



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DISSERTAÇÃO

EFEITO ANTAGONISTA DE *Lactobacillus* spp. FRENTE A *Salmonella* spp.

PÓS-GRADUANDA: ANA CAROLINA BERGAMO BENTEO

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ANA ANGELITA S. BAPTISTA

Londrina
2025

ANA CAROLINA BERGAMO BENTEO

EFEITO ANTAGONISTA DE *Lactobacillus* spp. FRENTE A *Salmonella* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Angelita S. Baptista.

Londrina
2025

ANA CAROLINA BERGAMO BENTEO

EFEITO ANTAGONISTA DE *Lactobacillus* spp. FRENTE A *Salmonella* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de pós - graduação em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Angelita S. Baptista.
Universidade Estadual de Londrina -
UEL

Prof. Dr Sergio Paulo Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina –
UEL

Prof. Dr Alexandre Oba
Universidade Estadual de Londrina -
UEL

Londrina, 29 de janeiro de 2025.

**A Deus, à Nossa Senhora Aparecida, aos meus pais, à minha
irmã e aos meus sobrinhos: vocês são a minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por sempre cuidar de mim, sempre estar ao meu lado, me dando saúde para completar essa etapa, não me deixando desistir em momento algum, mesmo quando tudo parecia ser impossível. Só Ti sabe o quanto foi difícil continuar mesmo passando por problemas de saúde, dores e internações, mas nunca me abandonou, sempre foi meu alicerce.

Agradeço a Nossa Senhora Aparecida, por interceder junto a Deus pela minha vida, derramando sempre seu manto protetor e me abençoando dia após dia nesta trajetória.

Aos meus pais, José Nivaldo Benteo e Marli Bergamo Benteo, me faltam palavras para expressar minha gratidão por tudo que fazem por mim, por todo amor, carinho, cuidado, atenção e sempre estarem ao meu lado me apoiando, orientando e vibrando cada vitória. Dedico a vocês esse título e todas as conquistas que ainda virão, amo vocês mais que tudo nessa vida.

A minha avó, agradeço a Deus todos os dias pela vida da senhora, mulher guerreira, por sempre torcer por mim, ter um dos melhores abraços do mundo e por ser um exemplo de mulher para nossa família, sem a senhora não seríamos nada.

Gostaria de fazer um agradecimento especial para minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Angelita Sampaio Baptista, por todo suporte, paciência e auxílio durante todo o processo, pelos momentos de conversa, puxões de orelha, conselhos e ensinamentos ao longo desses anos, com certeza me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente, muito obrigada por tudo professora.

Agradeço aos professores Dr^a Lucienne Garcia Pretto-Giordano, Dr. Alexandre Oba, Dr. Sergio Paulo Dejato da Rocha, membros da banca avaliadora, por dedicarem um tempo importante nas correções deste trabalho e por fazerem parte desse momento tão importante em minha trajetória.

Agradeço a professora Dr^a Eloiza Teles Caldart pela disponibilidade e realização das análises estatísticas do presente estudo.

Ao pessoal do Laboratório de Medicina Aviária - LMA, Larissa, João Vitor, Evelin, Maísa, Laércio, e aos estagiários que passaram pelo laboratório durante o período que estive presente, Maria Fernanda Pilli e Murilo, um agradecimento mais que especial a vocês por cada momento vivido juntos, cada experimento, risada, brincadeira, por me ajudarem para que esse trabalho se concretizasse.

Em especial, agradeço a Larissa Justino, doutoranda mais incrível de todas, por sempre estar disposta a me ajudar, me amparar, tirar minhas dúvidas, e sempre falar “vai dar tudo

certo”, sou muito grata pela sua vida.

Quero agradecer também a todos os meus familiares, que sempre estão torcendo por mim, me apoiando e vibrando com minhas conquistas.

As minhas amigas, tanto as de infância como as amizades que fiz durante o processo e que chegaram agora no final da trajetória: Beatriz, Nicolli, Renata, Rafaela, Karina Maia, Ana Claudia Piekarski, Camila Schubert, obrigada por me apoiarem, torcerem e estarem sempre comigo.

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos representa uma ameaça à saúde e segurança alimentar, diante disso, uma das alternativas estudadas são os probióticos, microrganismos que podem apresentar efeitos antagonistas frente a patógenos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antagonista de um *pool* de *Lactobacillus* spp. (PL) comercial contendo 11 cepas, frente a diferentes sorovares de *Salmonella* de origem avícola. Para tanto, isolados de *Salmonella* spp. oriundos de monitoramento de campo e mantidos na bacterioteca do Laboratório de Medicina Aviária - LMA/UEL, foram submetidos ao ensaio de antagonismo em ágar, os isolados de *Salmonella* spp. (n = 80) foram testados pela técnica de *Spot on the Lawn* frente ao PL. Os halos foram mensurados e classificados com presença de inibição com halos > 1mm. Para avaliar a influência de PL sobre as culturas de *Salmonella* spp. foram selecionados 25 isolados de acordo com a prevalência e importância na avicultura, pertencentes a quatro sorovares (*S. Minnesota* (SM), *S. Heidelberg* (SH), *S. Typhimurium* (ST) e *S. Infantis* (SI)) e submetidas a teste de co-cultura, sendo que as culturas foram incubadas em caldo MRS-MH nos tempos 0, 6, 10 e 24 h, na sequência plaqueadas em ágar MacConkey e ágar Rogosa para a quantificação bacteriana. Foi observado que todos os isolados de *Salmonella* spp. apresentaram inibição pelo PL sendo que 75% (60/80) apresentaram halos de inibição até 5,9 mm e 25% (20/80) de 6 a 12mm. No ensaio de co-cultura foi possível observar que PL inibiu significativamente o crescimento dos diferentes sorovares de *Salmonella* spp., apresentando níveis indetectáveis com 10 horas de incubação para SI, SH, SM e ST respectivamente. Conclui-se que o *Pool* de *Lactobacillus* comercial apresentou perfil antagonista, com potencial inibição do crescimento de diferentes sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola.

Palavras-chave: Enterobacterias; avicultura; probióticos, patógenos.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance represents a threat to health and food safety. Considering this, one of the studied alternatives is probiotics, microorganisms that may exhibit antagonistic effects against pathogens. This study aimed to evaluate the antagonistic effect of a commercial *Lactobacillus* spp. (PL) pool containing 11 strains against different serovars of poultry-derived *Salmonella*. For this purpose, *Salmonella* spp. isolates obtained from field monitoring and preserved in the bacteriotheca of the Laboratory of Avian Medicine - LMA/Uel were subjected to an agar antagonism assay. The *Salmonella* spp. isolates (n = 80) were tested using the *Spot on the Lawn* technique against PL. The inhibition halos were measured and classified as present when they exceeded 1 mm in diameter. To assess the influence of PL on *Salmonella* spp. cultures, 25 isolates were selected based on their prevalence and importance in poultry farming. These belonged to four serovars: *S. Minnesota* (SM), *S. Heidelberg* (SH), *S. Typhimurium* (ST), and *S. Infantis* (SI). They were subjected to a co-culture test, in which cultures were incubated in MRS-MH broth at 0, 6, 10, and 24 hours, followed by plating on MacConkey agar and Rogosa agar for bacterial quantification. It was observed that all *Salmonella* spp. isolates were inhibited by PL, with 75% (60/80) presenting inhibition halos up to 5.9 mm and 25% (20/80) showing halos ranging from 6 to 12 mm. In the co-culture assay, PL significantly inhibited the growth of different *Salmonella* spp. serovars, reaching undetectable levels after 10 hours of incubation for SI, SH, SM, and ST, respectively. It is concluded that the commercial *Lactobacillus* pool exhibited an antagonistic profile, demonstrating potential inhibition of the growth of different poultry-derived *Salmonella* spp. serovars.

