

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial



TESE

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E
MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS
BACTERIOCINOGENÉTICAS EM LEITE *IN NATURA* DA
REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA

Liziane Schittler

Pelotas, 2012

LIZIANE SCHITTLER

Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de bactérias
ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite *in natura* da região
oeste de Santa Catarina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Luís Augusto Nero

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Marilene dos Santos Franceschi – CRB-14/812
Biblioteca de Engenharia de Alimentos – UDESC

S337i Schittler, Liziane

Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina / Liziane Schittler. – 92f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 2012. – Orientador Wladimir Padilha da Silva; co-orientador Luís Augusto Nero.

1. *Enterococcus*. 2. Enterocinas. 3. *Listeria monocytogenes*. 4. Leite *in natura*. 5. Bacteriocinas. I. Silva, Wladimir Padilha da. II. Nero, Luís Augusto. III. Título.

CDD: 576.163

Banca Examinadora

Prof. DR. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)

DCTA/UFPeI

Prof. DRa. Ângela Maria Fiorentini

DCTA/UFPeI

DR. Marcelo Medonça

CDTec/UFPeI

Prof. DRa Márcia Monks Jantzen

Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva/UFRGS

Dedico...

Aos meus pais Egon Schittler (*in memorian*) e Iria Stach Schittler, pelos sábios ensinamentos.

Ao meu marido Alexandre Moroni e a nossa filha Vitória Schittler Moroni, por todo amor, apoio, força, compreensão e confiança.

Agradecimentos

Ao DCTA-FAEM-UFPe, pela oportunidade em realizar o curso de Doutorado, em especial ao Professor Wladimir Padilha da Silva, pela orientação ensinamentos, incentivo, compreensão, amizade e por acreditar no ensino de qualidade.

Ao Professor Luiz Augusto Nero da UFV, pela co-orientação e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade do Estado de Santa Catarina/UDESC, por apoiar e acreditar na qualificação docente.

Aos colegas professores do Departamento de Engenharia de Alimentos da UDESC pelo apoio e amizade.

À amiga e colega do Departamento de Engenharia de Alimentos Anieli Kempka pelas dicas e ensinamentos nas avaliações estatísticas dos resultados.

Às acadêmicas do curso de Engenharia de Alimentos da UDESC, em especial Idyanara Wisniewski, Fabiane Dalla Beta e Ana Carolina Baldissera pelo auxílio na realização das análises e principalmente pelo carinho, alegria e amizade.

Às minhas professoras e queridas amigas Ângela Maria Fiorentini e Vera Maria Klajn pela força, dicas, estímulo e presença.

Ao professor Celso Medina Fagundes da UFPe, pelo apoio, carinho e amizade.

À grande amiga e colega de doutorado Massako Takahashi Dourado pelo carinho, amizade e apoio.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA, em especial a Carolina Peixoto Bastos, Karla Sequeira Mendonça e Milena Tomasi Bassani pelo apoio no desenvolvimento das análises de biologia molecular, meus sinceros agradecimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular do CDTec, UFPel, em especial ao professor Odir Antônio Dellagostin e ao mestrando Michel pelos ensinamentos e o tempo dispensados nas intermináveis dúvidas nas análises de biologia molecular.

À professora Patrícia Nascente do Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFPel pelo apoio e tempo dispensando nos ensinamentos na utilização do Vitek[®]2.

A todos os professores, funcionários e colegas do DCTA pelos ensinamentos e experiências vividas.

Ao meu marido e à minha filha que compreenderam tantos momentos de ausência e que estiveram comigo na superação das adversidades vividas.

Aos meus irmãos Daniela Schittler, Michele Stach Correa e Guilherme Stach Correa pela amizade, carinho e apoio.

A DEUS, pela fé, pela vida, por ser minha luz e meu guia nestes anos de estrada.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

SCHITTLER, Liziane. Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina. **2012. 92f. – Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.**

As bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo de micro-organismos que podem estar presentes em diversos alimentos, incluindo o leite *in natura*, e que apresentam a capacidade de produzir várias substâncias com atividade antagonista, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas, que têm potencial para serem utilizadas na bioconservação de alimentos. Este estudo teve como objetivo isolar e realizar a caracterização bioquímica e molecular de BAL bacteriocinogênicas em leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina, Brasil. Dezoito amostras de leite *in natura*, coletadas em dias diferentes no tanque de recepção de um laticínio foram inoculados nos ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e M17 e incubados a 25 e 35°C, sob aerobiose e anaerobiose, sendo o primeiro por 72h e, o segundo, por 48h, obtendo-se contagens de BAL entre 3,2 e 7,46 log UFC mL⁻¹ de leite. Obtiveram-se 478 isolados, Gram-positivos e catalase negativa, os quais foram avaliados quanto a sua atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes*, bem como se identificou a natureza da atividade antagonista, através do método *spot-on-the-lawn*, utilizando os meios ágar MRS, ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e ágar BHI com catalase (BHI+ catalase). Os 28 isolados que apresentaram antagonismo contra *L. monocytogenes* e nos quais a atividade antagonista foi devida a um peptídeo, confirmada pela sensibilidade a pelo menos uma das enzimas testadas (pepsina, α -quimotripsina, proteinase K e tripsina), foram identificados em nível de gênero e espécie através do sistema ViteK[®]2. Vinte e quatro isolados puderam ser identificados por este sistema, sendo vinte (20) *Enterococcus faecium*, três (3) *Leuconostoc pseudomesenteroides* e um (1) *E. gallinarum*. Entre os 20 isolados identificados bioquimicamente como *E. faecium*, 16 foram confirmados em nível de gênero por PCR e em nível de espécie através do sequenciamento do gene *pheS*. Esses 16 isolados foram agrupados por Rep-PCR e

avaliados por PCR quanto a presença dos genes das enterocinas A, B, P e L50A/B. Todos os isolados carregavam pelo menos um dos genes dessas enterocinas e, apesar de terem gerado quatro diferentes perfis moleculares por Rep-PCR, não houve relação direta entre a presença dos genes das enterocinas e os perfis moleculares. Além disso, foram testados para dois marcadores de virulência: atividade da β -hemolisina e sensibilidade a antimicrobianos de uso clínico. Nenhum isolado apresentou atividade da enzima β -hemolisina. A sensibilidade a antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão em disco, utilizando-se os antibióticos ampicilina (10 μ g), vancomicina (30 μ g), tetraciclina (30 μ g) e penicilina G (10 μ g). Todos os isolados foram sensíveis a vancomicina, 94% a ampicilina, e 88% a tetraciclina. Os maiores níveis de resistência foram para penicilina (44%) e tetraciclina (19%). Verifica-se que isolados de *E. faecium* provenientes de leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina, apresentam grande potencial para serem utilizados como bioconservadores, no entanto, há necessidade de se realizar mais estudos para verificar a presença de genes de virulência nesses isolados e/ou a viabilidade de purificação das enterocinas para sua utilização em alimentos.

Palavras chave: *Enterococcus*, enterocinas, *Listeria monocytogenes*, leite *in natura*, bacteriocinas

Abstract

SCHITTLER, Liziane. Isolation, biochemical and molecular characterization of bacteriocinogenic lactic acid bacteria (LAB) in raw milk of the west region of Santa Catarina - Brazil. **2012. 92f. – Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.**

Lactic acid bacteria (LAB) are a group of microorganisms that may be present in many foods, including raw milk, and have the capacity of produce several substances with antagonist activity, such as organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins, where can have the potential to be used in the conservation of foods. The aim of this study was to carry out the isolation of bacteriocinogenic LAB and perform its biochemical and molecular characterization from raw milk in the west region of Santa Catarina, Brazil. Eighteen samples of raw milk were collected from a reception tank at different days in a dairy industry. After, the isolates were inoculated in the MRS agar and M17 agar, and then incubated at 25 and 37 °C, under aerobic and anaerobic conditions, being the first for 72h and the second for 48 hours. The average counting of LAB was 3.2 to 7.46 log CFU.mL⁻¹ of milk. A total of 478 Gram-positive and catalase-negative bacteria were isolated. Using the spot-on-the-lawn method, all isolates were evaluated regarding of the antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* on MRS agar, BHI agar and BHI agar with catalase (BHI + catalase). Also, the identity of the antagonism was performed through the same spot-on-the-lawn method. From those, 28 isolates that showed antagonistic reaction against *L. monocytogenes*, and in which the antagonistic activity it was a peptide, confirmed by sensitivity test for at least one of the enzymes, pepsin, α-chymotrypsin, proteinase K or trypsin, were then identified at genus and species levels by the ViteK[®]2 system. Twenty four isolates were identified by this device, being twenty *Enterococcus faecium*, three *Leuconostoc pseudomesenteroides* and one *Enterococcus gallinarum*. Among the 20 isolates identified biochemically as *E. faecium*, 16 were confirmed at genus level by PCR and at species level through sequencing of the gene *pheS*. These 16 isolates were grouped by Rep-PCR and evaluated by PCR according to the presence of enterocins genes A, B, P and L50A/B. All the isolates carried at least one of the genes of these enterocins and, despite of having

generated four different molecular profiles of Rep-PCR, there was not a direct relation between the presence of enterocins genes and the molecular profiles. Moreover, these 16 isolates were evaluated by two markers of virulence: activity of the β -hemolysin and sensitivity to clinical antimicrobials. None of the isolates showed activity of the β -hemolysin enzyme. The sensitivity to antimicrobials was evaluated by disc diffusion method, using the antibiotics ampicillin (10 μ g), vancomycin (30 μ g), tetracycline (30 μ g) and penicillin G (10 μ g). All isolates were sensitive to vancomycin, and had 94% sensitivity to ampicillin, and 88% sensitivity to tetracycline. The highest levels of resistance were for penicillin (44%) and tetracycline (19%). It was verified that the isolates of *E. faecium* from raw milk of the west region of Santa Catarina presents great potential to be used as bioconservation. However, there is a necessity to conduct further studies to verify the presence of virulence genes in these isolates and/or the feasibility of the enterocins purification for its uses in foods.

Keywords: *Enterococcus*, enterocins, *Listeria monocytogenes*, raw milk, bacteriocins

Lista de Figuras

Figura 1	Mecanismo de ação das bacteriocinas classe I, classe II e bacteriolisina em células bacterianas Gram-positivas.....	26
Figura 2	Equipamento ViteK [®] 2 (BioMerieux, France).....	37
Figura 3	Cartão (BioMerieux, France) com 43 testes bioquímicos para identificação de micro-organismos Gram-positivos.....	37
Figura 4	Contagens de bactérias ácido lácticas (\log_{10} UFC mL ⁻¹) em 18 amostras de leite <i>in natura</i> nos meios MRS e M17, incubadas em aerobiose a 25 °C.....	49
Figura 5	Contagens de bactérias ácido lácticas (\log_{10} UFC mL ⁻¹) em 18 amostras de leite <i>in natura</i> nos meios MRS e M17, incubadas em aerobiose a 35 °C.....	50
Figura 6	Contagens de bactérias ácido lácticas (\log_{10} UFC mL ⁻¹) em 18 amostras de leite <i>in natura</i> nos meios MRS e M17, incubadas em anaerobiose a 25 °C.....	50
Figura 7	Contagens de bactérias ácido lácticas (\log_{10} UFC mL ⁻¹) em 18 amostras de leite <i>in natura</i> nos meios MRS e M17, incubadas em anaerobiose a 35 °C.....	51
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR para o gene <i>tuf</i> dos isolados identificados como <i>E. faecium</i> pelo Vitek [®] 2. M marcador de peso molecular Ladder 100pb; P controle positivo: <i>Enterococcus faecium</i> FAIR – E 178 (112pb); B controle negativo; 5, 13, 19, 30, 43, 57, 89, 104, 276, 257, 336, 340, 341, 342, 356 e 428: isolados positivos para o gene <i>tuf</i> ; 16, 233, 144, 323, 433, 434, 453: isolados negativos para o gene <i>tuf</i>	59

- Figura 9 Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR dos isolados de *E. faecium* provenientes de leite *in natura* para identificação do gene estrutural da enterocina A. M marcador de peso molecular Ladder 100pb; P controle positivo: *Enterococcus faecium* FAIR – E 178 (132pb); B controle negativo; 13, 30, 53, 89, 104, 43, 276, 356 e 428: isolados positivos para o gene estrutural da enterocina A; 5, 19, 297, 336, 340, 341, 342: isolados negativos para o gene estrutural da enterocina A..... 62
- Figura 10 Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR dos isolados de *E. faecium* provenientes de leite *in natura* para identificação do gene estrutural da enterocina B. M marcador de peso molecular Ladder 100pb; P controle positivo: *Enterococcus faecium* FAIR – E 178 (201pb); B controle negativo; 57: isolado positivo para o gene da enterocina B; 5, 13, 19, 30, 89, 104, 43, 276, 297, 336, 340, 341, 342, 356, 428: isolados negativos para o gene da enterocina B..... 63
- Figura 11 Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR de isolados de *E. faecium* provenientes de leite *in natura* para identificação do gene estrutural da enterocina P. M marcador de peso molecular Ladder 100pb; P controle positivo: *Enterococcus faecium* FAIR – E 178 (87pb); B controle negativo; 5, 13, 30, 57, 104, 43, 276, 297, 340, 341, 342: isolados positivos para o gene da enterocina P; 19, 336, 356, 89, 428: isolados negativos para a enterocina P..... 64
- Figura 12 Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR de isolados de *E. faecium* provenientes de leite *in natura* para identificação do gene estrutural da enterocina L50A/B. M marcador de peso molecular Ladder 100pb; P controle positivo: *Enterococcus faecium* BFE – 1072 (274pb); B controle negativo; 5, 13, 19, 30, 57, 89, 104, 256, 297, 336, 340, 341, 342, 356 e 428: isolados positivos para o gene da enterocina L50A/B; 43: isolado negativo para o gene da enterocina L50A/B..... 64

Figura 13 Dendrograma da Rep-PCR de 16 isolados de *E. faecium*,
identificando os perfis moleculares obtidos e a identificação pelo
sequenciamento parcial do gene *pheS*..... 67

