gene that evaluates the genotypic resistance to polymyxin E mediated by plasmid was not found.

### 5. Conclusion

So far to our knowledge, this is the first phenotypic identification of a microbiota resistant to ertapenem in Minas Frescal cheese in Brazil.

The amount and diversity of genes found, particularly the integrons, with a methodology that evaluates the microbiota point out the food area as an important sector to be managed to reduce the process of antibiotic resistance.

#### Data availability

The datasets of the microorganisms analyzed during the current study are available in the Coleção de Cultura de Bactérias Resistentes de Origem Alimentar – CCBROA, available in Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira – SiBBR (<https://ipt.sibbr.gov.br/sibbr/resource?r=ccbroya>)

#### Acknowledgments

The authors are grateful to the research funding support from the Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO).

#### Funding

This work was supported by Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO).

### **Transparency declarations**

There is no conflict of interest.

### **References**

- AZIMI, L. et al. Evaluation of Phenotypic Methods for Detection of Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase-Producing K . Pneumoniae in Tehran. v. 2, n. 3, p. 26–31, 2013.
- BARMAN, M. et al. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. **Infection and immunity**, v. 76, n. 3, p. 907–15, mar. 2008.
- BELAYNEHE, K. M.; SHIN, S. W.; YOO, H. S. Interrelationship between tetracycline resistance determinants, phylogenetic group affiliation and carriage of class 1 integrons in commensal Escherichia coli isolates from cattle farms. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 340, nov. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 de setembro de 1997**, 1997.
- CAVACO, L.; MORDHORST, H.; HENDRIKSEN, R. Laboratory protocol: PCR for plasmid-mediated colistin resistance genes, mcr-1 and mcr-2 (multiplex). **DTU food national food institute**, v. 2, n. October 2016, p. 1–15, 2016.
- CDC. Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing , Klebsiella spp . and E . coli from Rectal Swabs. **Centro de Controle e Prevenção de Doenças**, n. 5, p. 1–6, 2008.
- CLSI. M 100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2017.
- DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 1 mar. 2010.
- DE PAULA, A. C. et al. Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrons in White Soft Cheese: Aspects of Clinical Resistome and Potentiality of Horizontal Gene Transfer. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 106, 19 fev. 2018.
- EFSA. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR).

**European Commission**, p. 24, 2017.

EISENBERGER, D. et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Milk Samples of Dairy Cows with Mastitis in Bavaria, Germany. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 4, p. 505–510, 27 maio 2018.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; SANCHEZ-FLORES, A.; QUIRASCO BARUCH, M. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. **Food Microbiology**, v. 57, p. 116–127, 1 ago. 2016.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2018.

GILLINGS, M. R. Integrons: Past, Present, and Future. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 2, p. 257–277, 20 jun. 2014.

GUILLAUME, G. et al. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, n. 1, p. 77–85, 1 abr. 2000.

GUO, L. et al. Antimicrobial and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from giant pandas. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 55–64, jul. 2015.

HAMMAD, A. M.; HASSAN, H. A.; SHIMAMOTO, T. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. **Food Control**, v. 50, p. 815–820, abr. 2015.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 130, 2010.

KARUNIAWATI, A.; SAHARMAN, Y.; LESTARI, D. Detection of Carbapenemase Encoding Genes in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients at Intensive Care Unit Cipto Mangunkusumo Hospital in 2011. **Acta medica Indonesiana**, v. 45, p. 101–106, 2013.

KASSIM, A. et al. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 21, 11 dez. 2016.

LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 73–84, 2 jan. 2003.

LEFLON-GUIBOUT, V. et al. Emergence and Spread of Three Clonally Related Virulent Isolates of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* with Variable Resistance to Aminoglycosides

and Tetracycline in a French Geriatric Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3736–3742, 1 out. 2004.

OMBARAK, R. A. et al. Prevalence and Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Raw Milk and Raw Milk Cheese in Egypt. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 2, p. 226–232, 11 fev. 2018.

OMOSHABA, E. O. et al. Prevalence and antibiotic resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk and soft cheese (wara) sold in Abeokuta, Nigeria. **Sokoto Journal of Veterinary Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1, 9 mar. 2018.

PEXARA, A. et al. Occurrence and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw ovine and caprine milk in Greece. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 3, p. 345–357, 1 mar. 2016.

POIREL, L. et al. Detection of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 934–936, 1 fev. 2011.

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301–311, jun. 2016.

TANG, K. L. et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 1, n. 8, p. e316–e327, nov. 2017.

VICENSKI, PAOLA PASINI ALBERTI, PALOMA AMARAL, D. J. C. DO. Dietary recommendations for immunosuppressed patients of 17 hematopoietic stem cell transplantation centers in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 2, p. 86–93, 2012.

VIEIRA, V. A. et al. Práticas de uso de antimicrobianos em rebanhos bovinos de unidades de agricultura familiar no Norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 8–15, 2016.

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**, 2017.

XU, G. et al. Prevalence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1103, 8 out. 2015.

ZHANG, C. et al. Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. **Science of The Total Environment**, v. 518–519, p. 352–362, 15 9999999999999999jun. 2015. 9