Keywords: Enterobacteria; poultry farming; probiotics; pathogens.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Halo de inibição (mm) dos 80 sorovares de <i>Salmonella</i> spp mantidos na bacterioteca do LMA frente ao pool de <i>Lactobacillus</i> spp. avaliados pela técnica de <i>Spot on the Lawn</i> . ..17	
Tabela 2. Média de Log UFC/mL de co-cultura do <i>Pool</i> de <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Salmonella</i> Infantis (SI) avaliados pela técnica de co-cultura nos tempos 0, 6, 10 e 24 horas após incubação a 37°C em aerobiose.20	
Tabela 3. Média de Log UFC/mL de co-cultura do <i>Pool</i> de <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH) avaliados pela técnica de co-cultura nos tempos 0, 6, 10 e 24 horas após incubação a 37°C em aerobiose.22	
Tabela 4. Média de Log UFC/mL de co-cultura do <i>Pool</i> de <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Salmonella</i> Minnesota (SM) avaliados pela técnica de co-cultura nos tempos 0, 6, 10 e 24 horas após incubação a 37°C em aerobiose.23	
Tabela 5. Média de Log UFC/mL de co-cultura do <i>Pool</i> de <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST) avaliados pela técnica de co-cultura nos tempos 0, 6, 10 e 24 horas após incubação a 37°C em aerobiose.23	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
APC	Antimicrobianos Promotores de Crescimento
BHI	Caldo Cérebro Coração
DO	Densidade Óptica
LAB	Bactérias Ácido-Láticas
MH	<i>Mueller-Hinton</i>
MRS	<i>Man, Rogosa e Sharpe</i>
PL	<i>Pool de Lactobacillus spp.</i>
SH	<i>Salmonella</i> Heidelberg
SI	<i>Salmonella</i> Infantis
SM	<i>Salmonella</i> Minnesota
SOTL	<i>Spot on the Lawn</i>
ST	<i>Salmonella</i> Typhimurium
UFC	Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1	Amostras bacterianas	14
3.2	<i>Spot on the Lawn</i>	14
3.3	Ensaio de Co-cultura de <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Salmonella</i> spp.....	15
3.4	Análise estatística	16
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1	<i>Spot on the Lawn</i>	17
4.2	Ensaio de Co-cultura de <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Salmonella</i> spp.....	20
4.	CONCLUSÃO.....	26
5.	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

O crescimento do setor avícola no Brasil está relacionado diretamente com a interação genética, nutrição, ambiência, e sanidade das aves, posicionando o país entre os maiores produtores de carne de frango do mundo (ABPA, 2024). No que se refere a exportação de carne de frango, o Brasil ocupa a primeira posição entre os países exportadores, sendo 34,65% da produção brasileira destinada ao mercado externo, gerando uma receita anual de US\$9,7 bilhões (ABPA, 2024).

O setor avícola brasileiro contribui com 1,5% do PIB nacional, gerando aproximadamente 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, sendo a principal atividade econômica em muitos municípios do interior do país, especialmente nas regiões sul e sudeste (ABPA, 2024).

O sistema de produção intensivo adotado pela indústria avícola colabora com a otimização da produção e consequentemente com a competitividade do setor, todavia, o confinamento favorece a disseminação e transmissão de patógenos entre os animais, quando existem desafios sanitários. Neste contexto, o uso de antimicrobianos, seja com perspectiva terapêutica ou como promotor de crescimento, combinado a medidas de biossegurança e programas de vacinação ajudou a indústria avícola a crescer, ao impedir os impactos negativos de muitas doenças (Mehdi *et al.*, 2018). Todavia a ampla utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento (APC) favoreceu o fenômeno de resistência e ampliou o risco de resíduos de antibióticos na carcaça dos animais (Salim *et al.*, 2018).

A resistência antimicrobiana representa uma ameaça ao controle de doenças em todo o mundo, e é uma preocupação tanto para a saúde humana quanto animal, já que o emprego de antimicrobianos é essencial para o tratamento de infecções bacterianas e manutenção da saúde (OIE, 2020). Com o passar dos anos, a resistência antimicrobiana tornou-se uma grande ameaça à saúde pública no mundo, por reduzir a eficácia de tratamentos, aumentar a gravidade e os custos das infecções. A ampla utilização de antimicrobianos ocorre tanto na medicina humana, quanto veterinária, de forma que os microrganismos expostos a pressão de seleção por antibióticos aprimoram sua aptidão adquirindo e expressando genes de resistência e posteriormente compartilhando com outras bactérias (Collignon e McEwen, 2019).

A utilização de antimicrobianos como APC foi banida pela União Europeia desde 2006 e evidências crescentes levaram a Organização Mundial de Saúde a sugerir a eliminação progressiva ou mesmo a proibição completa destes aditivos (Sabo *et al.*, 2020), já que a ampla utilização de antimicrobianos na produção animal é apontada como uma das principais

responsáveis pela seleção de microrganismos resistentes (Hoelzer *et al.*, 2017; Collignon e McEwen, 2019).

A indústria avícola tem se movimentado para sistemas de produção livres de antimicrobianos e com isso o uso profilático de antibióticos torna-se mais restritivo e surgem novos nichos ecológicos nos lotes de aves que os patógenos podem ocupar (Casewell *et al.*, 2003). Portanto, observa-se um crescente interesse na busca e utilização alternativas antibióticas em toda a indústria avícola comercial, dentre os quais pode-se citar os ácidos orgânicos e inorgânicos, óleos essenciais, prebióticos, simbiótico e probióticos, visando a manutenção da qualidade sanitária, segurança alimentar e melhores índices zootécnicos (Jeni *et al.*, 2021).

Os probióticos por definição são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidade adequada (FAO/WHO, 2002), estes produtos estão sendo estudados, vistos e empregados como forma de controle de patógenos.

Os microrganismos do gênero *Lactobacillus* spp. desempenham diferentes mecanismos de ação contra patógenos, incluindo exclusão competitiva, produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas, como bacteriocinas, competição por oxigênio e nutrientes, acidificação do pH intestinal, e estímulo às funções digestivas, por meio do aumento da secreção de enzimas como proteases e amilases. Além disso, *Lactobacillus* spp. atuam como imunomoduladores, estimulando o sistema imunológico do hospedeiro (Chugh e Kamal-Eldin, 2020; Hai e Huang, 2021).

Dentro da classe dos probióticos, *Lactobacillus* spp. compreendem um dos principais microrganismos empregados (Teame *et al.*, 2020). *Lactobacillus* spp. são bactérias Gram-positivas, não formadora de esporos, podendo variar de bacilo longo e fino a cocobacilos curtos (Okamoto *et al.*, 2018).

Lactobacillus spp. são bactérias ácido lácticas, também conhecidas como LAB, que apresentam ação probiótica e são reconhecidos como GRAS - “Generally Recognized As Safe” (Zawistowska-Rojek e Tyski, 2018). Esses microrganismos e seus metabólitos representam alternativas promissoras para a redução do uso de antimicrobianos na produção animal, contribuindo para a diminuição da incidência de bactérias resistentes a antibióticos (Chin *et al.*, 2024).

Além do mais, estudos indicam que a utilização de *Lactobacillus* spp. em dietas de frango de corte apresenta benefícios na absorção de nutrientes, modulação do sistema imune e melhora da saúde intestinal (Wang *et al.*, 2021, Gao *et al.*, 2022). Com isso, a utilização de probióticos tem sido avaliada frente a desafios por diversas bactérias como *Clostridium* spp.,

1 *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. (Divyashree *et al.*, 2021).