Lista de Tabelas

Tabela 1	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e posterior sequenciamento parcial do gene <i>pheS</i> (Naser et al., 2005) nos 16 isolados de <i>E. faecium</i>	45
Tabela 2	Oligonucleotídeos e condições de reação de PCR utilizadas para identificação de genes de enterocinas A, B, P e L50A/B em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite <i>in natura</i>	46
Tabela 3	Tamanhos dos halos de inibição (mm) para classificação dos enterococos como Resistente (R), Intermediário (I) e Sensível (S) para os antimicrobianos Ampicilina (10ug), Penicilina (10ug), Vancomicina (30ug) e Tetraciclina(30ug).....	48
Tabela 4	Médias das contagens de BAL (\log_{10} UFC mL ⁻¹) em leite <i>in natura</i> incubado sob aerobiose e anaerobiose a 25°C e 35°C.....	51
Tabela 5	Tamanho dos halos de inibição (mm) de 307 isolados de BAL provenientes de leite <i>in natura</i> contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A nos meios Man-Rogoso-Sharpe (MRS), Brain-heart Infusion (BHI) e BHI adicionado de catalase.	53
Tabela 6	Sensibilidade de 28 isolados de BAL as proteases (proteínase K, pepsina, α -quimotripsina e tripsina), identificação do gênero e espécie por Vitek [®] 2, confirmação do genero <i>Enterococcus</i> e identificação das enterocinas A, B, P e L50A/B por PCR.....	57
Tabela 7	Identificação microbiana e perfil bioquímico de 28 isolados de BAL pelo sistema Vitek [®] 2.....	58
Tabela 8	Ocorrência dos genes das enterocinas A, B, P e L50A/B e perfil genético de 16 isolados de <i>E. faecium</i> provenientes de leite <i>in natura</i> da região oeste de Santa Catarina, avaliados por PCR.....	65

Tabela 9	Perfil de resistência aos antimicrobianos Ampicilina, Penicilina, Vancomicina e Tetraciclina, e atividade da β -hemolisina de 16 isolados de <i>E. faecium</i> obtidos de leite <i>in natura</i> da região oeste de Santa Catarina.....	69
Tabela 10	Média do tamanho dos halos (mm) de inibição formados nos meios MRS, BHI e BHI + catalase por 16 isolados de <i>E. faecium</i> contra <i>L. monocytogenes</i>	71

Sumário

RESUMO	08
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 Leite.....	22
3.2 Bactérias ácido lácticas (BAL).....	23
3.3 Bacteriocinas.....	24
3.4 Enterococos e bacteriocinas.....	27
3.5 Enterococos e sua utilização em alimentos.....	30
3.6 Capacidade probiótica dos enterococos.....	31
3.7 Resistência a antimicrobianos e fatores de virulência dos enterococos.....	32
3.8 Isolamento e identificação de BAL bacteriocinogênicas.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Material.....	40
4.2 Isolamento e contagem das BAL no leite <i>in natura</i>	40
4.3 Verificação e identificação da atividade antagonista das BAL contra <i>Listeria monocytogenes</i>	41
4.4 Confirmação da atividade bacteriocinogênica.....	42
4.5 Identificação bioquímica e molecular de gêneros e espécies das BAL isoladas com atividade bacteriocinogênica.....	42
4.5.1 Identificação pelo sistema Vitek®2.....	43
4.5.2 Identificação do gênero <i>Enterococcus</i> por PCR.....	43
4.5.2.1 Extração do material genético.....	43
4.5.2.2 PCR.....	44
4.5.2.3 Sequenciamento parcial do gene <i>pheS</i>	44
4.6 Identificação de genes das enterocinas A, B, P e L50A/B.....	45
4.7 Indentificação dos perfis genéticos dos enterococos por Rep- PCR.....	46

4.8	Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos e atividade β -hemolítica	47
4.8.1	Sensibilidade a antimicrobianos de uso clínico.....	47
4.8.2	Atividade β -hemolisina.....	48
4.9	Análise estatística.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	Isolamento e contagem das BAL no leite <i>in natura</i>	49
5.2	Verificação e identificação da atividade antagonista das BAL contra <i>Listeria monocytogenes</i>	52
5.3	Confirmação da atividade bacteriocinogênica.....	54
5.4	Avaliação da identidade dos isolados de BAL com atividade bacteriocinogênica por métodos bioquímicos e moleculares.....	57
5.5	Identificação dos genes das enterocinas A, B, P e L50A/B por PCR.....	61
5.6	Perfis identificados por Rep-PCR.....	67
5.7	Avaliação da Sensibilidade a Antimicrobianos e da Atividade da β -hemolisina.....	68
5.8	Relação entre tamanho do halo de inibição contra <i>L. monocytogenes</i> nos meios de cultura MRS, BHI e BHI+catalase e natureza da atividade antagonista em 16 isolados de <i>E. faecium</i> produtores de enterocinas.....	70
6	CONCLUSÕES.....	73
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	74
8	REFERÊNCIAS	75
9	ANEXO.....	92

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços na ciência e na tecnologia, a preservação de alimentos ainda é um desafio, tanto em países em desenvolvimento, quanto nos industrializados, na busca de novas técnicas ou substâncias que sejam eficientes na conservação de alimentos com baixa toxicidade e que mantenham as características de cor, textura, sabor e aroma o mais próximo ao natural do produto.

Nesse sentido, as indústrias de alimentos têm utilizado a técnica de biopreservação e vêm incentivando as pesquisas na busca de novos micro-organismos e/ou seus metabólitos, que apresentem características bioconservadoras, de forma a atender esta exigência do mercado.

A biopreservação consiste no emprego de microbiota protetora e/ou de seus peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) que apresentem atividade antimicrobiana, promovendo o aumento da vida útil e garantindo a segurança dos alimentos.

O leite *in natura* é uma fonte importante de bactérias produtoras de bacteriocinas, haja vista que, na literatura, pertencentes ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) são descritos como produtores de bacteriocinas os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Propionibacterium*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium*. Dentre estes, destaca-se o gênero *Enterococcus*, por apresentar grande potencial genético para a produção de várias bacteriocinas, conhecidas como enterocinas. As enterocinas pertencem a classe II das bacteriocinas, que são chamadas como *pediocin-like*, e apresentam atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, um importante patógeno de origem alimentar. Além da capacidade bacteriocinogênica, os enterococos, em especial *Enterococcus faecium*, é considerada uma bactéria probiótica e sua aplicação em alimentos é licenciada no Brasil. Entretanto, seu uso na tecnologia de alimentos é controverso, devido ao potencial patogênico de alguns isolados, bem como por apresentar capacidade de transferir genes de resistência a antimicrobianos de uso clínico. Torna-se importante a avaliação de cada isolado, de forma a verificar seu potencial para ser utilizado na biopreservação de alimentos.

Outro aspecto importante é que a diversidade de BAL no leite *in natura* está diretamente relacionada com a região onde o leite foi obtido, gerando grandes

perspectivas para a identificação de novos isolados, de diferentes espécies bacterianas, com atividade bacteriocinogênica.

Em face do exposto, e da importância da bacia leiteira da região oeste de Santa Catarina, torna-se importante isolar e realizar a caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas (BAL) bacteriocinogênicas em leite *in natura* produzido nessa região.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar bactérias ácido lácticas (BAL) bacteriocinogênicas em leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina e realizar sua caracterização fenotípica e molecular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar BAL em leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina;
- Verificar se os isolados de BAL apresentam atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes* ;
- Identificar a(s) natureza(s) antagonista(s) da(s) substância(s) produzida(s) pelos isolados de BAL com atividade anti-*Listeria*;
- Identificar os gêneros e as espécies das BAL isoladas do leite *in natura* com atividade bacteriocinogênica por métodos fenotípicos e moleculares;
- Identificar a presença de genes das bacteriocinas nos isolados de BAL que apresentarem atividade bacteriocinogênica;
- Avaliar a sensibilidade a antimicrobianos e a atividade da β -hemolisina dos isolados de BAL com atividade bacteriocinogênica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LEITE

O Brasil ocupa a quinta posição na produção mundial de leite, produzindo 29.112.000 mil toneladas de leite/ano (EMBRAPA, 2011). Na economia agropecuária brasileira o leite é um dos seis mais importantes produtos, ficando a frente de produtos tradicionais como o arroz beneficiado e o café.

De acordo com dados da Empresa Brasileira de Agropecuária (2011), o maior produtor brasileiro de leite é o estado de Minas Gerais, responsável por 27% da produção nacional, seguido pelos estados do Rio Grande do Sul e Paraná com 12% cada um, sendo que o estado de Santa Catarina é responsável por 8% da produção nacional.

Em Santa Catarina, na região oeste, onde foi conduzido este estudo, encontra-se a maior bacia leiteira do estado, sendo responsável por 72,4% da produção leiteira (EPAGRI, 2011).

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

A composição do leite varia de acordo com um grande número de fatores, dentre eles, estão a espécie, raça, genética do animal, alimentação, idade e período de lactação. No entanto, em média, o leite *in natura* apresenta a seguinte composição: 87-88% de água; 3,0-4,0% de gordura; 4,5-4,8% de lactose; 3,2-3,5% de proteínas e 0,5-0,7% de sais minerais. Devido esta composição o leite é considerado rico em nutrientes e um excelente meio de cultura para os micro-organismos (FRANCO et al., 2000).

A microbiota do leite *in natura* é extremamente variada, sendo composta por diferentes grupos de micro-organismos, que permitem avaliar as condições de obtenção, bem como o status sanitário dos animais (ASTERI et al., 2010). Dentre os grupos de micro-organismos presentes no leite *in natura*, destacam-se bactérias indicadoras de contaminação, as patogênicas e as bactérias ácido lácticas (BAL) (HERREROS et al., 2007; ASTERI et al., 2010).

As BAL interferem diretamente sobre a microbiota do leite *in natura* devido a sua habilidade de produzir diversas substâncias com atividade antagonista, permitindo inibir o desenvolvimento de diversos micro-organismos patogênicos como

Staphylococcus aureus, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes* (CHEN; HOOVER, 2003; DEEGAN et al., 2006; POPPI et al., 2008; DAL BELLO et al., 2010).

3.2 Bactérias ácido lácticas (BAL)

As BAL compreendem um amplo grupo de micro-organismos que apresentam características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum. São bactérias Gram-positivas, que se apresentam na forma de cocos ou bacilos, não esporuladas, geralmente imóveis, catalase negativa, anaeróbicas e/ou aerotolerantes (LEROY; DE VUNYST, 2004).

São encontradas em vários alimentos, inclusive no leite *in natura* e derivados, e incluem os gêneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Propionibacterium*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Microbacterium* e *Bifidobacterium* (HOLZAPFEL et al, 2001). Essas bactérias são consideradas “Generally Recognized As Safe” (GRAS), podendo ser utilizadas em alimentos, com exceção de *Enterococcus* spp, cuja presença em água é considerada como contaminação fecal (GODFREE et al., 1997).

As BAL obtêm sua energia através da fermentação de carboidratos, podendo ser classificadas como homofermentativas ou heterofermentativas (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). O principal produto final da homofermentação é o ácido láctico, produzido a partir da glicose; já durante a heterofermentação, ocorre produção de diversos e diferentes compostos, produzindo-se ácido láctico em menor quantidade, em conjunto com etanol, ácido acético, dióxido de carbono, etc (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; STERR; WEISS; SCHMIDT, 2009).

Essas bactérias têm relevância, tanto na indústria de alimentos quanto em saúde pública, por apresentarem características transformadoras, deteriorantes, probióticas e bioconservadoras. São utilizadas como culturas iniciadoras (culturas *starter*), provocando transformações nas matérias-primas, produzindo ácidos e outras substâncias que conferem sabores e aromas específicos em produtos fermentados (LEROY; DE VUNYST, 2004). No entanto, a produção de ácidos e substâncias proteolíticas pelas BAL, pode determinar a deterioração precoce dos alimentos. Porém algumas BAL apresentam características probióticas, sendo

capazes de colonizar o trato gastrointestinal, e promovendo o balanço da microbiota autóctone nesse ambiente. Outra característica importante, é que várias BAL apresentam atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes importantes em alimentos. Esta atividade antagonista que as BAL possuem ocorre por diversos mecanismos, principalmente pela produção de substâncias inibitórias potencialmente letais aos micro-organismos (POPPI, 2008; BELLO et al., 2010). As principais substâncias com potencial antimicrobiano são: ácidos orgânicos, dióxido de carbono, álcoois, aldeídos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (HUGAS, 1998; OLIVEIRA; OLIVEIRA; GLÓRIA et al.; 2008). Muitas BAL são capazes de produzir bacteriocinas com atividade antagonista específica contra determinado grupo de bactérias ou a diferentes espécies (NES; JOHNSBORG, 2004). Dentre os micro-organismos patogênicos destaca-se o potencial das BAL para controlar ou inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, um importante patógeno de origem alimentar.

3.3 Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos de algumas BAL, biologicamente ativos, que são liberados extracelularmente, e apresentam atividade antagonista contra um grupo específico de micro-organismos sensíveis da mesma espécie (estreito espectro) ou de diferentes espécies ou gêneros (amplo espectro) (CARR et al., 2002; CHEN; HOOVER, 2003; COTTER et al., 2005).

A condição primordial para que um determinado isolado de BAL produza bacteriocinas é a presença de genes que as codificam (GÁLVEZ et al., 2007), entretanto, sua expressão depende de diversos fatores, entre eles, fatores ambientais.

A expressão gênica das bacteriocinas é regulada por genes usualmente organizados em *operons*, que podem se localizar no cromossomo, em plasmídeos, ou mesmo em *transposons* (CHEN; HOOVER, 2003; DEEGAN et al., 2006). Para a síntese das bacteriocinas são exigidos quatro genes: o gene estrutural que codifica o pré-peptídeo (pré-bacteriocina); o gene responsável pela produção da proteína que confere imunidade à célula produtora; o gene responsável pela produção de proteínas de transporte que externalizam a bacteriocina (denominado sistema de

transporte ABC); e o gene que codifica uma proteína acessória, não pertencente ao sistema de transporte ABC, mas necessária para a excreção da bacteriocina. Os genes responsáveis pela imunidade da célula produtora estão concentrados em *operons* (DEEGAN et al., 2006), e a proteína é produzida concomitantemente com a bacteriocina, pois trata-se de um mecanismo de proteção das cepas bacteriocinogênicas (ROSA; FRANCO, 2002).

Muitas bacteriocinas são moléculas catiônicas que apresentam acima de 60 aminoácidos e são termoestáveis (HUGAS, 1998; GARNEAU et al., 2002).