2 *Salmonella* é uma bactéria Gram-negativa pertencente à Família Enterobacteriaceae,
3 bacilos não produtores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos (Afshari *et al.*, 2018,
4 Elshebrawy *et al.*, 2022). Existem mais de 2.600 sorovares de *Salmonella* catalogados, de
5 acordo com o Esquema White-Kauffmann-Le Minor (Shaji *et al.*, 2023). *Salmonella* é agrupada
6 em diferentes sorovares de acordo com os antígenos de superfície: antígeno O (somático) e
7 antígeno H (flagelar) (Shaji *et al.*, 2023).

8 *Salmonella* spp. apresenta alta relevância na saúde pública, sendo uma zoonose e
9 responsável por 1,35 milhões de casos de infecções em humanos, anualmente, nos Estados
10 Unidos e 90.000 casos na União Europeia, ocasionando mortalidade de aproximadamente
11 155.000 pessoas por ano (Dewi *et al.*, 2022, Rasamsetti *et al.*, 2022, Shaji *et al.*, 2023),
12 ocupando a colocação do segundo maior causador de doença associadas a alimentos do mundo
13 (Cortés *et al.*, 2022).

14 A zoonose em questão possui grande relevância na cadeia avícola, impactando
15 significativamente a ocorrência de positividade em carcaças de aves nos matadouros brasileiros
16 e em produtos cárneos (Brasão *et al.*, 2021). *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium
17 estão diretamente associadas a surtos alimentares envolvendo produtos de origem animal,
18 enquanto *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Minnesota são frequentemente isoladas de aves,
19 ambientes de frigoríficos e produtos de origem animal (Saidenberg *et al.*, 2023). Embora essas
20 últimas também sejam identificadas como agentes causadores de surtos em humanos, sua
21 ocorrência é predominantemente associada ao ambiente avícola (Saidenberg *et al.*, 2023).

22 De acordo com o Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal
23 do DIPOA (2024), 65,76% das 441 amostras coletadas em frigoríficos brasileiros apresentaram
24 sorotipificação para *Salmonella* Minnesota e 16,10% para *Salmonella* Heidelberg, destacando
25 a importância desses sorovares na cadeia produtiva de aves no Brasil (MAPA, 2024).

26 Além disso, o sorovar *Salmonella* Infantis tem demonstrado crescente predominância
27 em países como Estados Unidos, Japão e Equador. Segundo Mattock *et al.* (2024), essa cepa é
28 responsável por índices de positividade superiores a 50% em granjas avícolas. O surgimento e
29 disseminação de diferentes sorovares de *Salmonella* spp. estão relacionados a fatores como a
30 ausência de sinais clínicos em aves infectadas e a capacidade de formação de biofilmes,
31 permitindo a perpetuação e disseminação do patógeno no ambiente (Brasão *et al.*, 2021).

32 Estudos têm mostrado a ocorrência de *Salmonella* spp. resistentes a antimicrobianos em
33 produtos de origem animal e, conseqüentemente, o potencial para transmissão do agente ao
34 longo da cadeia alimentar (Ziech *et al.*, 2016). Amostras de *Salmonella* spp. multirresistente

são consideradas um problema de saúde pública, pois limitam as opções terapêuticas para salmonelose em humanos (Zishiri *et al.*, 2016). Souza *et al.* (2019) encontraram 72,7% (8/11) amostras de *Salmonella* spp. provenientes de produtos de origem avícola que foram produtoras de *B-lactamase* de espectro estendido (ESBL) e 100% (11/11) de resistência múltipla a drogas.

Para escolha de cepas com potencial probiótico, a capacidade de adesão é o fator primordial, além de segurança em sua utilização (Hage *et al.*, 2022). A capacidade antagônica das cepas LAB é outro fator importante para a avaliação de probióticos. Análises para avaliar a capacidade antagônica inclui adesão ao intestino, ensaio indireto *Spot on the Lawn* (SOTL), ensaio de co-cultura, ensaio de agregação e co-agregação, bem como produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas, como bacteriocinas (Choi *et al.*, 2018).

O ensaio *Spot on the Lawn* (SOTL) foi descrito inicialmente por GRATIA (1946) como um método para avaliar a atividade antagonista entre bactérias, utilizando halos de inibição como indicador de eficácia. Desde então, tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada para a identificação e classificação de cepas probióticas (Ribeiro *et al.*, 2024). Barros *et al.* (2009) empregaram o método SOTL para avaliar a capacidade antagônica de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius* isolados do ingluvío e do ceco de galinhas, com o objetivo de mensurar a atividade inibitória *in vitro* frente a sorovares de *Salmonella* spp.

Os resultados relacionados aos halos de inibição podem apresentar variações significativas em função da concentração bacteriana utilizada no ensaio. Para assegurar maior confiabilidade e reprodutibilidade dos dados, recomenda-se o uso de amostras com concentração padrão de 10^8 UFC/mL, conforme recomendado por Ribeiro *et al.* (2024). Além disso, a realização do ensaio SOTL exige atenção às variações comportamentais entre diferentes sorovares de *Salmonella* spp., como, por exemplo, as diferenças observadas entre as paratíficas e as tíficas. Embora pertencentes ao mesmo gênero, esses sorovares podem apresentar respostas distintas, mesmo quando submetidos às mesmas condições experimentais (Ribeiro *et al.*, 2024).

O ensaio de co-cultura é uma técnica amplamente utilizada em microbiologia para investigar a interação simultânea de dois ou mais microrganismos em um ambiente controlado (Mariam *et al.*, 2017). Essa abordagem permite avaliar diferentes tipos de interações, como relações antagônicas, sinérgicas ou comensais, dependendo do objetivo experimental. No contexto da atividade antagônica, o foco principal é a capacidade de determinados microrganismos, especialmente bactérias ácido-láticas, de inibir o crescimento de cepas patogênicas. Essa inibição ocorre por meio da produção de substâncias antimicrobianas, como ácidos orgânicos (ácido lático e acético), bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e outros metabólitos secundários. (Mariam *et al.*, 2017).

Dados a importância e ampla utilização de probióticos na produção avícola, as avaliações *in vitro* e *in vivo* permitem compreender os mecanismos de ação e ajudam no direcionamento e aplicação desta ferramenta para controle de patógenos.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antagonista de cepas de *Lactobacillus* spp., proveniente de um produto comercial, frente a diferentes isolados de *Salmonella* spp. de origem avícola.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antagonista de cepas de *Lactobacillus* spp., proveniente de produto comercial, frente a diferentes sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a ação de *Lactobacillus* spp. frente aos isolados de *Salmonella* spp. pela técnica de *Spot on Lawn*.

Avaliar a ação de *Lactobacillus* spp. frente aos isolados de *Salmonella* spp. pela técnica de co-cultura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas neste estudo isolados de *Salmonella* spp. (n = 80), oriundos de monitoramento avícola, realizado a sorotipificação e mantidos na bacterioteca do Laboratório de Medicina Aviária/UEL, registrados no Sisgen sob o nº A3ED0DF.

Foram utilizadas *pool* de cepas probióticas pertencentes a um produto comercial utilizado na avicultura, contendo 11 cepas (três cepas – *Lactobacillus bugarius*; duas cepas – *Lactobacillus casei*; duas cepas – *Lactobacillus cellobiosus*; três cepas – *Lactobacillus fermentum*; uma cepa – *Lactobacillus helveticus*) na concentração de 10⁶ UFC/mL.

3.2 Spot on the Lawn

Para o ensaio de antagonismo foi avaliado a ação de um produto comercial contendo 11

1 cepas de *Lactobacillus* spp. pela técnica de *Spot on the Lawn* (JOTHI e SHANKAR, 2012).
 2 Primeiramente, foi realizada a incubação de 0,06g de *Lactobacillus* spp. (produto comercial)
 3 com concentração de 10^6 em 10 mL caldo *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS) com incubação a 37°C
 4 por 24 horas em condições de microaerofilia. Após 24 horas de incubação, alíquotas de 20µL
 5 do inóculo da cepa probiótica foi semeado em placa de ágar MRS e incubado a 37°C, durante
 6 24 horas.

7 Os isolados de *Salmonella* spp. (n = 80) foram incubados em caldo *Brain Heart Infusion*
 8 (BHI) a 37°C por 24 horas, em aerobiose. Após as 24 horas de incubação, 100µL do incubado
 9 de *Salmonella* spp. em caldo BHI (10^7 UFC/mL) foram transferidos para 10 mL de BHI
 10 semissólido e posteriormente depositado sobre o ágar MRS contendo o inóculo de
 11 *Lactobacillus* spp. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Após o período de 24
 12 horas, foi possível observar a formação dos halos de inibição, os quais foram mensurados e
 13 considerado como atividade inibitória positiva diâmetro >1mm (Costa *et al.*, 2018).

14 3.3 Ensaio de Co-cultura de *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* spp.

15 Para o ensaio de co-cultura, quatro sorovares de *Salmonella* spp. foram selecionadas 25
 16 isolados entre as 80 utilizadas no teste de *Spot on the Lawn*, para isso adotou-se como critério
 17 de seleção a maior prevalência e importância dentro da avicultura, sendo *Salmonella* Infantis
 18 (n = 7), *Salmonella* Heidelberg (n = 7), *Salmonella* Minnesota (n = 7) e *Salmonella*
 19 Typhimurium (n = 4).

20 O ensaio foi realizado para avaliar a influência de isolados de cepas de *Lactobacillus*
 21 spp. sobre o crescimento de diferentes sorovares de *Salmonella* spp. e foi conduzido seguindo
 22 protocolo proposto por Divyashree *et al.* (2021).

23 Inicialmente *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* spp. foram cultivados, a partir de culturas
 24 frescas. Para tanto, 0,06g de *Lactobacillus* spp. (produto comercial) foi inoculado em 10 mL
 25 caldo MRS e incubado a 37°C por 18-24h em microaerofilia. Já a cultura de *Salmonella* spp.
 26 foi preparada na proporção (1:10) em caldo BHI e incubado a 37°C por 18-24h em aerobiose.

27 Após 24 horas de incubação, 1 mL da cultura de *Lactobacillus* spp. cultivada foi
 28 transferida para 9 mL caldo MRS com concentração dupla e 1 mL do inóculo de *Salmonella*
 29 spp. cultivada foi transferido para 9 mL caldo *Mueller-Hinton* (MH) com concentração dupla,
 30 com intuito de manter a concentração de 10^8 UFC/mL. Para a co-cultura, quantidades iguais (5
 31 mL) de cada cultura foram misturadas e incubado a 37°C e nos tempos 0, 6, 10 e 24 h. Em cada
 32 um dos tempos avaliados, uma alíquota (100µL) das culturas foi retirada para diluição seriada
 33 seguida de plaqueamento por *spread plate* semeado em Ágar MacConkey e Ágar Rogosa para

a quantificação de *Salmonella* spp. e *Lactobacillus* spp. respectivamente. *Salmonella* spp. e *Lactobacillus* spp. foram cultivados de forma independente e considerados como controle, respeitando o período de incubação de cada meio utilizado, sendo 37°C durante 24 horas para Ágar MacConkey e 37°C durante 48 horas para Ágar Rogosa, todos em aerobiose.

Para a leitura do crescimento bacteriano nas placas, cada sorovar utilizado no teste foram organizados em grupo, sendo o G1 – controle *Salmonella* spp; G2 – controle *Lactobacillus* spp; G3 – Co-cultura avaliando a recuperação da *Salmonella* spp; G4 – Co-cultura avaliando a recuperação de *Lactobacillus* spp.

3.4 Análise estatística

Os dados foram armazenados no programa Excel, a análise descritiva foi realizada por meio do programa EpiInfo versão 7.2.5.0 (Dean *et al.*, 2011). O teste de normalidade Shapiro-Wilk, Análise de Variância e verificação de pressupostos, Kruskal-Wallis e Testes Post-Hoc de Tukey e Dunn foram realizados no Ambiente R versão 4.3.1 (R Core Team, 2023). Para o teste de Friedman empregou-se o programa JAMOV (JAMOV, 2022).

Com o objetivo de verificar a existência de diferença estatisticamente significativa dos valores de Log UFC/mL entre os diferentes grupos realizou-se análise de variância (ANOVA), para dados com distribuição normal, ou teste de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos independentes, ambos seguidos o nível de significância empregado foi de 5%, de testes post-hoc, Tukey e Dunn, respectivamente.

O teste de Friedman, não-paramétrico para medidas repetidas, foi utilizado para comparar os valores de Log UFC/mL dos diferentes tempos de incubação e, quando $p < 0,05$, o teste post-hoc de Dunn foi aplicado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Spot on the Lawn*

Foi observado que *pool* de *Lactobacillus* spp. foi capaz de inibir todos os isolados de *Salmonella* spp. avaliados (Tabela 1), sendo que 75% (60/80) apresentaram até 5,99mm e 25% (20/80) apresentaram >6mm de média de halo de inibição.

Os isolados *S. Abony* (ID – 1596), *S. Braenderup* (ID – 1783), *S. Bredney* (ID – 1180), *S. Cenatum* (ID – 682) e *S. Cerro* (ID – 1444) apresentaram halos de inibição de 3,5, 2,5, 4,5, 2,75 e 3mm, respectivamente. Dos 14 isolados de *Salmonella* Heidelberg, 85,72% (12/14) apresentou halo entre 0 - 5mm e 14,28% (2/14) apresentou halo entre 6 - 12mm. Sendo o maior halo com 7mm (ID – 832) e o menor com 2,75mm (ID – 678), tendo uma média de 4,25mm.

Para os isolados de *S. Infantis* (n = 9) foi observado que 88,88% (8/9) apresentaram halo entre 0 – 5,99mm e 11,12% (1/9) apresentaram halo entre 6 – 12mm, sendo o maior com 6,25mm (ID – 1763) e o menor com 1,5mm (ID – 668) tendo uma média total de 4,30mm. Dos 35 isolados de *Salmonella* Minnesota, 68,57% (24/35) apresentou halo entre 0 – 5,99mm e 31,43% (11/34) apresentou halo entre 6 – 12mm. Sendo o maior halo (ID – 1412) com 11,75mm e os menores (ID: 1392, 2710, 2730, 2781 e 2806) com 2mm, tendo uma média total de 4,19mm (Tabela 1).

Tabela 1. Halo de inibição (mm) dos 80 sorovares de *Salmonella* spp mantidos na bacterioteca do LMA/UEL frente ao *pool* de *Lactobacillus* spp. avaliados pela técnica de *Spot on the Lawn*.