A produção de bacteriocinas é favorecida quando o micro-organismo é cultivado em condições de estresse, como em temperaturas sub ótimas ou pH ácido. Nestas condições, ocorre baixa taxa de multiplicação microbiana, resultando na melhor utilização de energia e maior disponibilidade de metabólitos para a síntese das bacteriocinas. Em condições ótimas de cultivo há elevada taxa de multiplicação, ocasionando a falta de aminoácidos disponíveis para produção das bacteriocinas (VAN DEN BERGHE et al., 2006).

As bacteriocinas produzidas pelas BAL estão divididas em três classes, de acordo com seus mecanismos de ação e particularidades da sua estrutura (NES et al., 1996, DEEGAN et al., 2006). A classe I é denominada lantibióticos, e são pequenos peptídeos (<5 kDa), termoestáveis, modificados pós-translacionalmente, formando aminoácidos desidratados, denominados de lantioninas e metilantioninas. Dentro da classe I, ainda há outra subdivisão: Ia e Ib. A subclasse Ia inclui peptídeos longos, flexíveis e com carga positiva, que causam a destruição dos micro-organismos sensíveis pela ligação e formação de poros na membrana citoplasmática. A subclasse Ib é composta por peptídeos globulares, mais rígidos, que apresentam ou não carga negativa, e atuam nos micro-organismos sensíveis interferindo em suas reações enzimáticas (DEEGAN et al., 2006). O principal representante da classe I é a nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, sendo composta por 34 aminoácidos. A molécula de nisina apresenta caráter ácido, o que explica a sua completa estabilidade em pH 2,0, podendo ser estocada durante longos períodos a temperaturas de 2 a 7°C (GÁLVEZ et al., 2007). No entanto, a nisina é inativada em pH superior a 7, inclusive em temperatura ambiente.

Na classe II estão incluídos pequenos peptídeos antimicrobianos não modificados (<10 kDa), termoestáveis e que não apresentam resíduos de lantionina

(COTTER et al., 2005; NES; JOHNSBORG, 2004). Geralmente apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua interação na membrana citoplasmática da célula (DRIDER et al. 2006). Esta classe é subdividida em IIa (pediocina e enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B)(CINTAS et al., 2001; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; GÁLVEZ et al, 2007).

Na subclasse IIa estão os peptídeos ativos contra *Listeria* spp., que são conhecidos como *pediocin-like* (similares a pediocina)(RENYE et al., 2009; KLAN; FLINT; YU, 2010). Os representantes desta classe possuem entre 37 e 48 aminoácidos, com uma porção N-terminal com configuração de folha pregueada e com uma porção C-terminal, contendo uma ou duas α -hélices (FIMLAND et al., 2005). As bacteriocinas desta classe se inserem na membrana celular do micro-organismo alvo pela porção C-terminal, promovendo a formação de poros e consequente dissipação da força próton motriz, causando uma aceleração no consumo de ATP e posterior morte celular (KAISER; MONTVILLE, 1996), conforme pode ser observado na Figura 1.

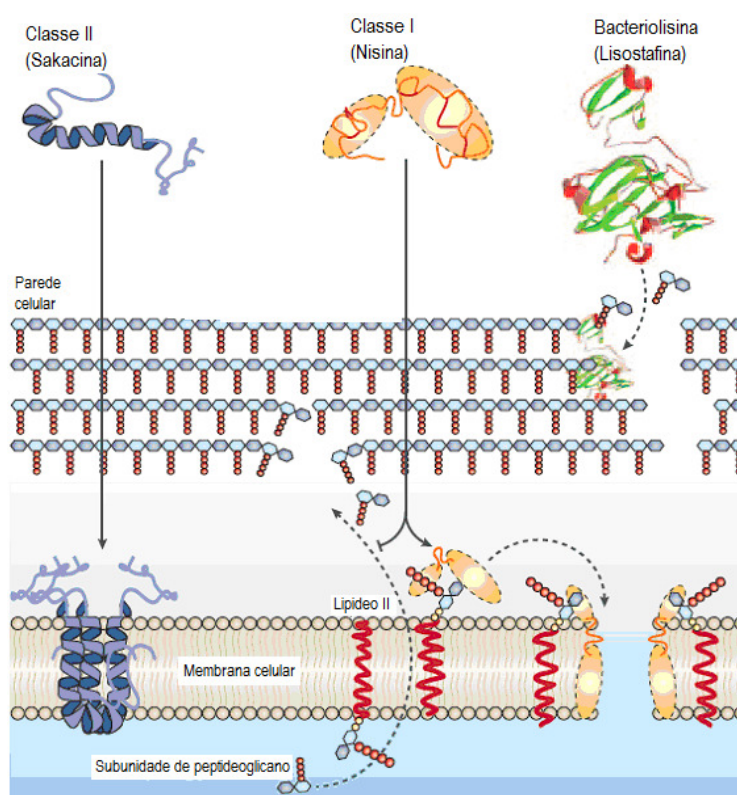


Figura 1- Mecanismo de ação das bacteriocinas classe I, classe II e bacteriolisina em células bacterianas Gram-positivas.

Fonte: Cotter et al, 2005.

A pediocina AcH é composta por 44 aminoácidos sendo a única bacteriocina da classe IIa sintetizada por diferentes espécies bacterianas, assim como por diferentes gêneros de BAL (GÁLVEZ et al., 2007). Inicialmente foi relatada a produção de pediocina por *Pediococcus acidilactici* PA 1,0 (MONTVILLE; KAISER, 1993). Atualmente se sabe que BAL dos gêneros *Leuconostoc* (OGIER; SERROR, 2008) e *Lactobacillus* (TODOROV et al., 2010) podem produzir pediocina. A maioria das enterocinas produzidas por *Enterococcus* spp. pertence a esta classe (CINTAS et al., 2001).

Na subclasse IIb estão as bacteriocinas que possuem dois peptídeos que agem sinergicamente, mesmo sendo diferentes. Seu mecanismo de ação também envolve a dissipação do potencial da membrana e diminuição da concentração intracelular de ATP (DEEGAN et al., 2006; PARADA et al., 2007).

Na classe IIc estão incluídos os peptídeos que requerem a presença de resíduos de cisteína na forma reduzida para que apresentem atividade biológica (DEEGAN et al., 2006; PARADA et al., 2007).

A classe III é constituída por grandes peptídeos de peso molecular superior a 30 kDa, termolábeis. São também denominadas bacteriolisinas, pois apresentam em sua estrutura molecular regiões específicas com diferentes funções para translocação, receptores de ligação e atividade letal (COTTER et al., 2005). Seu mecanismo de ação difere das demais bacteriocinas, promovendo a lise celular da parede da célula alvo (NASCIMENTO et al., 2009).

3.4 Enterococos e Bacteriocinas

Os enterococos são bactérias anaeróbicas facultativas, Gram-positivas, catalase negativas, não esporuladas, que habitam geralmente o trato intestinal dos seres humanos e de animais, além de serem isoladas do meio ambiente e de alimentos (GIRAFFA, 2002).

O gênero *Enterococcus* é formado por mais de 32 espécies (KLEIN, 2003). As mais frequentemente isoladas em produtos lácteos são: *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans*, podendo ser encontrados, com menor frequência, *E. hirae* e *E. casseliflavus* (FRANZ et al., 1999; GOMES et al., 2008).

De acordo com Franz et al. (2007), os enterococos podem crescer em ambientes hostis, com pH variando entre 4,5 e 10, concentração de até 6,5% de

NaCl, 40% de sais biliares, temperaturas entre 5 e 65°C, podendo permanecer ativos a 60°C por 30min, o que lhe traz vantagens competitivas em relação a outros micro-organismos.

Na Europa, os enterococos têm sido descritos ao longo da história como responsáveis pela fermentação de vários tipos de queijos artesanais (GIRAFFA, 2002), no entanto, alguns autores os descrevem como culturas potencialmente patogênicas (ORGIER; SERROR, 2008; KHAN et al., 2010).

As principais enfermidades relatadas envolvendo os enterococos são as infecções nosocomiais, incluindo endocardite, bacteremia e infecções do trato urinário em humanos e animais (KAYSER, 2003). Estas infecções enterocócicas são causadas predominantemente por *E. faecalis* e *E. faecium*, de origem clínica, os quais são responsáveis por 80% e 20% dos casos, respectivamente (REYNOLDS et al., 2004; COQUE et al., 2005). Alguns autores (SUJATA et al., 2000; BIDERNABACH et al., 2004; COQUE et al., 2005; TREITMAN et al., 2005) descrevem o aumento na frequência de infecções causadas por *E. faecium*, relatando que este está relacionado a maior resistência dos isolados aos antimicrobianos utilizados na clínica médica.

Já Ogier e Serror (2008), ressaltam que os isolados patogênicos de *Enterococcus* spp. são inócuos em indivíduos saudáveis, sendo virulentos em pacientes das Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) e em pacientes com doenças subjacentes severas ou com imunodeficiências.

Por outro lado, as indústrias de alimentos têm demonstrado interesse por *Enterococcus* spp. tendo em vista que várias espécies têm capacidade de produzir substâncias antagonistas capazes de controlar ou inibir o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos em alimentos (CAMPOS et al., 2006; FRANZ et al., 2007). Dentre as substâncias antimicrobianas produzidas, destacam-se as enterocinas.

As enterocinas pertencem à classe II, sendo pequenos peptídeos, catiônicos, hidrofóbicos, termoestáveis e com atividade contra uma ampla variedade de micro-organismos (STROMPFOVA et al., 2006; BELLEI et al., 2011; ANNAMALAI et al., 2009). Como por exemplo, os micro-organismos Gram-positivos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* (CAMPOS et al., 2006; FRANZ et al., 2007) e Gram-negativos como *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella dysenteriae* (LINE et al., 2008; ANNAMALAI et al., 2009; ACUÑA et al., 2012).

A produção das enterocinas ocorre no início da fase log de multiplicação bacteriana tendo, como ideais, pH 6,0 e temperatura de 30 a 35 °C (ANNAMALAI et al., 2009).

Dentre as espécies do gênero *Enterococcus* capazes de produzir enterocinas, destacam-se *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. gallinarum*. *E. faecium* é capaz de produzir as enterocinas A, B, P, L50, E86 e AS48 (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; KLAN; FLINT; YU, 2010).

A enterocina A consiste de 47 aminoácidos, com peso molecular de 4,8 kDa, pertencendo às bacteriocinas da classe IIa. A enterocina A possui atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (KLAN; FLINT; YU, 2010).

As enterocinas A e B podem ser produzidas simultaneamente por cepas de *E. faecium*. A enterocina B pertence a classe IIa, possui 53 aminoácidos, peso molecular de 5,5 kDa e (FRANZ et al., 2007). Apresenta um peptídeo sinal, entretanto, não possui em seu *operon*, genes relacionados ao seu transporte para o exterior da célula, portanto, supõe-se que seja excretada pelas mesmas proteínas transportadoras da enterocina A. Assim como algumas enterocinas, a enterocina B possui um amplo espectro de ação, atuando contra *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., além de *S. aureus*, *C. perfringens* e *L. monocytogenes* (FRANZ et al., 2007).

A enterocina P é produzida por algumas cepas de *E. faecium* e tem atividade antimicrobiana contra *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., além de *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* (FRANZ et al., 2007; CINTAS et al., 1997). Pertence a classe IIa, sendo constituída por 44 aminoácidos e tendo peso molecular de 4,5kDa. O gene responsável pela produção desta bacteriocina está localizado no cromossomo da bactéria (HERRANZ et al. 1999).

Enterocina L50 é uma bacteriocina codificada por um plasmídeo de 50Kb presente em algumas cepas de *E. faecium*. Esta bacteriocina é constituída por dois peptídeos, denominados L50A e L50B, com 44 e 43 aminoácidos, respectivamente, e apresenta peso molecular de 5,2KDa. Está agrupada na classe IIb e apresenta atividade antimicrobiana contra *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus pentosaceus*, além de bactérias patogênicas como *B. cereus* e *L. monocytogenes* (CINTAS et al., 1998; KLAN; FLINT; YU, 2010).

Pesquisas recentes (RENYE et al., 2009; ÖZDEMİR et al., 2011) revelam que *E. avium* e *E. durans* podem produzir as enterocinas A, B, P e L50A/B, que são comumente produzidas por *E. faecium* e *E. faecalis*.

3.5 Enterococos e sua utilização em alimentos

Na Europa, os enterococos são muito utilizados na produção de alimentos fermentados, conferindo características sensoriais únicas de sabor e aroma. Alguns autores (FRANZ et al., 1999; GIRAFFA, 2003; FOULQUIE-MORENO et al., 2006, NASCIMENTO et al., 2009) também relatam a influência positiva desses micro-organismos no desenvolvimento da maturação dos queijos, em decorrência da lise celular das culturas, promovendo a liberação de aminopeptidases intracelulares na matriz do queijo, contribuindo com a proteólise.

Nos alimentos, os enterococos também podem ser utilizados como culturas protetoras, pois produzem várias substâncias antagonistas, em especial as enterocinas, que agem no controle ou na inibição do desenvolvimento de diversos micro-organismos patogênicos relevantes para a segurança dos alimentos, bem como em micro-organismos deteriorantes (GIRAFFA et al., 2002; FRANZ et al., 2003). As formas de utilização mais frequentes das culturas protetoras em alimentos fermentados são através da substituição da cultura iniciadora por uma cultura de enterococos bacteriocinogênica ou da sua adição como cultura coadjuvante (ANNAMALAI et al., 2009, BELLEI et al., 2011).

Achemchem et al. (2006) adicionaram *E. faecium* F58 como cultura iniciadora, juntamente com a cultura patogênica de *L. monocytogenes*, na elaboração de um queijo fresco, observando redução entre 1 e 4 log UFC.g⁻¹ da concentração inicial de *L. monocytogenes*. Os mesmos autores verificaram que houve eliminação do patógeno quando os queijos foram elaborados com a cultura iniciadora e, após 12 horas, foi adicionada a cultura patogênica.

A nisina, produzida por *L. lactis*, é a única bacteriocina liberada para ser utilizada comercialmente, sendo considerada segura e não tóxica, que tem sido utilizada na forma purificada pelas indústrias de alimentos em vários países (NASCIMENTO et al., 2009).

No entanto, estudos toxicológicos têm demonstrado que as pediocinas, pertencentes a classe II das bacteriocinas, não apresentam reações adversas,

quando injetadas por via subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa em camundongos e coelhos (DEEGAN et al., 2006). Pesquisadores, em diversos países, comprovaram seu potencial como um conservante alimentício, sendo eficiente no controle da multiplicação de *L. monocytogenes* em leite *in natura* e derivados (CHEN, 2003; DEEGAN et al., 2006). Como as enterocinas pertencem a mesma classe das pediocinas, há grandes possibilidades de que as enterocinas apresentem o mesmo comportamento toxicológico, o que facilitará o seu licenciamento após a aprovação do uso das pediocinas na forma purificada pelos órgãos regulamentadores.