Sorovares	ID Amostra	Diâmetro de Inibição (mm)
<i>S. Abony</i>	1596	3,5
<i>S. Braenderup</i>	1783	2,5
<i>S. Bredney</i>	1180	4,5
<i>S. Cenatum</i>	682	2,75
<i>S. Cerro</i>	1444	3,0
<i>S. Heidelberg</i>	676	5,75
<i>S. Heidelberg</i>	2768	5,0
<i>S. Heidelberg</i>	1788	3,0
<i>S. Heidelberg</i>	677	4,0
<i>S. Heidelberg</i>	678	2,75
<i>S. Heidelberg</i>	1184	3,5
<i>S. Heidelberg</i>	1242	3,0
<i>S. Heidelberg</i>	1790	3,25
<i>S. Heidelberg</i>	1306	5,0
<i>S. Heidelberg</i>	832	7,0
<i>S. Heidelberg</i>	1172	4,75
<i>S. Heidelberg</i>	1183	6,25
<i>S. Heidelberg</i>	1182	3,25
<i>S. Heidelberg</i>	1644	3,0
<i>S. Infantis</i>	2784	4,75
<i>S. Infantis</i>	2800	5,75
<i>S. Infantis</i>	668	1,5
<i>S. Infantis</i>	669	5,0
<i>S. Infantis</i>	670	3,0

Continuação Tabela 1:

Sorovares	ID Amostra	Diâmetro de Inibição (mm)
S. Infantis	671	4,25
S. Infantis	1763	6,25
S. Infantis	1686	2,75
S. Infantis	1445	5,5
S. Mbandaka	665	6,25
S. Mbandaka	662	8,75
S. Minnesota	2854	4,5
S. Minnesota	2855	6,0
S. Minnesota	1392	2,0
S. Minnesota	1394	3,5
S. Minnesota	1543	4,0
S. Minnesota	2667	2,5
S. Minnesota	2672	3,0
S. Minnesota	2697	3,0
S. Minnesota	2701	2,75
S. Minnesota	2710	2,0
S. Minnesota	2730	2,0
S. Minnesota	1607	5,0
S. Minnesota	2750	3,75
S. Minnesota	2751	3,5
S. Minnesota	2781	2,0
S. Minnesota	2806	2,0
S. Minnesota	1915	8,0
S. Minnesota	1623	3,0
S. Minnesota	1485	6,0
S. Minnesota	1487	6,25
S. Minnesota	1502	4,5
S. Minnesota	1614	6,0
S. Minnesota	1618	4,0
S. Minnesota	1415	4,25
S. Minnesota	1413	9,5
S. Minnesota	1412	11,75
S. Minnesota	1304	7,25
S. Minnesota	1137	10,25
S. Minnesota	1423	4,75
S. Minnesota	1398	4,75
S. Minnesota	1496	4,5
S. Minnesota	1710	5,0
S. Minnesota	1723	6,0
S. Minnesota	1722	2,75
S. Minnesota	1594	6,25
S. Muechen	1383	3,25
S. Newport	1698	2,0
S. Saintpul	1693	4,75
S. Saintpul	1772	4,75
S. Schwarzengrand	621	3,75
S. Schwarzengrand	654	5,5
S. Senftenberg	2712	5,0
S. Typhimurium	651	4,75
S. Typhimurium	630	10,0
S. Typhimurium	641	3,5
S. Typhimurium	642	10,0
S. Typhimurium	687	8,0
S. Typhimurium	672	4,25
S. Typhimurium	686	9,0
S. Typhimurium	691	4,5

Observou-se que 50% dos isolados de *Salmonella* Typhimurium (4/8) apresentaram halos de inibição variando de 6 a 12mm, com um valor mínimo de 3,5mm e máximo de 10mm, resultando em uma média de 6,75mm. Em contrapartida, todos os isolados de *Salmonella* Mbandaka (100%, 2/2) apresentaram halos entre 6 e 12mm, com média de 7,5mm (Tabela 1).

Os 80 isolados utilizados em nosso estudo apresentaram um halo médio de 4,79mm de inibição. Observou-se uma significativa variabilidade nos halos de inibição, com valores variando de 1,5 mm, no menor caso, a 11,75 mm, no maior. Essa variabilidade entre as cepas foi analisada e padronizada por Ribeiro *et al.* (2024), que discutiram a diversidade comportamental de diferentes cepas de *Salmonella* spp. embora pertençam ao mesmo gênero, é plausível que apresentem respostas distintas, mesmo quando expostas às mesmas condições experimentais.

Okamoto *et al.* (2018), utilizando a técnica de antagonismo *Spot on the Lawn* (SOTL), demonstraram o potencial inibitório de 17 isolados de *Lactobacillus* spp. contra *Salmonella* Heidelberg, com média de 4,0mm, evidenciando a produção de metabólitos antimicrobianos como bacteriocinas e ácido láctico por cepas probióticas. No presente estudo, foi observado que 75% dos isolados de *Salmonella* avaliados inibiram até 5,99mm. Além disso, 25% das amostras apresentaram halos de inibição superiores a 6mm, indicando que maiores halos de inibição correspondem a uma eficácia superior do *pool* de *Lactobacillus* spp. na inibição do crescimento bacteriano, conforme descrito por Costa *et al.* (2018).

Jimenez-Trigos *et al.* (2022) avaliaram a atividade antagonista através de ensaio de meio sólido, SOTL, 36 isolados de *Lactobacillus* spp. de forma independente, provenientes de cães, apresentaram a capacidade inibitória contra *Salmonella* Typhimurium, tendo uma média superior a 1,5mm de halos de inibição, considerando assim uma atividade inibitória positiva. Similar ao presente estudo, encontramos média de inibição para o sorovar *Salmonella* Typhimurium de 6,75mm, consideravelmente superior, atribuindo ao fato de avaliarmos um *pool* de *Lactobacillus* spp. tendo a combinação de 11 cepas.

Diversos compostos são produzidos a partir do metabolismo de bactérias ácido-lácticas, incluindo ácidos orgânicos, peptídeos (bacteriocinas), aminoácidos livres e vitaminas (Khubber *et al.*, 2022). Esses compostos podem formar canais e poros na membrana plasmática dos microrganismos-alvo, inibindo funções celulares vitais (Shentu *et al.*, 2023).

A atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. foi confirmada por Prabhurajeshwar e Chandrakanth (2017), que avaliaram 16 cepas de *Lactobacillus* spp. de amostra de coalhadas frente a diversos patógenos, incluindo *Salmonella typhi* MTCC734, onde obtiveram média de 18,81mm, sendo que três cepas diferentes de *Lactobacillus* spp. exibiram halos de inibição

superiores a 21mm contra *S. typhii*, visto que essa atividade notável de inibição foi atribuída a bacteriocina e o ácidos orgânicos. Acreditamos que a diferença de resultado pode estar associada tanto ao perfil das cepas presentes no *pool* de *Lactobacillus* spp., quanto a variabilidade no perfil da sorovar de *Salmonella* spp. utilizada em ambos os estudos.

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos de forma ribossômica por bactérias, apresentando um espectro de ação específico contra patógenos-alvo. Devido a essa característica, seu uso é de grande relevância na indústria de alimentos, especialmente como agentes naturais de bioconservação (Pena *et al.*, 2024).

Além da produção de bacteriocinas, as bactérias ácido-láticas (LAB) também atuam na inibição de patógenos por meio da acidificação do meio, reduzindo o pH intracitoplasmático dessas bactérias por meio da liberação de ácidos orgânicos. Esse mecanismo compromete funções metabólicas essenciais, resultando na inibição do crescimento e da atividade bacteriana. (Wishna-Kadawarage, Hickey e Siwek, 2024).

Em nosso estudo, não realizamos a caracterização do metabólito responsável pela inibição de *Salmonella* spp. sendo necessárias pesquisas futuras para a identificação dos compostos envolvidos nesse efeito.

4.2 Ensaio de Co-cultura de *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* spp.

Os resultados do teste de co-cultura estão apresentados nas Tabelas 2, 3, 4 e 5. Observou-se que o *pool* comercial de *Lactobacillus* spp. inibiu ($p < 0,05$) o crescimento dos diferentes sorovares de *Salmonella* ao longo de 24 horas. As médias de contagem (Log UFC/mL) foram de 3,94 para SI (Tabela 2), 3,98 para SH (Tabela 3), 3,82 para SM (Tabela 4) e 3,95 para ST (Tabela 5).

Em contrapartida, durante as 24 horas de incubação dos sorovares de *Salmonella* spp. em co-cultura, quando observada a recuperação do *pool* de *Lactobacillus* spp. nessas amostras, verificaram-se médias elevadas de Log UFC/mL, sendo 8,77 para SI (Tabela 2), 8,67 para SH (Tabela 3), 8,81 para SM (Tabela 4) e 8,80 para ST (Tabela 5), indicando que a presença de *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Minnesota foi capaz de interferir significativamente sobre o crescimento do *pool* de *Lactobacillus* spp. após as 24h de incubação, promovendo uma discreta redução na contagem bacteriana. Por outro lado, esse comportamento não foi observado ao incubar ST e PL como controles (Tabela 5).

Tabela 2. Média de Log UFC/mL de co-cultura do *Pool* de *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* Infantis (SI) avaliados pela técnica de co-cultura nos tempos 0, 6, 10 e 24 horas após incubação a 37°C em aerobiose.

Grupos/Tempo(h)	0	6	10	24	Média
p-value	K-W p= 0.0004965	K-W p= 0.0007359	K-W p = 0.0001632	K-W p = 2.772e-05	K-W = 2.2e-16
G1 - S. I	8,81 A ¹ b ²	9,22 Aab	9,35 Aa	8,76 ABb	9,03 AB
G2 - PL	8,69 Ab	9,29 Ab	9,41 Aab	9,65 Aa	9,26 A
G3 - Co-cultura (recuperação de SI)	8,53 ABa	7,21 Ba	0,00 Bb	0,00 Cb	3,94 C
G4 - Co-cultura (Recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp.)	7,96 Bc	9,19 Aab	9,26 Aa	8,67 BCbc	8,77 B

¹Letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Dunn entre as médias das colunas ($\alpha=5\%$).

²Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Dunn/Tukey entre as médias das linhas ($\alpha=5\%$).

Observou-se que a contagem (Log UFC/mL) de SI na presença de PL (G3) não apresentou redução significativa com seis horas de incubação e evoluindo para ausência de crescimento bacteriano com 10 horas de incubação (Tabela 2)

Resultados similares foram observados para SH (G3 – Tabela 3) em que não foi possível observar redução significativa com 6 horas de incubação, reduzindo a níveis significantes e não detectáveis com 10 horas de incubação.

Tabela 3. Média de Log UFC/mL de co-cultura do *Pool* de *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* Heidelberg (SH) avaliados pela técnica de co-cultura nos tempos 0, 6, 10 e 24 horas após incubação a 37°C em aerobiose.

Grupos/Tempo(h)	0	6	10	24	Média
p-value	K-W p= 7.195e-05	K-W p= 0.003591	K-W p= 0.0004069	K-W p = 2.719e-05	K-W p= 2.573e-12
G1 - S. H	8,96 A	9,19 A	9,39 A	9,07 AB	9,15 AB
G2 - PL	8,70 BC b	9,29 Ab	9,41 Aab	9,65 Aa	9,26 A
G3 - Co-cultura (recuperação de SH)	8,71 AB a	7,24 Ba	0,00 Bb	0,00 Cb	3,98 C
G4 - Co-cultura (Recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp.)	7,95 C b	8,95 Aa	9,23 Aa	8,55 BCab	8,67 B

¹Letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Dunn entre as médias das colunas ($\alpha=5\%$).

²Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Dunn/Tukey entre as médias das linhas ($\alpha=5\%$).

Em concordância com os outros SI e SH, observou-se que SM não apresentou redução significativa com 6 horas de incubação, demonstrando comportamento similar aos outros sorovares, reduzindo a contagem e passando a ser inexistente com 10 horas de incubação na co-cultura (G3 – Tabela 4).

Tabela 4. Média de Log UFC/mL de co-cultura do Pool de *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* Minnesota (SM) avaliados pela técnica de co-cultura nos tempos 0, 6, 10 e 24 horas após incubação a 37°C em aerobiose.

Grupos/Tempo(h)	0	6	10	24	Média
p-value	K-W p= 0.007043	K-W p= 6.66e-05	K-W p= 7.497e-05	K-W p= 8.856e-06	K-W p= 3.335e-13
G1 - S. M	8,84 Ab	9,04 BCab	9,06 Aa	9,21 ABab	9,04 A
G2 - PL	8,70 ABb	9,29 ABb	9,41 Aab	9,65 Aa	9,26 A
G3 - Co-cultura (recuperação de SM)	8,57 ABa	6,73 Ca	0,00 Cb	0,00 Cb	3,82 C
G4 - Co-cultura (Recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp.)	8,28 Bb	9,35 Aa	9,13 BCab	8,44 BCb	8,81 B

¹Letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Dunn entre as médias das colunas ($\alpha=5\%$).

²Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Dunn/Tukey entre as médias das linhas ($\alpha=5\%$).

No que se referente ao sorovar de *Salmonella* Typhimurium foi possível observar um comportamento similar aos outros sorovares, não havendo diferença significativa nos tempos 0 e 6 horas de incubação, iniciando sua redução significativa e níveis indetectáveis com 10 e 24 horas de incubação (Tabela 5 – G3).

Tabela 5. Média de Log UFC/mL de co-cultura do Pool de *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* Typhimurium (ST) avaliados pela técnica de co-cultura nos tempos 0, 6, 10 e 24 horas após incubação a 37°C em aerobiose.

Grupos/Tempo(h)	0	6	10	24	Média
p-value	ANOVA p= 0.00216	K-W p= 0.008707	K-W p= 0.01002	K-W p= 0.00264	K-W p= 7.881e-08
G1 - S. T	8,82 Ab	9,10 ABab	9,28 Aa	9,21 ABa	9,10 A
G2 - PL	8,70 Ab	9,29 Ab	9,40 Aab	9,65 Aa	9,26 A
G3 - Co-cultura (Recuperação de ST)	8,42 ABa	7,38 Ba	0,00 Bb	0,00 Bb	3,95 B
G4 - Co-cultura (Recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp.)	8,13 Bb	9,17 ABa	9,31 ABa	8,57 ABab	8,80 A

¹Letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Dunn entre as médias das colunas ($\alpha=5\%$).

²Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Dunn/Tukey entre as médias das linhas ($\alpha=5\%$).

1 Divyashree *et al.* (2021) demonstraram a capacidade de *L.casei* MYSRD 108 e *L.*
2 *plantarum* MYSRD 71 em competir e inibir o crescimento de *S. Paratyphi*. De forma
3 semelhante em nosso estudo foi possível observar que PL foi capaz de inibir de forma eficiente
4 a cultura dos quatro sorovares de *Salmonella* avaliados.

5 *Salmonella* Typhimurium apresenta grande importância pelo impacto sobre a
6 importância na saúde pública e segurança alimentar. Mok *et al.* (2024) investigaram a atividade
7 anti-*Salmonella* de *Limosilactobacillus reuteri* KUB-AC5 em co-cultivo com *Salmonella*
8 Typhimurium. O estudo iniciou a co-cultura com uma concentração de 4 Log UFC/mL do
9 sorovar avaliado, observando sua fase exponencial de crescimento. Após 18 horas de
10 incubação, os níveis de *S. Typhimurium* foram reduzidos a níveis indetectáveis. De forma
11 semelhante ao observado em nosso experimento, houve uma redução de 1 Log UFC/mL nas
12 primeiras 6 horas de incubação e, após 10 horas, não foi detectada recuperação bacteriana na
13 co-cultura.