No trabalho realizado por Grande et al. (2006), é relatado que a aplicação de $0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$ da enterocina AS-48 em suco de maçã fresco foi suficiente para inibir o desenvolvimento de *Bacillus licheniformis*. Já Bellei et al. (2011) concluíram que a enterocina E86 pode ser utilizada como conservante natural em vegetais minimamente processados.

De acordo com a literatura, a atividade antimicrobiana das bacteriocinas é aumentada quando estas são utilizadas em conjunto com outra bacteriocina ou quando em associação com outros métodos de conservação. Sobrino-Lopez et al. (2009) observaram que a enterocina AS48 adicionada ao leite em conjunto com nisina e tratamento por pulso elétrico de alta intensidade, permitiu a redução de 6 log de *S. aureus*. Viedma et al. (2009) avaliaram o uso da enterocina AS48 em conjunto com tratamento por pulso elétrico de alta intensidade em suco de maçã e verificaram que essa interação permitiu o controle da bactéria deteriorante *Lactobacillus diolivorans*.

As enterocinas A e B quando incorporadas em filmes biodegradáveis demonstraram ser eficientes no controle de *L. monocytogenes* (KHAN et al., 2010). Marcos et al. (2007), por exemplo, adicionaram 2000 UI cm^{-2} das enterocinas A e B na embalagem de presunto cozido, e demonstraram que essas enterocinas foram eficientes na inibição desse patógeno durante 15 dias de estocagem sob refrigeração.

3.6 Capacidade probiótica de enterococos

Os probióticos, conforme definição da Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 2001) são micro-organismos vivos que, quando administrados em

quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro. As principais ações benéficas das culturas probióticas incluem o equilíbrio da microbiota intestinal, o aumento da resposta imune e o controle do colesterol (TESHIMA, 2003). Para obter estes benefícios, as culturas probióticas são adicionadas em alimentos, sendo os produtos lácteos os principais alimentos em que esses micro-organismos são utilizados.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008), estabelece que a quantidade mínima viável da cultura microbiana deve estar entre 10^8 a 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por porção (g ou mL) do produto, para que este seja considerado probiótico.

Os principais gêneros utilizados como culturas probióticas na elaboração de alimentos funcionais são *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Entretanto, na literatura têm sido descritos outros gêneros como *Enterococcus* (FRANTZ et al., 1999) e *Escherichia* (KRUIS et al., 2004; HENKER et al., 2007 e UKENA et al., 2007).

E. faecium foi reconhecido no Brasil como micro-organismo probiótico e o seu uso foi licenciado pela ANVISA (2008). Já no Canadá, em 2004, seu uso foi proibido como cultura probiótica (OGIER; SERROR, 2008). No entanto, na Dinamarca, um leite fermentado probiótico é comercializado contendo *E. faecium* (TAMIME, 2002). Nos EUA, uma cultura probiótica é comercializada com o nome de Causido®, que consiste na combinação das culturas de *S. thermophilus* e *E. faecium* (GIRAFFA et al. 2003).

Apesar do potencial dos enterococos como culturas probióticas, sua utilização deve ser feita com cautela. Novos isolados devem ser avaliados quanto a habilidade de transferir genes de resistência a antibióticos, sua capacidade hemolítica, a presença de gelatinases, a resistência a sais biliares, ao pH e sensibilidade a lisozima, antes da sua utilização como cultura probiótica (OGIER; SERROR, 2008).

3.7 Resistência a antimicrobianos e fatores de virulência dos enterococos

Por muito tempo os enterococos foram considerados micro-organismos comensais. Atualmente, têm sido referenciados como importantes patógenos clínicos, responsáveis por infecções urinárias e por bacteremia (MURRAY; WEINSTOCK, 1999).

De acordo com Cintas et al. (2001) o aumento do risco associado a bactérias do gênero *Enterococcus* pode estar relacionado com o uso indiscriminado de antimicrobianos, já que apresentam alta capacidade de adquirir genes de resistência a antibióticos de uso clínico.

Há divergência nos diversos estudos sobre a resistência de *Enterococcus* spp. a antimicrobianos. De acordo com a literatura, a resistência parece depender da região geográfica onde foi isolado o micro-organismo e do próprio isolado. Kayser (2003) descreve que os enterococos são intrinsecamente resistentes a penicilinas semi-sintéticas e as cefalosporinas, possuindo a capacidade de adquirir genes de resistência, através de plasmídeos e transposons, a antibióticos como cloranfenicol, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e vancomicina.

Já Teuber et al. (1999) descrevem que poucos enterococos isolados de alimentos são resistentes aos antibióticos clínicos de importância, como a ampicilina, penicilina, gentamicina e vancomicina.

Vale ressaltar que para a utilização de enterococos como culturas iniciadoras ou como cultura coadjuvante é importante, como critério de segurança, a verificação da ausência da capacidade de transferir resistência a antibióticos (FRANZ et al., 2001; VANCANNEYT et al., 2002; DE VUYST et al., 2003).

Entretanto, a patogenicidade desses micro-organismos não pode ser explicada apenas pelo perfil de resistência aos antimicrobianos, devendo-se levar em consideração, também, outros fatores de virulência. Os principais fatores de virulência conhecidos associados a *Enterococcus* spp. são: aderência a tecidos, invasão e formação de abscessos, modulação da resposta imune e secreção de toxinas. Vários dos genes responsáveis por esses fatores de virulência já foram identificados e seus efeitos comprovados em cultivos celulares e modelos animais (EATON; GASSON, 2001).

Alguns genes identificados como fatores de virulência, são, o *esp* (codifica proteínas de superfície), *Agg* (codifica substâncias agregativas), *efaAfm* e *efaAfs* (codificam adesinas de superfície de *E. faecium* e *E. faecalis*, respectivamente), *gelE* (codifica a enzima gelatinase) e *cyl* (codifica citolisinas) (EATON; GASSON, 2001; FRANZ et al., 2001; MANNU et al., 2003; SEMEDO et al., 2003; VALENZUELA et al., 2009).

Um importante fator de virulência é a β -hemolisina, uma enzima que é capaz de lisar eritrócitos humanos e de animais como equinos e coelhos (EATON; GASSON, 2001). Cepas com este perfil podem produzir também um peptídeo antimicrobiano chamado citolisina. A citolisina é uma toxina bacteriana codificada em um *operon* que apresenta 8 genes, que pode estar localizado em um plasmídeo ou no cromossomo bacteriano (EATON; GASSON, 2001; OGIER; SERROR, 2008). Esta enzima apresenta atividade hemolítica e bactericida contra células eucarióticas e procarióticas, respectivamente, além de causar β -hemólise em certos enterócitos (MUNDY et al., 2000). De acordo com Abriouel et al. (2008) nenhum isolado de *E. faecalis* e *E. faecium* proveniente de alimentos vegetais, água e solo apresentou atividade β -hemolítica.

Outro fator de virulência é a produção de adesina (Agg), uma substância de agregação, contribui para a formação de agregados celulares, facilitando a troca de material genético entre células bacterianas (FRANZ et al., 2001a). Em células humanas a Agg parece mediar ligações específicas de enterococos ao epitélio intestinal, a células epiteliais renais, a neutrófilos e a macrófagos (MUNDY et al., 2000).

A proteína Esp parece estar envolvida no processo de adesão célula-célula. Acredita-se que ela contribui no processo de adesão as células eucarióticas e na evasão da resposta imune (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006). O gene *esp*, que codifica a proteína Esp, apresenta uma elevada frequência em isolados de *E. faecium* de origem clínica e é ausente em isolados não epidêmicos (WILLEMS et al., 2001).

A gelatinase (GelE) é uma protease responsável pela hidrólise de gelatina, colágeno, hemoglobina e outros peptídeos bioativos (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006). Alguns pesquisadores relacionam a produção dessa enzima com a indução de processos inflamatórios (COQUE et al., 2005). De acordo com Fisher et al. (2009) a principal função da gelatinase na patogênese enterocócica é o fornecimento de nutrientes para as bactérias a partir da degradação do tecido do hospedeiro.

Estudos demonstram que a presença de gelatinase não ocorre somente em isolados de enterococos de origem clínica, podendo estar presente naqueles de origem alimentar. Abriouel et al. (2008) demonstraram uma frequência de 76,5% do gene *gelE* entre isolados de *E. faecalis* provenientes de amostras de origem alimentar. Já para Gomes et al. (2008) e Foulquié–Moreno et al. (2006) nenhum

isolado de *E. faecium* proveniente de alimentos apresentou gelatinase. Salienta-se que a frequência de culturas produtoras de gelatinase é maior em *E. faecalis* do que em *E. faecium* (EATON; GASSON, 2001; FRANZ et al., 2001; SEMEDO et al., 2003; BARBOSA et al., 2010).

A proteína EfaA, antígeno A de *E. faecalis*, possui entre 55 e 60% de homologia com um grupo de proteínas de estreptococos, conhecidas como adesinas, e parece funcionar como uma adesina em endocardites (KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004). Outra proteína, que também pode estar relacionada com o aumento da patogenicidade de *E. faecalis* é a adesina de colágeno (Ace), codificada pelo gene *ace*. Esta proteína é semelhante estruturalmente a adesina de colágeno (Cna) de *S. aureus*, sendo capaz de mediar a ligação da bactéria a matriz extracelular, colágenos tipo I e IV e laminina, podendo auxiliar na patogenicidade em endocardites (NALLAPAREDY et al., 2000).

A presença de tais fatores de virulência e a aquisição de genes de resistência a antibióticos pode indicar a associação destes micro-organismos com infecções em humanos (GIRAFFA, 2002). A classificação taxonômica do gênero *Enterococcus* não permite distinção entre isolados patogênicos e não-patogênicos, pois as diferenças entre ambos não são evidentes e o potencial para aquisição de genes de virulência não é bem elucidado (EATON; GASSON, 2001).

No entanto, Khan et al. (2010) avaliaram isolados de enterococos de várias fontes e testaram os seus fatores de virulência, verificando que os isolados de amostras clínicas apresentam maior frequência de fatores de virulência, seguidos de isolados provenientes de animais e de alimentos. Já Mannu et al. (2003) compararam a ocorrência de fatores de virulência e de resistência a antibióticos de *E. faecium* isolados de produtos lácteos, animais e clínicos, e observaram resultados semelhantes entre os isolados.

De acordo com De Vuyst et al. (2003) isolados de *Enterococcus* spp. que não apresentam atividade hemolítica e não carregam genes da citolisina e da resistência a vancomicina podem ser considerados seguros e utilizados como culturas iniciadoras, culturas coadjuvantes ou probióticas.

3.8 Isolamento e identificação de BAL bacteriocinogênicas

Para o isolamento de BAL são utilizados os ágaros de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e M17 (DAL BELLO et al., 2010). Estes meios são seletivos, favorecendo o desenvolvimento de BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, considerados de grande importância em tecnologia de alimentos.

A seleção inicial dos isolados de BAL é baseada nas características morfológicas, composição da parede celular e na capacidade de produção de catalase. Para tal, bactérias Gram-positivas, na forma de cocos, coco-bacilos ou bacilos, e catase negativas, são submetidas à verificação da capacidade bacteriocinogênica (JONES et al., 2008).

Para a triagem de culturas bacteriocinogênicas a técnica *spot-on-the-lawn* é simples e rápida, podendo ser realizada simultaneamente em um grande número de culturas, bem como permite a variação de condições de incubação e de meios de cultura (FLEMING et al., 1975; LEWUS et al., 1991 e MORAES et al., 2010). Essa técnica consiste na inoculação da cultura de BAL em um ponto sobre o meio de cultura (uma gota) e, após, adiciona-se uma sobrecamada de meio contendo o micro-organismo indicador. A presença de substância antagonista é verificada com a formação de halo de inibição ao redor da cultura da BAL. Para a detecção de atividade antagonista por bacteriocina, é necessário excluir a possibilidade de que a inibição ocorra pela produção de ácidos orgânicos e de peróxido de hidrogênio. A produção de ácidos pode ser minimizada pela utilização de meios de cultura com baixo teor de açúcares, como o Infusion-Heart-Brain (BHI) e MRS modificado (mMRS) (DE MARTINIS et al., 2001; MORAES et al., 2010). Uma forma muito utilizada para inibir a produção de peróxidos, substância produzida na presença de oxigênio, é a incubação das culturas em anaerobiose (LEWUS et al., 1991; DE MARTINIS et al., 2001; MORAES et al., 2010), ou a adição de uma solução de catalase ao meio de cultura, uma enzima capaz de hidrolisar o peróxido de hidrogênio produzido pelas BAL (MORENO et al., 1999; MORAES et al., 2010). Além de confirmar a atividade antagonista, são necessários testes para confirmação da natureza protéica da substância antimicrobiana produzida, o que é realizado através de sua sensibilidade a enzimas proteolíticas. Quando as substâncias antimicrobianas produzidas apresentam sensibilidade a alguma protease, a natureza

protéica é confirmada e essas substâncias podem ser classificadas como bacteriocinas (MORAES et.al., 2010).

Para a identificação do gênero e da espécie de BAL são frequentemente utilizados métodos bioquímicos, os quais são baseados na utilização de carboidratos e outros substratos pelos micro-organismos. Dentre estes, o Vitek®2 (BioMerieux, France) é um sistema automatizado (Figura 2), desenvolvido para identificação de isolados clínicos, com a grande vantagem de que em menos de oito horas pode-se obter o resultado. Apesar de ser desenvolvido para isolados clínicos, este sistema foi utilizado na identificação de BAL isoladas de iogurte. (AKPINAR et al., 2011).

A identificação pelo Vitek®2 é feita através da inoculação das BAL em cartões (Figura 3) com uma série de 43 testes bioquímicos que avaliam a utilização da fonte de carbono e as atividades enzimáticas.



Figura 2 - Equipamento Vitek® 2 (BioMerieux, France)
Fonte: Catálogo (BioMerieux, France)



Figura 3 - Foto do rack com cartões Vitek®2 para identificação de micro-organismos Gram-positivos .

Dentre as BAL, o gênero *Enterococcus* é o que causa mais controvérsia, tanto para identificação quanto para classificação das suas espécies, devido ao grande número de espécies estreitamente relacionadas entre si (GIRAFFA, 2002 e FOULQUIÉ–MORENO et al., 2006). Desta forma, a utilização de técnicas moleculares, que apresentam alto poder discriminatório e reprodutibilidade é uma ótima alternativa para sua correta identificação.

A PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma técnica molecular muito utilizada, que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, usando dois iniciadores (*primers*) que hibridizam com fitas complementares do DNA, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Nesse processo o DNA é desnaturado (94-96°C), os *primers* são hibridizados (30-60°C) e, posteriormente, a síntese de

DNA é feita pela DNA-polimerase, a partir de desoxiribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) adicionados a reação (72 °C). A repetição dessas etapas, por 20 a 30 ciclos, permite a amplificação de um segmento específico de DNA (ZAHA et al., 2001).

Na identificação do gênero *Enterococcus* spp. por PCR alguns autores (KE et al., 1999; Mannu et al., 2003) utilizaram *primers* para amplificação do gene *tuf*. De acordo com Ke et.al, (1999), o gene *tuf* codifica o fator de elongação EF-Tu que está envolvido na formação da cadeia peptídica e é componente essencial do genoma bacteriano.

Outra técnica molecular utilizada para identificação em nível de gênero e espécie das BAL, é o sequenciamento da região 16S do rRNA. De acordo com Mohania et al. (2008), esta região é conservada no genoma bacteriano, portanto, durante a evolução, não foi afetada pela pressão ambiental, mas, ao mesmo tempo, apresenta variabilidade e quantidade de informações suficientes para revelar as relações filogenéticas entre espécies (WOESE, 1987; WEISBURG et al., 1991). No entanto, Naser et al. (2005), avaliaram o sequenciamento de dois genes (*rpoA* e *pheS*) para diferenciação e identificação de espécies de *Enterococcus* spp. O gene (*rpoA*) codifica uma subunidade da polimerase do RNA bacteriano e o gene (*pheS*) codifica uma subunidade da síntese da fenilalanina-tRNA. O sequenciamento desses dois genes (*rpoA* e *pheS*) mostrou-se mais discriminatório para a identificação entre as espécies de enterococos do que o sequenciamento da região 16S rRNA. Além disto, de acordo com Carvalho et al., (2004), Naser et al. (2005) e Sevec et al. (2005), o gene *pheS* é eficiente para a identificação de novas espécies de enterococos como *Enterococcus* CDC PNS-E2, *Enterococcus* CDC PNS-E3 e *Enterococcus aquimarinus* sp.

A diversidade genética de isolados de uma microbiota pode ser avaliada através da técnica molecular Rep-PCR. Essa técnica é baseada no uso de *primers* específicos para amplificação de elementos com sequências repetitivas extragênicas palindrômicas REP ("Repetitive Extragenic Palindromic") de 35-40pb, de sequências consenso intergênica repetitivas enterobacterianas ERIC ("Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus") com 124-127pb e elemento BOX com 154pb (GEVERS; HEUYS; SWINGS, 2001). Estes elementos repetitivos são encontrados nas regiões intergênicas de muitos genomas bacterianos, como das BAL, considerados altamente conservados, facilitando a avaliação da relação intra e entre espécies bacterianas. Após a PCR, os fragmentos amplificados podem ser visualizados em

gel de agarose, produzindo um perfil molecular referido como perfil Rep-PCR (Lupski e Weinstock, 1992). Sevec et al.(2005) e Naser et al.(2005) utilizaram Rep-PCR para valiar os perfis de isolados de BAL.

4 Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido nos seguintes laboratórios: Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina/UDESC, Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência de Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas/UFPel, Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFPel e no Laboratório de Genômica do Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa/UFV.

4.1 Material

Dezoito amostras de leite *in natura*, provenientes do tanque de recepção de um laticínio localizado na região oeste do Estado de Santa Catarina, Brasil, foram coletadas no período de agosto de 2009 a maio de 2011.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* DY13 (Lyofast Dry DY13, prime pharma CC, Gordons Bay, África do Sul) e *Listeria monocytogenes* Scott A, mantidos sob refrigeração em tubos contendo ágar Triptona de Soja (TSA, Merck), foram utilizadas como controle positivo para a produção de bacteriocinas e como micro-organismo alvo, respectivamente. *Enterococcus faecium* FAIR-E178 e *Enterococcus faecium* BFE-1072 foram utilizados como controles positivos para a identificação por PCR das enterocinas A, B, P, e L50A/B, respectivamente.

4.2 Isolamento e contagem das BAL em leite *in natura*

As amostras de leite *in natura* foram homogeneizadas e submetidas à diluições decimais com água peptonada 0,1% (v/v) (Himedia). Alíquotas de 0,1mL das diluições apropriadas foram inoculadas em superfície, em duplicata, em placas contendo ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Merck) e em ágar M17 (Merck), ambas foram incubadas a 25°C e 35°C por 72h e 48h, respectivamente, sob aerobiose e anaerobiose. Esta variação de meio de cultura e condições de incubação foram utilizadas com o objetivo de isolar a maior diversidade de gêneros de BAL.

Após o período de incubação, os isolados que apresentaram crescimento nesses meios, sendo Gram-positivos e catalase negativa, foram repicados para

caldo MRS, incubados a 32°C por 24h e, após, armazenados em tubos tipo eppendorf contendo glicerol (20% v/v) e estocados a -20°C.

4.3 Verificação e identificação da atividade antagonista das BAL contra *Listeria monocytogenes*

A avaliação da atividade antagonista foi realizada utilizando-se a técnica *spot-on-the-lawn* (adaptada de FLEMING et al.,1975).

Os isolados de BAL e a cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Dy13 foram recuperados em caldo MRS e incubados a 25°C por 24 horas. Alíquotas de 2µL dessas culturas foram inoculadas em diferentes ágaros contendo 10mL por placa do ágar MRS, ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI/Merck) e ágar BHI adicionado de uma solução de catalase (Sigma), na concentração final de 100UI mL⁻¹, e incubadas a 35°C por 24h.

Listeria monocytogenes Scott A foi recuperada em caldo BHI a 35°C por 24h e diluída inicialmente em caldo BHI até atingir turbidez semelhante a escala 0,5 McFarland (3x10⁸UFC.mL⁻¹). Após, calculou-se o volume necessário da cultura para atingir a concentração de $\approx 10^5$ UFC mL⁻¹ no meio BHI semi-sólido a ser utilizado como sobrecamada. Adicionou-se a sobrecamada de 8mL de ágar BHI semi-sólido (0,8g.100mL⁻¹ de ágar Bacteriológico, Himedia) inoculada de $\approx 10^5$ UFC mL⁻¹ da cultura de *L. monocytogenes* Scott A em cada placa, e incubou-se a 35°C por 24h.

A presença de halos de inibição independente do tamanho ao redor do isolado de BAL em qualquer dos ágaros utilizados foi considerada presença de atividade antagonista. No ágar MRS a inibição poderia ser devido a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, enquanto que em ágar BHI, pela produção de peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Já no ágar BHI adicionado de catalase, suspeitava-se da produção de bacteriocinas.

Os tamanhos dos halos formados foram medidos através de paquímetro Digimess®, considerando-se a medida de inibição do crescimento, a diferença entre o diâmetro do halo de inibição menos o diâmetro do crescimento.

4.4 Confirmação da atividade bacteriocinogênica

Os isolados de BAL que apresentaram atividade anti-*Listeria* no ágar BHI adicionado de catalase foram submetidos a confirmação da natureza protéica do antagonismo, utilizando-se o método *spot-on-the-lawn* (FLEMING et al.,1975; HARRIS, DAESCHEL, STILES e KLAENHAMMER,1989).

Os isolados foram semeados em caldo MRS e incubados a 25°C por 24h, em aerobiose. Três alíquotas de 2µL de cada isolado foram semeadas, em duas placas contendo 10mL de ágar MRS modificado (0,5% de dextrose), e incubadas a 25°C por 24 horas, em anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil). Após incubação, foram feitos orifícios de 3mm de diâmetro no ágar a 0,5cm de distância de cada crescimento e adicionou-se 20µL de solução (20mg mL⁻¹) de duas enzimas em cada placa. Utilizou-se as enzimas pepsina (de mucosa de estômago de suíno), α-quimotripsina (de pâncreas de bovino), proteinase K (de *Tritirachium album*), e tripsina (de pâncreas bovino), todas da Sigma - Aldrich. Utilizou-se 20uL de água destilada esterilizada como controle negativo. Após 15min em temperatura ambiente, adicionou-se uma sobrecamada de 8mL de BHI semi-sólido (0,8% de ágar) contendo, aproximadamente, 10⁵ UFC mL⁻¹ de *L. monocytogenes* Scott A, e incubou-se a 35°C por 24h. A produção de bacteriocinas pelas BAL isoladas foi confirmada pela sensibilidade da substância produzida a uma ou mais enzimas testadas. Quando a substância é sensível as enzimas, ocorre o crescimento de *L. monocytogenes* onde a enzima foi aplicada, formando um halo em forma de meia lua em volta do isolado.

4.5 Identificação bioquímica e molecular de gêneros e espécies das BAL isoladas com atividade bacteriocinogênica

Os isolados de BAL nos quais foi confirmado que a atividade antagonista contra *L.monocytogenes* Scott A tinha natureza protéica, foram identificados em nível de gênero e de espécie, através de técnicas bioquímicas e moleculares. A identificação bioquímica foi realizada pelo sistema Vitek[®]2 (BioMerieux, France). A identificação molecular, foi feita, em nível de gênero, por PCR e, em nível de espécie, pelo sequenciamento parcial do gene *pheS*.

4.5.1 Identificação pelo sistema Vitek®2

Para a identificação das BAL pelo sistema Vitek®2 foram utilizados os cartões GP Test Kit VTK 2 (Gram-positivos) conforme instruções do fabricante no que diz respeito ao preparo do inóculo, incubação, leitura e interpretação dos resultados. Resumidamente, foram preparadas suspensões dos isolados de BAL com menos de 24h de crescimento em solução salina até, aproximadamente, a turbidez de 0,5 a 0,63 em densímetro Densicheck® (Biomérieux), o que equivale a 0,5 da escala MacFarland. Os cartões contêm 43 testes fluorométricos que incluem testes de mudança de pH e detecção de amilopeptidases e oxidasas. Além destes, os cartões incluem testes de fermentação, de descarboxilação e outros (urease, piruvato, optoquina, novobiocina, sulfato de polimixina B e NaCl 6%). Os cartões foram automaticamente inoculados por um sistema a vácuo e, após, inseridos no módulo de incubação e leitura, sendo submetidos a uma medida cinética fluorescente a cada 15 minutos. Os resultados (Anexo A) foram registrados por um sistema computadorizado sendo que, ao final da análise, emitiu um relatório dos 43 testes bioquímicos, e descrito o gênero e espécie do micro-organismo identificado, percentual de probabilidade na identificação, tempo de análise e, quando necessário, são sugeridas provas bioquímicas adicionais.

4.5.2 Identificação do gênero *Enterococcus* por PCR

4.5.2.1. Extração de DNA

Os isolados identificados pelo Vitek®2 como *E. faecium* e as cepas *E. faecium* FAIR-E 178 e *E. faecium* BFE1072 foram recuperados em caldo MRS e incubados a 35°C por 24h. Os DNAs foram extraídos conforme descrito pelo fabricante do kit Illustra™ bactéria genomic Pré Mini Spin (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Verificou-se a qualidade da extração do DNA através da mistura de DNA e corante GelRed 20 X (Biotium Inc., Hayward, USA) na proporção 5:1, que foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X, e visualizada sob luz UV em transiluminador (TFX 35M, Life Technologies, Gibco BRL®).

4.5.2.2 PCR

Para a identificação do gênero *Enterococcus* spp. foram utilizados os oligonucleotídeos Ent1 (5'TACTGACAAACCATTCATGAT3') e Ent2 (5'AACTTCGTCACCAACGCGAAC 3'), conforme descrito por Araújo (2008). Os *primers* foram avaliados quanto a especificidade utilizando-se o Blast – like Alignment Tool (Blast), através do software “*Basic Alignment Search Tool*” (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Os *primers* Ent1 e Ent2 amplificam um fragmento de 112pb do gene *tuf* presente no gênero *Enterococcus* spp.

Cada reação de 25µL foi constituída de 12,5µL de Kit para PCR “*Go Taq Green Master Mix 2x*” (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 1,0µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. As reações foram submetidas à amplificação em termociclador (PTC-100, MJ Research®) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94 °C por 5min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 seg, anelamento a 55 °C por 15 seg, extensão a 72 °C por 1min e extensão final a 72 °C por 10min. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/v) (Backer Analyzed), utilizando-se como marcador o Ladder 100pb (Invitrogen™), como controle positivo *E. faecium* FAIR-E 178 e, como controle negativo, todos os reagentes e água ultra-pura esterilizada em lugar do DNA. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹) e visualizado sob luz UV em transiluminador (TFX 35M, Life Technologies, Gibco BRL®).

4.5.2.3 Sequenciamento parcial do gene *pheS*

Os isolados identificados pelo Vitek®2 como *E. faecium* foram encaminhados ao sequenciamento. Primeiramente, foram submetidos à PCR para amplificação parcial do gene *pheS* utilizando os oligonucleotídeos *pheS*-21-F/*pheS*-22-R, descritos por Naser et al. (2005) (Tabela 1). Cada reação de 50µL de PCR foi constituída de 25µL de Kit para PCR “*Go Taq Green Master Mix 2x*” (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 2 µL de DNA (aproximadamente 200ng) e água ultra-pura (Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA) até completar o volume final. A reação foi conduzida em termociclador (Maxygene - THERM-1000, Axygen, Union City, USA) sob as seguintes condições: 5 min a 95 °C; 3 ciclos de 1

min a 95°C + 2 min 15 seg a 46°C + 1 min 15 seg a 72°C; 30 ciclos de 35 seg a 95°C + 1 min 15 seg a 46°C + 1 min 15 seg a 72°C; extensão final 7 min a 72°C. Os produtos da PCR foram adicionados ao corante GelRed 20 X (Biotium Inc.) na proporção 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X, e visualizados sob luz UV em transiluminador L.Pix Image HE (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil). Os produtos de PCR que apresentaram 455 pares de bases (pb) esperado foram submetidos a purificação utilizando o kit “*Wizard® SV Gel & PCR Clean-Up*” (Promega). Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciamento no Laboratório de Genômica/BIOAGRO (UFV, Viçosa, MG). As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados depositado no “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) por meio do software “*Basic Alignment Search Tool*” (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e posterior sequenciamento parcial do gene *pheS* (Naser et al., 2005) em isolados de *E. faecium* identificados pelo Vitek2®.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Posição
<i>pheS</i> -21-F	CAYCCNGCHCGYGAYATGC	557
<i>pheS</i> -22-R	CCWARVCCRAARGCAAARCC	1931

4.6. Identificação de genes das enterocinas A, B, P e L50A/B por PCR

Os isolados identificados bioquímica e molecularmente como *E. faecium*, foram submetidos a PCR para detecção dos genes das enterocinas A, P, B e L50A/B conforme descrito por Özdemir et al. (2011). Todos os *primers* utilizados na identificação das enterocinas foram avaliados quanto a especificidade utilizando o software “*Basic Alignment Search Tool*” (BLAST). Cada reação de 25µL foi constituída de 12,5µL de Kit para PCR “*Go Taq Green Master Mix 2x*” (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 1,0µL de DNA, e água ultra-pura até completar o volume final. As condições das reações foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 10min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 1min, extensão por 1min a 72°C e extensão final a 72°C por 10min. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 0,5 X

e, após, o gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e visualizado sob luz UV em transiluminador (TFX 35M). Todos os oligonucleotídeos utilizados, temperaturas de anelamento e tamanhos dos fragmentos obtidos estão descritos na Tabela 2, conforme Özdemir et al.(2011).