14 Mulaw *et al.* (2020) testaram a capacidade de inibição de uma mistura probiótica,
15 composta por três cepas de *Lactobacillus* spp., frente a *Salmonella* Typhimurium, e observaram
16 que após 24 horas de incubação, houve 100% de inibição no crescimento do sorovar, indicando
17 uma alto potencial inibitório das cepas probióticas frente ao patógenos. Já em nosso estudo foi
18 possível observar total inibição no crescimento bacterianos após 10 horas de incubação,

19 Resultados similares foram relatados por Hage *et al.* (2022), que observaram contagens
20 de *Salmonella* Infantis variando entre 10^5 e 10^6 UFC/mL nas primeiras quatro horas de
21 incubação. No entanto, com oito horas de incubação, houve uma redução significativa do
22 crescimento na co-cultura, atingindo níveis insignificantes em 24 horas. Em nosso estudo, foi
23 possível observar contagens de 10^7 UFC/mL com seis horas de incubação nas amostras de
24 *Salmonella* Infantis, não demonstrando diferença significativa em relação às contagens iniciais,
25 contudo, níveis indetectáveis de *Salmonella* Infantis foram observados com 10 horas de
26 incubação, o que atribuímos à presença de uma alta concentração de *Lactobacillus* spp. no
27 produto comercial utilizado.

28 Shi *et al.* (2022) e Wiktorczyk-Kapischke *et al.* (2024) confirmaram o efeito antagônico
29 de diversas cepas de *Lactobacillus* spp., como *L. rhamnosus* SQ511 e *L. paracasei*, em co-
30 cultivo com *Salmonella* Enteritidis. Esses estudos demonstraram que bactérias ácido-láticas
31 (LAB) possuem efeito inibitório contra diferentes sorovares de *Salmonella* spp., reduzindo sua
32 sobrevivência ao longo do tempo de incubação, com uma redução média de 4,20 Log UFC/mL
33 em até 72 horas. Em contrapartida, nosso estudo empregou um *pool* de *Lactobacillus* spp. frente

a diferentes sorovares de *Salmonella* spp. e obteve resultados satisfatórios, sendo observado total neutralização do crescimento bacteriano após 10 horas.

Reconhecendo a relevância de *Salmonella* spp. na cadeia produtiva de frangos de corte, Wishna-Kadawarage, Hickey e Siwek (2024) investigaram o uso de um produto comercial contendo seis cepas de *Lactobacillus* spp. no controle de *Salmonella* spp. na avicultura de corte. Entre os resultados, foi observada uma redução significativa nas contagens de *Salmonella* spp. a partir de 10 horas de incubação, com níveis indetectáveis de *Salmonella* Typhimurium com 24 horas de incubação, atribuídos à ação de ácidos orgânicos. De forma semelhante, no presente estudo foi possível observar redução significativa e ausência na contagem bacteriana com 10 horas de incubação, se mantendo com 24 horas de incubação. Esse desempenho foi atribuído à combinação de 11 cepas presentes no *pool* de *Lactobacillus* spp., que potencializaram a ação contra *Salmonella* spp. Sugerindo que o *pool* de *Lactobacillus* spp. possui propriedade bacteriostáticas e bactericidas contra o sorovar *Salmonella* Typhimurium.

Além da erradicação da *Salmonella* spp. pela interferências nas funções metabólicas dos patógenos causados pelos ácidos orgânicos, as bactérias ácido lácticas possuem capacidade de produzir outros metabólitos, antioxidantes a partir do metabolismo do carbono como fenólicos, peróxido de hidrogênio, acetaldeído, acetoína, e a partir do metabolismo de nitrogênio, como é o caso das bacteriocinas, peptídeos e aminas biogênicas (Khubber *et al.*, 2022; Wishna-Kadawarage, Hickey e Siwek, 2024). No entanto, em nosso estudo o metabólito específico responsável por essa inibição não foi identificado, sugerindo pesquisas futuras e elucidação dos mecanismos envolvidos na atividade antimicrobiana.

Com intuito de avaliar atividade inibitória de *Lactobacillus* spp. sobre os sorovares de *Salmonella* spp., Adetoye *et al.* (2018) avaliaram a capacidade antagônica por meio de co-cultura de duas cepas ácido lácticas, *Lactobacillus salivarius* C86 e *Lactobacillus amylovorus* C94 contra dois sorovares de *Salmonella enterica* em condições semelhantes ao estudo proposto. De forma similar ao nosso estudo, foi possível observar redução da contagem bacteriana após 8 horas de incubação, e ausência de recuperação de *Salmonella* spp. após 16 horas de incubação.

Os resultados demonstram a relevância da co-cultura como método experimental para avaliar interações entre probióticos e patógenos, com potencial aplicação na saúde animal, humana e segurança dos alimentos.

No presente estudo, foi comprovada a eficácia antagônica do *pool* de *Lactobacillus* spp. contra *Salmonella* spp. embora o metabólito responsável por essa inibição não foi caracterizado.

Sugere-se, portanto, a realização de estudos adicionais para elucidar os mecanismos bioquímicos envolvidos nessa atividade antimicrobiana.

4. CONCLUSÃO

O *pool* de *Lactobacillus* spp. comercial apresentou atividade antagonista frente aos sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola, sugerindo contribuir em programas de controle do patógeno na indústria.

5. REFERÊNCIAS

- ABPA – **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Brazilian Chicken. Nossa história 2024. Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/pt/poultry-industry/background>>. Acesso em: 18 mai 2024;
- ABPA – **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Relatório anual 2024. 08 Carne de frango. p 10-20. 2024. Disponível em< <http://abpa-br.org/relatorios/>>. Acesso 15 de mai 2024.
- ADETOYE, A. *et al.*, Characterization and anti-salmonella activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 96, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1248-y>.
- AFSHARI, A *et al.* *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium Identification in poultry carcasses. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 45 – 50, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6004630/>.
- BARROS, M. R. *et al.*, Avaliação in vitro da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do ingluvírio e cecos de aves sobre *Salmonella*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 863-868, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000400013>.
- BRASÃO, S. *et al.*, Characterization and control of biofilms of *Salmonella* Minnesota of Poultry origin. **Food Bioscience**, v. 39, p. 100811, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100811>.
- CASEWELL, M. *et al.* The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 159 – 161, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg313>.
- CHIN, W. L. *et al.*, Selective screening *Lactobacillus* spp. against *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium and optimizing a cane molasses-based medium with *Lactobacillus acidophilus* as a guiding model. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 160, p. 105197, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2023.105197>.
- CHOI, A. *et al.*, Antagonistic Activities and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Derived from a Plant-Based Fermented Food. **Frontiers Microbiology**, v.9, n. 1963, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01963>.

CHUGH, B; KAMAL-ELDIN, A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 76–82, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.02.003>.

COLLIGNON, P.J., MCEWEN SA. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. **Tropical Medicine Infection Disease**, v.4, n.1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>.

CORTÉS, V. *et al.* Monitoring antimicrobial resistance trends in *Salmonella* spp. from poultry in Eastern Spain. **Poultry Science**, v. 101, n. 6, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101832>.

COSTA, W. *et al.* Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. **Food Research International**, v. 108, p. 172-182, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.045>.

DEAN, A. G.; ARNER, T. G.; SUNKI, G. G.; FRIEDMAN, R.; LANTINGA, M.; SANGAM, S.; ZUBIETA, J. C.; SULLIVAN, K. M.; BRENDDEL, K. A.; GAO, Z.; FONTAINE, N.; SHU, M.; FULLER, G.; SMITH, D. C.; NITSCHKE, D. A.; FAGAN, R. F. **Epi Info™: a database and statistics program for public health professionals**. Atlanta, GA: CDC, 2011.

DEWI, G. *et al.* Effect of plant-derived antimicrobials against multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg in ground Turkey. *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium Identification in poultry carcasses. **Poultry Science**, v. 103, p. 101581, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101581>.