Tabela 2- Oligonucleotídeos e condições de PCR utilizadas para identificação de genes das enterocinas A, B, P e L50A/B em isolados de *E. faecium* de leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina.

Enterocinas	Gene	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento	Tamanho fragmento	Controles positivos
A	<i>entA</i>	GGTACCACTCATAGTGGAAA CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	55 °C	138pb	<i>Enterococcus faecium</i> FAIR-E178
B	<i>entB</i>	CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG AGAGTATACATTTGCTAACCC	55 °C	201pb	<i>E.faecium</i> FAIR-E178
P	<i>entP</i>	GCTACGCGTTCATATGGTAAT TCCTGCAATATTCTCTTTAGC	58 °C	87pb	<i>E.faecium</i> FAIR-E178
L50A/B	<i>entL50A/B</i>	ATGGGAGCAATCGCAAAATTA TAGCCATTTTCAATTTGATC	60 °C	274pb	<i>E.faecium</i> FAIR-E178

4.7. Identificação dos perfis genéticos dos enterococos por Rep-PCR

Os isolados identificados bioquímica e molecularmente como *E. faecium* foram submetidos a Rep-PCR utilizando apenas um oligonucleotídeo (GTG)₅, (5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTGGT-3') (GEVERS et al., 2001), conforme descrito por Dal Bello et al. (2010). Cada reação de 25 µL foi constituída de 12,5 µL de Kit para PCR "Go Taq Green Master Mix 2x" (Promega Corp.), 50 pMol de cada oligonucleotídeo, 2 µL de DNA (aproximadamente 200 ng) e água ultra-pura (Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA) até completar o volume final. A reação foi conduzida em termociclador (Maxygene - THERM-1000, Axygen, Union City, USA) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos (95 °C por 30 seg; 40 °C por 30 seg; 65 °C por 8 min), e extensão final a 65 °C por 16 min.

Aos produtos das reações foi adicionado o corante GelRed 20X e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/v) (Backer Analyzed), utilizando-se como marcador Ladder 1Kb (Sigma). Os perfis obtidos foram visualizados e a imagem capturada em Transiluminador L.Pix Image HE (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil).

Os padrões de bandas originados foram analisados através de software BioNumerics.

4.8 Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos e da atividade da β -hemolisina

Os isolados de *E. faecium* foram avaliados para dois marcadores de virulência: sensibilidade a antimicrobianos e atividade da enzima β -hemolisina .

4.8.1 Sensibilidade a antimicrobianos de uso clínico

A avaliação da sensibilidade a antimicrobianos foi realizada pelo método de difusão em ágar, utilizando-se o ágar Mueller-Hinton (MH / Merck), conforme descrito por Renye et al. (2009). Foram testados quatro diferentes antibióticos: ampicilina (10 μ g), penicilina G (10 μ g), vancomicina (30 μ g) e tetraciclina (30 μ g) (Laborclin/Brasil).

Os isolados foram repicados para caldo MRS, incubados a 35°C por 24h e, após, ajustou-se a concentração bacteriana com solução salina até 0,5 da escala de MacFarland (3.10⁸ UFC mL⁻¹). Inoculou-se 0,1mL das culturas na superfície do ágar MH e, após completa absorção do inóculo, adicionaram-se os discos de antibiótico. As placas de petri foram incubadas a 35°C por 24horas e, após esse período, mediram-se os diâmetros das zonas de inibição com auxílio de paquímetro Digimess®, os quais foram expressos em milímetros. Os resultados foram expressos como isolados resistente (R), sensibilidade intermediária (I) ou sensível (S), com base nos valores de referências indicados pela Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, (2005) (Tabela 3).

Tabela 3- Tamanho dos halos de inibição (mm) para classificação dos enterococos como Resistente (R), Intermediário (I) e Sensível (S) para os antimicrobianos Ampicilina (10ug), Penicilina (10ug), Vancomicina (30ug) e Tetraciclina (30ug).

Antimicrobiano	Halos de inibição (mm)		
	Resistente (R)	Intermediário (I)	Sensível (S)
Ampicilina 10ug	≤14	-	≥ 17
Penicilina 10ug	≤14	-	≥15
Vancomicina 30ug	≤14	15-16	≥ 17
Tetraciclina 30ug	≤14	15-18	≥19

4.8.2 Atividade da β -hemolisina

Os isolados de *E. faecium* foram incubados por 24 horas em caldo MRS e, após, foram semeados em placas de petri contendo ágar Tripticase de Soja (TSA, Merck) suplementado com 5% de sangue de cavalo, as quais foram incubadas a 37°C por 24-48h. Zonas claras ao redor da colônia indicavam a produção de β -hemólise (EATON e GASSON, 2001).

4.9 Análise estatística

As contagens das BAL em leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina obtidas nos meios MRS e M17, sob anaerobiose e aerobiose, nas temperaturas de 25°C e 35°C, bem como a comparação dos tamanhos dos halos de inibição produzidos pelos isolados de *E. faecium* produtores de enterocinas nos meios MRS, BHI e BHI + catalase, foram submetidos análise de variância seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o software ASSISTAT 7.6 beta (2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e contagem das BAL no leite *in natura*

As contagens de BAL variaram entre 3,2 e 7,46 log UFC mL⁻¹ de leite *in natura* produzido na região oeste de Santa Catarina. Resultados semelhantes foram observados por Franciosi et al. (2009), que encontraram contagens variando entre 3,7 e 6,8 log UFC mL⁻¹ de BAL em leite *in natura* produzido na Itália. Da mesma forma, Ortolani (2009), obteve contagens de BAL maiores que 3 log UFC mL⁻¹ em leite *in natura* proveniente do município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

As BAL foram isoladas nos ágaros MRS e M17, em condições de aerobiose e anaerobiose, e em temperaturas de 25 e 35 °C, para se obter maior diversidade de isolados com potencial bacteriocinogênico.

Pode-se verificar (Figura 4) que nos ágaros MRS e M17, em condições de aerobiose, as contagens de BAL variaram entre 3,20 e 6,8 log UFC mL⁻¹ e entre 4,3 e 7,46 log UFC mL⁻¹, respectivamente. A maior contagem de BAL foi encontrada na amostra 2, semeada no ágar M17. Já a menor contagem de BAL foi encontrada na amostra 15, no ágar MRS. Pode-se observar que as maiores contagens de BAL a 25 °C, em aerobiose, foram encontradas no ágar M17. No entanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos resultados das contagens das BAL nos dois ágaros utilizados (Tabela 4).

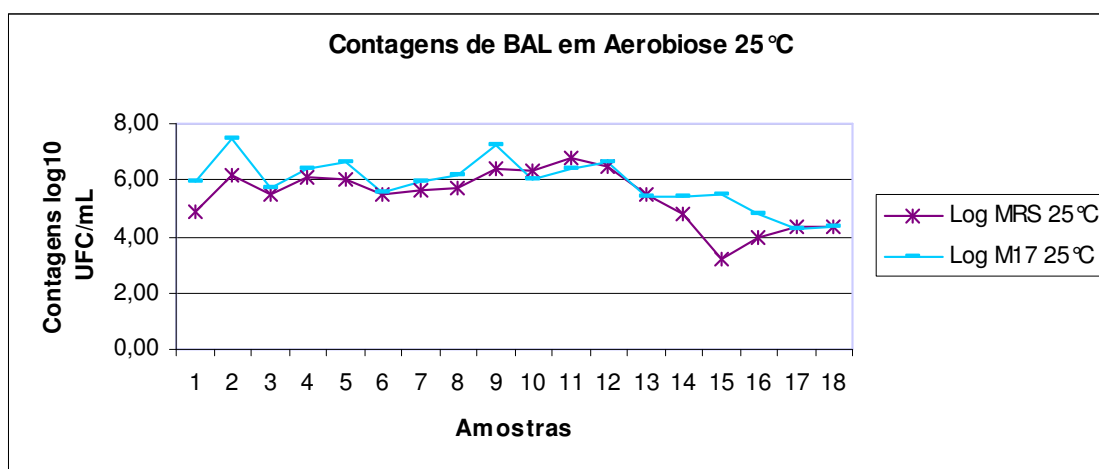


Figura 4- Contagens de bactérias ácido lácticas (log₁₀ UFC mL⁻¹) em 18 amostras de leite *in natura* nos ágaros MRS e M17, incubadas em aerobiose a 25 °C.

As contagens de BAL das amostras de leite *in natura* nos ágaros MRS e M17 incubadas em aerobiose a 35°C podem ser observadas na Figura 5. Pode-se verificar que nos ágaros MRS e M17 as contagens de BAL variaram entre 3,6 e 6,76 log UFC mL⁻¹ e entre 4,62 e 6,67 log UFC mL⁻¹, respectivamente. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os resultados das contagens de BAL nas amostras de leite *in natura* nos ágaros MRS e M17, incubadas a 35°C, sob aerobiose (Tabela 4).

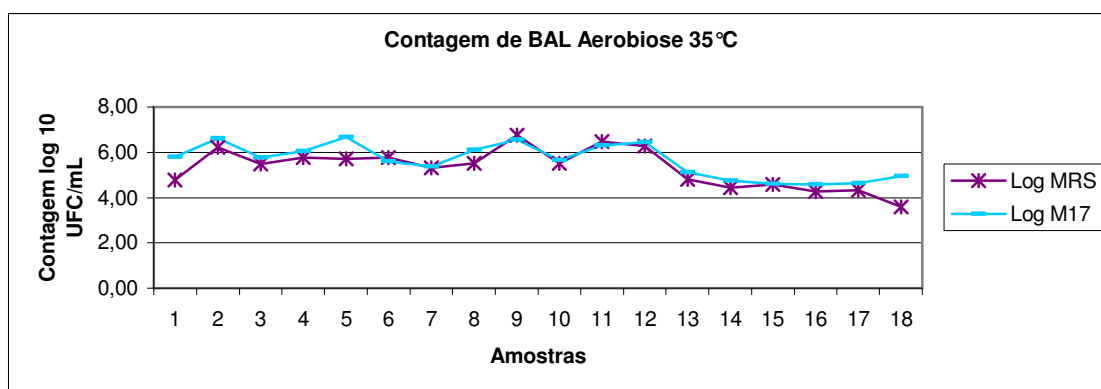


Figura 5 - Contagens de bactérias ácido lácticas (log₁₀ UFC mL⁻¹) em 18 amostras de leite *in natura* nos ágaros MRS e M17, incubadas em aerobiose a 35°C.

Na Figura 6, podem-se verificar os resultados das contagens de BAL nas amostras de leite *in natura* nos ágaros MRS e M17, incubadas sob anaerobiose a 25°C. As contagens variaram entre 4,26 e 6,69 log UFCmL⁻¹ no ágar MRS e entre 4,7 e 6,81 log UFC mL⁻¹, no ágar M17. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os resultados das contagens nos dois ágaros utilizados, quando incubados sob anaerobiose a 25°C (Tabela 4).

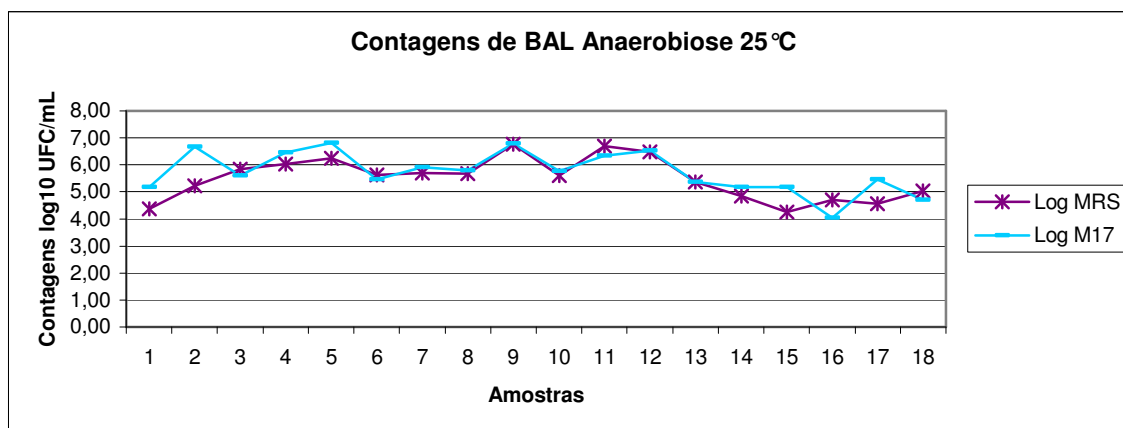


Figura 6 - Contagens de bactérias ácido lácticas (log₁₀ UFC mL⁻¹) em 18 amostras de leite *in natura* nos ágaros MRS e M17, incubadas em anaerobiose a 25°C.

Podem-se verificar, na Figura 7, os resultados das contagens das BAL no leite *in natura* nos ágaros MRS e M17, incubados sob anaerobiose a 35 °C. As contagens de BAL variaram entre 4,26 e 6,54 log UFC mL⁻¹ em MRS e entre 4,78 e 6,76 log UFC mL⁻¹, em M17. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os resultados nas contagens de BAL, nos dois ágaros de cultura incubados sob anaerobiose a 35 °C (Tabela 4).

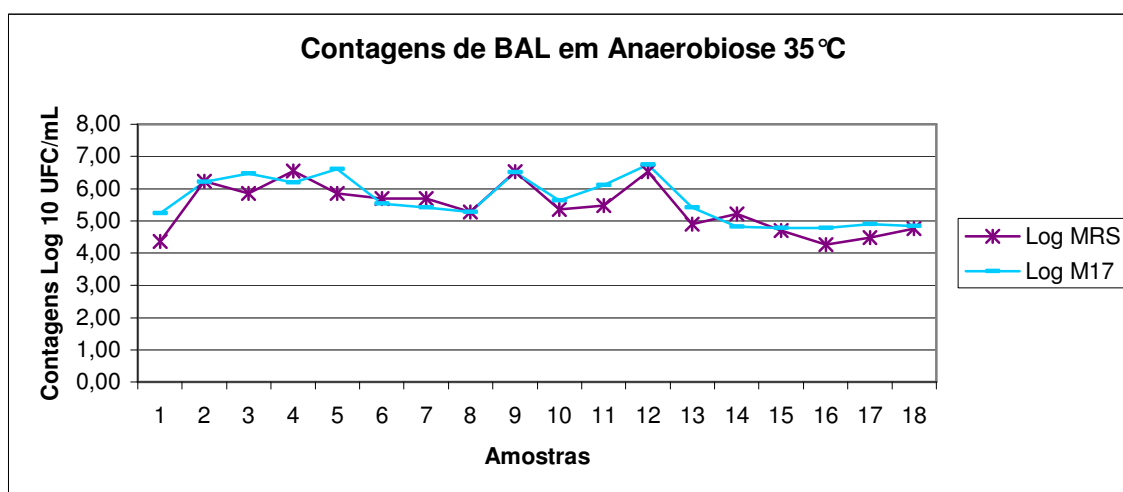


Figura 7 - Contagens de bactérias ácido lácticas (log₁₀ UFC mL⁻¹) em 18 amostras de leite *in natura* nos ágaros MRS e M17, incubadas em anaerobiose a 35 °C.

Tabela 4 - Médias das contagens de BAL (log₁₀ UFC mL⁻¹) em leite *in natura* incubado sob aerobiose e anaerobiose a 25 °C e 35 °C.

Condições	MRS ¹	M17 ²
Aerobiose 25 °C	5,42 ^{Aa} ± 0,98	5,88 ^{Aa} ± 0,88
Anaerobiose 25 °C	5,49 ^{Aa} ± 0,77	5,73 ^{Aa} ± 0,76
Aerobiose 35 °C	5,37 ^{Aa} ± 0,78	5,64 ^{Aa} ± 0,74
Anaerobiose 35 °C	5,42 ^{Aa} ± 0,75	5,63 ^{Aa} ± 0,70

1-Ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS); 2- Ágar M17; Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade; Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 4 pode-se observar que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os resultados das contagens das BAL incubadas a 25 °C e a 35 °C, sob aerobiose e anaerobiose, nos ágaros MRS e M17.

Neste estudo foram utilizados os ágaros MRS e M17, variando-se as condições de incubação: atmosfera (aerobiose/anaerobiose) e temperatura (25°C e 35°C). Essa variação das condições de incubação visava favorecer a obtenção de maior diversidade de gêneros de BAL bacteriocinogênicas, no entanto, houve o predomínio de isolados do gênero *Enterococcus* spp. como pode ser observado no item 5.4 deste estudo. Através deste resultado podemos evidenciar que os ágaros e as diferentes condições de incubação utilizadas no isolamento, não foram eficazes para o desenvolvimento de outros gêneros de BAL bacteriocinogênicas ou o leite *in natura* da região Oeste de Santa Catarina não apresenta outras BAL produtoras de bacteriocinas, além de *Enterococcus* spp.. Da mesma forma Acurcio (2011) isolou somente bactérias do gênero *Enterococcus* spp. em leite de ovelha, utilizando os ágaros MRS e M17, em aerobiose, na temperatura de 37°C e 32°C, respectivamente.

Após avaliação das colônias desenvolvidas nos ágaros através da coloração de Gram, e verificação da produção de catalase, foram obtidos 478 isolados de BAL, e estas foram submetidas a verificação da capacidade de produção de substâncias antagonistas contra *Listeria monocytogenes*.

5.2 Verificação e identificação da atividade antagonista das BAL contra *Listeria monocytogenes*

Dos 478 isolados de BAL, 307 (64%) apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. Resultados superiores foram obtidos por Ortolani (2009), onde 87% das BAL isoladas de leite *in natura* produziram substâncias antagonistas contra esse micro-organismo. Já Guerra e Bernardo (2001), observaram que de 531 isolados de BAL provenientes de queijos, 208 (39,2%) apresentaram atividade antagonista contra esse mesmo patógeno.

Pode-se verificar, na Tabela 5, que dos 307 isolados de BAL, 300 (98%) apresentaram atividade antagônica contra *L. monocytogenes* no ágar MRS. De acordo com Lewus e Montville (1991) e Moraes et al. (2010), esse meio favorece a produção de ácidos orgânicos. Como apresenta alta concentração de glicose e não possui substâncias inibidoras, não há como se definir qual a natureza da atividade antagonista, tendo em vista que pode ter ocorrido pela produção de ácidos orgânicos, de peróxido de hidrogênio e/ou de bacteriocinas.

Tabela 5 - Tamanho do halo de inibição (mm) de 307 isolados de BAL provenientes de leite *in natura*, contra *Listeria monocytogenes* Scott A nos meios de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), Brain-Heart Infusion (BHI) e BHI adicionado de catalase.

Halo de inibição (mm)	Meio de cultura		
	MRS (n)	BHI (n)	BHI + catalase (n)
< 5	76	72	58
6 - 10	112	14	15
11 - 14	68	4	4
15 - 18	18	5	1
> 19	26	0	0
Total	300 (98%)	95 (31%)	78 (25,4%)

Por outro lado, 31% dos isolados de BAL (95/307) apresentaram atividade antagonista contra *L. monocytogenes* em ágar BHI (Tabela 5). Como este meio possui pouca glicose, a produção de ácido é minimizada (MORAES et al., 2010), sugerindo que as substâncias que causaram inibição do micro-organismo indicador, poderão ser peróxido de hidrogênio e/ou bacteriocinas. Quando os isolados foram avaliados no ágar BHI adicionado de catalase, 78 (25,4%) apresentaram halos de inibição, sugerindo que a substância inibitória seja uma bacteriocina. Nesse meio, além da produção de ácido ter sido minimizada pela pouca quantidade de glicose, a catalase adicionada ao meio hidrolisa o peróxido de hidrogênio, podendo-se inferir que bacteriocinas sejam as responsáveis pelo efeito antagonista (MORAES et al., 2010).

A capacidade das BAL de produzirem mais de uma substância antagonista contra outros micro-organismos, é relatada por Oliveira et al. (2008) e por Topisirovic et al. (2008), o que também foi observado neste estudo.

Dos 307 isolados, 10% produziram halos de inibição nos ágar MRS e BHI, sugerindo que sua atividade antagonista se deve a produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (Tabela 5). Pode-se observar que 10% dos isolados apresentaram atividade antagonista nos ágar MRS e BHI adicionado de catalase, sugerindo a produção de ácidos orgânicos e de bacteriocinas (Tabela 5). Apenas um isolado (0,3%) produziu halos de inibição nos ágar BHI e BHI adicionado de catalase, indicando a produção de peróxido de hidrogênio e de bacteriocina. Além disso, 52 isolados (17%) produziram halos de inibição nos três meios de cultura utilizados, sugerindo que estes isolados têm a capacidade de produzir ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (Tabela 5). Destaca-se que a capacidade de um isolado de produzir outros compostos com ação antimicrobiana

associados à produção de bacteriocinas pode trazer vantagens competitivas a esse micro-organismo. De acordo com Drosinos et al. (2005), o valor de pH ótimo para a produção de bacteriocinas é 5,5, desta forma, os ácidos orgânicos produzidos pelas BAL, além de aumentarem a pressão seletiva, funcionariam como catalisadores para a produção e expressão desses compostos protéicos antimicrobianos.

5.3 Confirmação da atividade bacteriocinogênica

As bacteriocinas apresentam em sua estrutura peptídeos, portanto, sua comprovação pode ser realizada através da avaliação da sensibilidade do composto produzido pelo isolado, a uma ou mais proteases. Quando a bacteriocina apresenta sensibilidade a uma protease, ocorre inativação da substância, desta forma, a ausência de inibição do micro-organismo indicador na presença de proteases caracteriza que o composto produzido é uma bacteriocina (MONTVILLE e KAISER, 1993). De acordo com Arauz et al. (2009) há necessidade de se utilizar várias proteases para que se possa detectar a produção de bacteriocinas, tendo em vista que há diferença na sensibilidade à distintas proteases, de acordo com a bacteriocina produzida.

Os 78 isolados que apresentaram atividade anti-*Listeria* no ágar BHI adicionado de catalase, foram testados na presença das enzimas pepsina, α -quimotripsina, proteinase K e tripsina, dos quais, em 28 (36%) se confirmou que a substância antagônica tinha natureza protéica (Tabela 6).

Os 28 isolados demonstraram sensibilidade a, pelo menos, uma das enzimas proteolíticas testadas.

A sensibilidade a mais de uma enzima proteolítica sugere a produção simultânea de diferentes bacteriocinas (ARAUZ et al., 2009). No entanto, apenas avaliando-se o perfil de sensibilidade às proteases, não é possível determinar qual bacteriocina é produzida pelo isolado, tendo em vista que as diferentes bacteriocinas podem ser sensíveis a uma ou mais enzimas proteolíticas (ARAUZ et al., 2009).

Autores como Dal Bello et al. (2010), Vijayalashmi et al. (2009) e Paschoalin et al. (2011), também relataram atividade antimicrobiana de *Enterococcus* pela produção de enterocinas capazes de inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, além de inibir bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Salmonella Paratyphi*.

Levando-se em consideração todos os isolados de BAL obtidos neste estudo que apresentaram atividade antagonista contra *L. monocytogenes* (307), verifica-se que 28 (9%) produziam bacteriocinas. Diversos estudos têm sido realizados visando isolar BAL com atividade antagonista contra bactérias patogênicas de importância em alimentos, a partir de diferentes fontes. Entretanto, observa-se variação na frequência de isolados com atividade bacteriocinogênica, o que pode ser atribuída às diferenças intrínsecas das amostras, ao micro-organismo investigado, bem como ao micro-organismo utilizado como indicador na seleção inicial (DE MARTINS et al., 2001). Moreno et al. (1999) isolaram *L. lactis* em leite *in natura* e verificaram que 8,4% dos isolados produziram bacteriocinas. Da mesma forma Dal Bello (2010) isolou BAL de queijo e produtos cárneos, verificando que 9,8% (98/1000) dos isolados foram bacteriocinogênicos. Já Ortolani (2009), isolou BAL a partir de queijo e leite *in natura*, encontrando 14% dos isolados produtores de bacteriocinas. Por outro lado, vários pesquisadores (GUERRA e BERNARDO, 2001; TECHERA, 2005; POPPI et al., 2008 e FRANCIOSI et al., 2009) não identificaram bactérias ácido lácticas produtoras de bacteriocinas a partir de leite *in natura* e de queijo.

Tabela 6- Sensibilidade de 28 isolados de BAL as proteases (proteinase K, pepsina, α -quimotripsina, tripsina), identificação do gênero e espécie por Vitek®2, confirmação do gênero *Enterococcus* spp e identificação dos genes das enterocinas A, B, P e L50A/B por PCR.

Isolados	Sensibilidade as proteases				Identificação Vitek®2	Confirmação do gênero <i>Enterococcus</i> spp. por PCR	Identificação dos genes das enterocinas A, B, P e L50A/B por PCR
	Proteinase K	Pepsina	α -Quimotripsina	Tripsina			
5	+	-	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	P e L50A/B
13	+	+	-	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	A, P e L50A/B
16	+	+	+	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	*
19	-	-	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	L50A/B
30	+	+	-	-	<i>Enterococcus faecium</i>	+	A, P e L50A/B
43	+	-	+	-	<i>Enterococcus faecium</i>	+	A e P
57	-	-	+	-	<i>Enterococcus faecium</i>	+	A, B, P e L50A/B
69	+	-	-	+	<i>Enterococcus faecium</i>	-	*
74	+	-	-	+	NI	*	*
89	+	+	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	A e L50A/B
104	+	-	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	A, P e L50A/B
233	+	+	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	-	*
234	+	+	+	+	NI	*	*
242	-	-	+	-	NI	*	*
276	+	-	+	-	<i>Enterococcus faecium</i>	+	A, P e L50A/B
297	+	-	-	-	<i>Enterococcus faecium</i>	+	P e L50A/B
315	+	-	+	+	NI	*	*
323	+	-	-	+	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	*	*
336	-	-	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	P e L50A/B
340	+	-	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	P e L50A/B
341	+	+	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	P e L50A/B
342	+	+	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	P e L50A/B
356	+	+	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	A e L50A/B
428	-	+	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+	A e L50A/B
433	+	+	+	+	<i>Enterococcus gallinarum</i>	-	*
434	+	+	-	+	<i>Enterococcus faecium</i>	-	*
453	+	+	+	+	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	*	*
464	+	+	+	+	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	*	*
Total	23/28 (82%)	14/28(50%)	21/28 (75%)	21/28 (75%)	28	16/21 (76%)	16/16 (100%)

NI = não identificado; * Não analisado; p= isolados positivos; n = número de isolados

5.4 Avaliação da identidade dos isolados de BAL com atividade bacteriocinogênica por métodos bioquímicos e moleculares

Todos os isolados de BAL (28) cuja atividade antagonista contra *L. monocytogenes* foi caracterizada como sendo uma substância protéica, foram identificados em nível de gênero e espécie através do sistema Vitek®2. Os isolados identificados como *E. faecium*, foram avaliados em nível de gênero por PCR e, os que confirmaram como *Enterococcus* spp., foram submetidos a identificação em nível de espécie, por sequenciamento parcial do gene *pheS*.

Pode-se verificar, na Tabela 6, que vinte isolados (74%) foram identificados pelo Vitek®2 como *E. faecium*, um (3,7%) como *E. gallinarum* e três (11%), como *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Em quatro isolados (15%) não foi possível identificar o gênero nem a espécie bacteriana.