DIVYASHREE, S. *et al.*, Probiotic properties of *Lactobacillus casei* – MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum* - MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*. **Biotechnology reports**, v.32, p. e00622, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00672>.

ELSHEBRAWY, H. A *et al.* Multidrug-resistant *Salmonella* enterica serovars isolated from frozen chicken carcasses. **LWT - Food Science and Technology**, v. 164, p. 113647, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113647>.

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Canadá, 30 abr. – 1 mai. 2002. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em 13 mai 2024.

GRATIA A. Techniques selectives pour la recherche systematique des germes antibiotique. Paris: C.R. **Seances Soc. Biol. Fil.**, 1946. p.1053-1055.

GAO, J. *et al.* Effects of novel microecologics combined with traditional Chinese medicine and probiotics on growth performance and health of broilers. **Poultry Science**, v. 101, p. 101412, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101412>.

HAGE, R. *et al.* The Detection of Potential Native Probiotics *Lactobacillus* spp. against *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Infantis and *Salmonella* Kentucky ST198 of Lebanese Chicken Origin. **Antibiotics**, v. 11, n. 9, p. 1147, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091147>.

HAI, D.; HUANG, X.; Protective effect of *Lactobacillus reuteri* Lb11 from chicken intestinal tract against *Salmonella* Enteritidis SE05 in vitro. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 114, p. 1747-1757, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01625-4>.

HOELZER, K. *et al.* Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? **BMC Veterinary Research**, v.13, p.211, 2017. DOI: [10.1186/s12917-017-1131-3](https://doi.org/10.1186/s12917-017-1131-3).

JENI, R. E. Probiotics and potential applications for alternative poultry production systems. **Poultry Science**, v.100, n.7, p. 101156, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101156>.

JIMENEZ-TRIGOS, E. *et al.*, Search of antimicrobial lactic acid bacteria from *Salmonella* negative dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03070-x>.

JOTHI, V.V.; ANANDAPANDIAN, K.T.K.; SHANKAR, T. Bacteriocin production by probiotic bacteria from curd and its field application to poultry. **Archives of Applied Science Research**, v. 4, n. 1, p. 336-347, 2012.

KHUBBER, S. *et al.* Lactic acid fermentation as a useful strategy to recover antimicrobial and antioxidant compounds from food and by-products. **Current Opinion in Food Science**, v.43, p.189-198, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.11.013>.

MARIAM, S. H. *et al.*, Diffusible substances from lactic acid bacterial cultures exert strong inhibitory effects on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar enteritidis in a co-culture model. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 35, 2017. DOI: [10.1186/s12866-017-0944-3](https://doi.org/10.1186/s12866-017-0944-3).

MAPA – **Ministério da Agricultura e Pecuária**. Anuário dos programas de controle de alimentos de origem animal do DIPOA, v. 10, 2024. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em: 08/01/2025.

MATTOCK, J. *et al.* A One Health Perspective on *Salmonella enterica* Seroovar Infantis, an Emerging Human Multidrug-Resistant Pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid3004.231031>.

MEHDI, Y. *et al.* Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and Alternatives. **Animal Nutrition**, v. 4, p.170-178, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>.

MOK, K. *et al.* Synergistic activity of *Limosilactobacillus reuteri* KUB-AC5 and water-based plants against *Salmonella* challenge in a human in vitro gut model. **Scientific Reports**, v. 14, n. 4730, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53912-5>.

MULAW, G. *et al.* Protective Effect of Potential Probiotic Strains from Fermented Ethiopian Food against *Salmonella* Typhimurium DT104 in Mice. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/7523629>.

OIE – **World Organization for Animal Health 2020**. About antimicrobial resistance. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/for-the-media/amr/>>. Acesso em 15 out. 2023.

- OKAMOTO, A. S. *et al.* Bacterial communication between *Lactobacillus* spp. isolated from poultry in the inhibition of *Salmonella* Heidelberg - Proof of concept. **Poultry Science**, v. 97, n. 8, p. 2708–2712, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pey141>.
- PENA, N. *et al.* Screening and Genomic Profiling of Antimicrobial Bacteria Sourced from Poultry Slaughterhouse Effluents: Bacteriocin Production and Safety Evaluation. **Genes**, v. 15, n. 12, p. 1564, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes15121564>.
- PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, R. K., Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. **Biomedical Journal**, v. 40, p. 270-283, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.008>.
- R Core Team (2023).** *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.
- RASAMSETTI, S. *et al.* Assessing *Salmonella* prevalence and complexity through processing using different culture methods. **Poultry Science**, v. 101, n. 7, p. 101949, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101949>.
- RIBEIRO, G.C. *et al.*, Standardization of the *Spot-on-the-Lawn* antagonism test in the inhibition of *Salmonella* Heidelberg by *Lactobacillus salivarius*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 76, n. 2, p. 367-373, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-13059>.
- SABO, S.S. *et al.* Bioprospecting of probiotics with antimicrobial activities against *Salmonella* Heidelberg and that produce B-complex vitamins as potential supplements in poultry nutrition. **Scientific Reports**, v.10, p.723-725, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64038-9>.
- SAIDENBERG, A. *et al.* *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in Brazilian broilers: Genomic characterization of third-generation cephalosporin and fluoroquinolone-resistant strains. **Environmental Microbiology Reports**, v. 15, p. 119-128, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13132>.
- SALIM, H. MD *et al.* Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. **Science Progress**, v. 101, n. 1, p. 52 – 75, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3184/003685018X15173975498947>.
- SHAJI, S.; SELVARAJ. R.; SHANMUGASUNDARAM, R. *Salmonella* Infection in Poultry: A Review on the Pathogen and Control Strategies. **Microorganisms**, v. 11, p. 2814, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112814>.
- SHENTU, H. *et al.* Purification, characterization, and mode of action of *Sackin* ZFM225, a novel bacteriocin from *Lactobacillus sakei* ZFM225. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.35, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101494>.
- SHI, S. *et al.*, Antagonistic activity and mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* SQ511 against *Salmonella enteritidis*. **3 Biotech**, v. 12, n. 126, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03176-5>.

SOUZA *et al.* Multidrug resistant and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from poultry. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6, p. 3045-3056, 2019. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p3045.

TEAME, T. *et al.* Paraprobiotics and Postbiotics of Probiotic *Lactobacilli*, Their Positive Effects on the Host and Action Mechanisms: A Review. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.570344>.

THE JAMOVİ PROJECT. *Jamovi* (Version 2.3) [Computer software]. 2022. Disponível em: <<https://www.jamovi.org>> Acesso em: 30 dez 2024.

WANG, B. *et al.* Probiotic *Paenibacillus polymyxa* 10 and *Lactobacillus plantarum* 16 enhance growth performance of broilers by improving the intestinal health. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 829 – 840, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.03.008>.

WIKTORCZYK-KAPISCHKE, N. *et al.* Antimicrobial Action of *Lactobacillus* spp. Isolated from Yoghurt against *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*: A Pilot Study. **Applied Science**, v. 14, n. 9010, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/app14199010>.

WISHNA-KADAWARAGE, R. N. *et al.* In-vitro selection of lactic acid bacteria to combat *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 133, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03946-8>.

ZAWISTOWSKA-ROJEK, A.; TYSKI, S. Are Probiotic Really Safe for Humans? **Polish Journal of Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 251–258, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-044>.

ZIECH, R. E. *et al.* Multidrug resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants. **Poultry Science**, v. 47, n. 1, p. 191-195, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.021>.

ZISHIRI, O. T.; MKHIZE, N.; MUKARATIRWA, S. Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from South Africa and Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 83, n. 1, p. a1067, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4102/ojvr.v83i1.1067>.