Muitos trabalhos têm sido realizados avaliando a microbiota do leite *in natura*, verificando-se que há uma grande diversidade de gêneros e espécies de BAL, em função da origem da matéria-prima. Essa diversidade microbiana é um dos fatores que tornam relevante o isolamento e caracterização dessas bactérias com atividade antimicrobiana em diferentes regiões produtoras de leite, tendo em vista que a microbiota autóctone pode ser diferente em função do clima e de outros fatores ambientais exercerem uma forte pressão seletiva, tendo grande influência na seleção bacteriana.

Neste trabalho não se objetivou estudar a diversidade das BAL isoladas, portanto, se avaliou a identidade daqueles isolados que apresentaram atividade antagonista de natureza protéica, comprovada pela sensibilidade às enzimas proteolíticas. Nesses isolados houve predominância de *E. faecium*, diferentemente dos resultados obtidos por Ortolani (2009), que identificaram *L. lactis* como a BAL bacteriocinogênica prevalente em leite *in natura* da região de Viçosa, MG. Esses resultados corroboram outros estudos que relatam a interferência do local de isolamento sobre a predominância de certos gêneros/espécies de micro-organismos, bem como destacam o potencial que existe para se isolar bactérias com capacidade de serem utilizadas como bioconservadoras, nas diferentes bacias leiteiras do Brasil. Levando-se em consideração as grandes diferenças entre as regiões brasileiras produtoras de leite, tanto em clima, quanto em manejo do gado leiteiro, infere-se que esses fatores podem influenciar decisivamente na microbiota presente e, por consequência, no tipo e potencial bacteriocinogênico das BAL isoladas.

Tabela 7- Identificação microbiana e perfil bioquímico de 28 isolados de BAL pelo sistema Vitek®2.

Isolados	AMY	APPA	LeuA	AlaA	dRIB	NOVO	dRAF	OPTO	PIPLC	CDEX	ProA	TyrA	ILATk	NC6,5	0129R	dXYL	AspA	BGURr	dSOR	LAC	dMAN	SAL	ADH1	BGAR	AGAL	URE	NAG	dMNE	SAC	BGAL	AMAN	PyrA	POLYB	dMAL	MBdG	dTRE	AGLU	PHOS	BGUR	dGAL	BACI	PUL	ADH2s	Micro-organismo	
05	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	Enterococcus faecium		
13	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium		
16	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium		
19	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium		
30	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium		
43	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium		
57	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium	
69	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium	
74	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	NI		
89	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium	
104	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium		
234	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	NI		
242	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	NI		
256	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium	
276	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium	
297	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium
315	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	NI	
323	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Leuconostoc pseudomesenteroides	
336	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium		
340	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium
341	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium	
342	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium	
356	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium
428	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium
433	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. galinarum
434	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	E. faecium
453	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	L. pseudomesenteroides

+ (resultado positivo para o teste realizado); - (resultado negativo para o teste realizado); NI (isolado não identificado pelo sistema Vitek®2) e os testes:

AMY - D-AMIGDALINA AMY 0.1875 mg

APPA - Ala-Fe-Pro ARILAMIDASE APPA 0.0384 mg

LeuA - Leucina ARILAMIDASE LeuA 0.0234 mg

AlaA - Alanina ARILAMIDASE AlaA 0.0216 mg

dRIB - D-RIBOSE dRIB 0.3 mg

NOVO - RESISTENCIA A NOVIOBIOCINA NOVO 0.000075 mg

dRAF - D-RAFINOSE dRAF 0.3 mg

OPTO - RESISTENCIA A OPTOQUINA OPTO 0.000399 mg

PIPLC - FOSFATIDILINOSITOL FOSFOLIPASE C PIPLC 0.015 mg

CDEX - CICLODEXTRINA CDEX 0.3 mg

ProA - L-Prolina ARILAMIDASE ProA 0.0234 mg

TyrA - Tirosina ARILAMIDASE TyrA 0.0276 mg

ILATk - Alcalinização L-LACTATO ILATk 0.15 mg

NC6,5 - CRESCIMENTO EM NaCl 6,5% NC6.5 1.68 mg

0129R - RESISTÊNCIA O/129 (comp.vibrio.) O129R 0.0084 mg

dXYL - D-XILOSE dXYL 0.3 mg

AspA - L-Aspartato ARILAMIDASE AspA 0.024 mg

BGURr - BETA-GLUCURONIDASE BGURr 0.0018 mg

dSOR - D-SORBITOL dSOR 0.1875 mg

LAC - LACTOSE LAC 0.96 mg

dMAN - D-MANITOL dMAN 0.1875 mg

SAL - SALICIN SAL 0.3 mg

ADH1 - ARGININA DIHIDROLASE 1 ADH1 0.111 mg

BGAR - BETA GALACTOPIRANOSIDASE BGAR 0.00204 mg

AGAL - ALFA-GALACTOSIDASE AGAL 0.036 mg

URE - UREASE URE 0.15 mg

NAG - N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA NAG 0.3 mg

dMNE - D-MANOSE dMNE 0.3 mg

SAC - SACAROSE/SUCROSE SAC 0.3 mg

BGAL - BETA-GALACTOSIDASE BGAL 0.036 mg

AMAN - ALFA-MANOSIDASE AMAN 0.036 mg

PyrA - L-Pirrolidonil ARILAMIDASE PyrA 0.018 mg

POLYB - RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B POLYB 0.00093 mg

dMAL - D-MALTOSE dMAL 0.3 mg

MBdG - METIL-B-D-GLUCOPIRANOSIDA MBdG 0.3 mg

dTRE - D-TRELOSE dTRE 0.3 mg

AGLU - ALFA-GLUCOSIDASE AGLU 0.036 mg

PHOS - FOSFATASE PHOS 0.0504 mg

BGUR - BETA-GLUCURONIDASE BGUR 0.0378 mg

dGAL - D-GALACTOSE dGAL 0.3 mg

BACI - RESISTÊNCIA À BACITRACINA BACI 0.0006 mg

PUL - PULULANO PUL 0.3 mg

ADH2s - ARGININA DIHIDROLASE 2 ADH2s 0.27 mg

Na Tabela 7, pode-se verificar a variabilidade no perfil bioquímico entre os isolados identificados como *E. faecium*.

Os 21 isolados de enterococos que foram identificados pelo Vitek®2 foram submetidos a PCR para confirmação do gênero *Enterococcus* através da amplificação de um fragmento de 112pb, referente ao gene *tuf*. Dezesesseis isolados (76,2%) amplificaram a região esperada, confirmando que pertencem ao gênero *Enterococcus* (Figura 8).

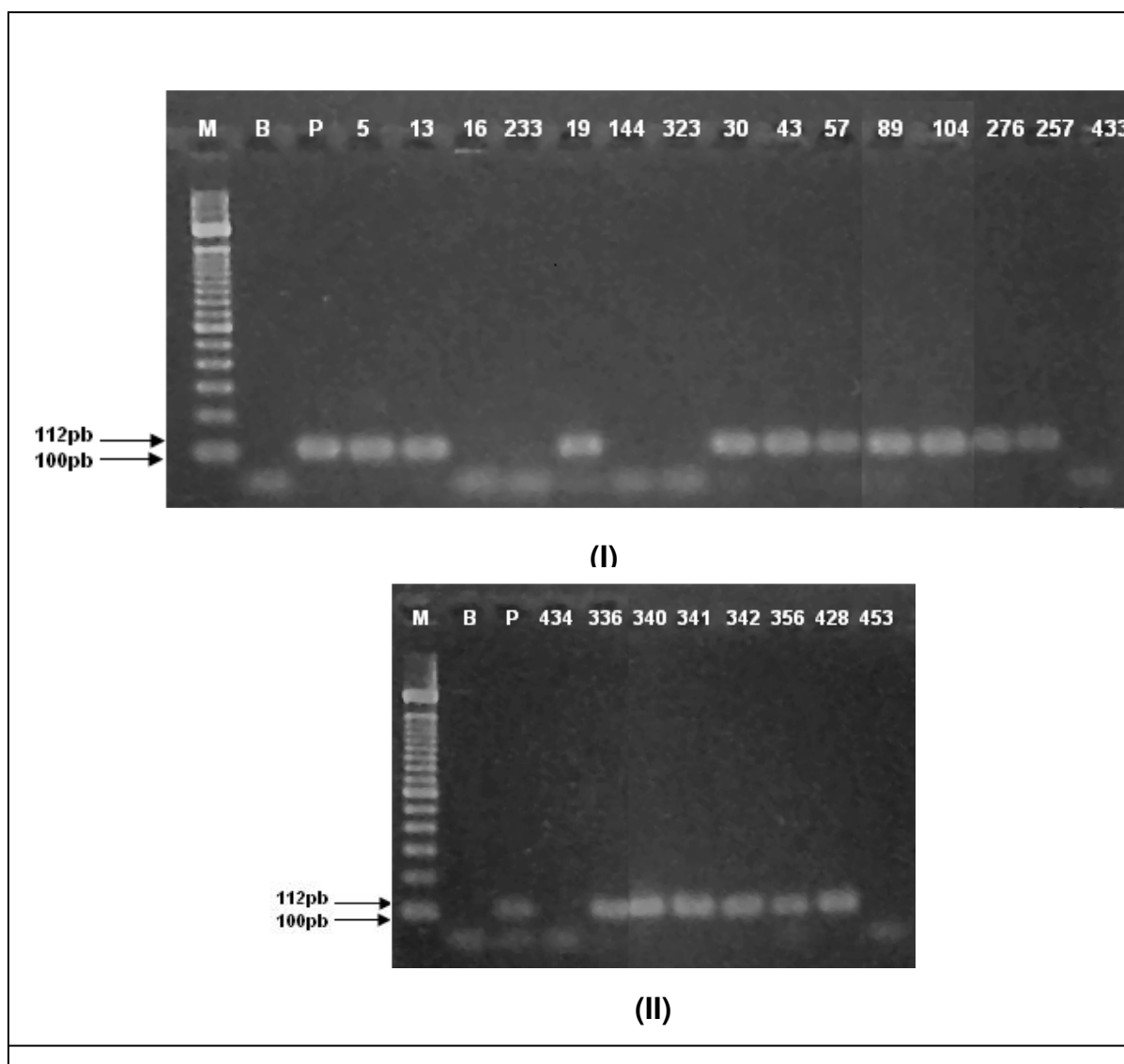


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR para o gene *tuf* dos isolados identificados como *E. faecium* pelo Vitek®2. M marcador de peso molecular Ladder 100pb; P controle positivo: *Enterococcus faecium* FAIR – E 178 (112pb); B controle negativo; 5, 13, 19, 30, 43, 57, 89, 104, 276, 257, 336, 340, 341, 342, 356 e 428: isolados positivos para o gene *tuf*; 16, 233, 144, 323, 433, 434, 453: isolados negativos para o gene *tuf*.

Outros autores utilizaram o gene *tuf* para a identificação de *Enterococcus* spp. Hernández et al. (2002), observaram que de 46 isolados obtidos de amostras clínicas que foram identificados pelo sistema Vitek como *Enterococcus* spp., seis foram submetidos a PCR para amplificação do gene *tuf* e amplificaram a região esperada de 112pb. Da mesma forma Mannu et al. (2003), verificaram que dos 40 isolados de enterococos obtidos de produtos lácteos e identificados por provas bioquímicas, 100% amplificaram o gene *tuf*. Já Araújo (2008), observou que dos 45 isolados de enterococos provenientes de queijo Minas frescal identificados por provas bioquímicas e submetidos a PCR, 11 (24%) amplificaram um fragmento de 112pb correspondente ao gene *tuf*.

Dos 21 isolados identificados pelo Vitek®2 como enterococos, 16 (76,4%) confirmaram o gênero *Enterococcus* por PCR. Jackson et al. (2004) observaram que de 100 isolados obtidos de amostras ambientais, alimentos e de animais que foram identificados pelo sistema Vitek como *Enterococcus* spp., 90% foram confirmados por PCR. A divergência entre os resultados obtidos pelo sistema Vitek®2 e aqueles verificados por PCR pode ser explicada pela diferença na especificidade dos métodos utilizados. Nos métodos moleculares a identificação é baseada em características mais estáveis, obtidas pela presença ou ausência de determinada sequência gênica, enquanto os métodos fenotípicos baseiam-se em características instáveis, que podem variar em função de diversos fatores ambientais, já que dependem da expressão gênica. Como exemplo, pode-se observar que os isolados identificados como 13, 16, 69 e 89 apresentaram o mesmo perfil bioquímico pelo sistema Vitek®2, sendo identificados como *E. faecium*, no entanto, o isolado 16 não foi confirmado como *Enterococcus* spp. por PCR (Tabela 7).

Tendo em vista a divergência verificada nos resultados obtidos entre o sistema Vitek®2 e a PCR, os 16 isolados identificados bioquimicamente como *E. faecium* e confirmados como *Enterococcus* por PCR, foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene *pheS*, para serem confirmados em nível de espécie. As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados depositado no GenBank, sendo 100% dos isolados identificados como *E. faecium* (Figura 13).

Na Figura 13 pode-se visualizar que a similaridade dos 16 isolados de *E. faecium*, através do sequenciamento parcial do gene *pheS*, variou de 90 a 99% com dados depositados para esta espécie no GenBank. Esses resultados são

importantes, haja vista a dificuldade em discriminar isolados de enterococos em nível de espécie. Neste estudo, antes de se realizar o sequenciamento do gene *pheS*, foram utilizados os *primers* P1V1 (5'- GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3') e P4V3 (5'-ATC TAC GCA TTT CAC CGC TAC-3') para o sequenciamento da região 16S com o intuito de identificar o gênero e espécies dos isolados. No entanto, estes *primers* não foram discriminatórios para a identificação das espécies, somente para o gênero *Enterococcus* spp. (dados não mostrados). Este comportamento também foi relatado por Dal Bello et al. (2010) que em seu estudo utilizou os mesmos *primers* para o sequenciamento da região 16S e alguns isolados de enterococos não foram identificados as espécies.

De acordo com Naser et al. (2005), o sequenciamento de gene da região 16S são eficientes e muito usado para discriminar as várias espécies de enterococcus como *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. faecalis* e *E. faecium*, no entanto apresenta falhas na discriminação de espécies estreitamente relacionadas como por exemplo o *E. faecium* das espécies *E. hirae*, *E. durans*, *E. villorum*, *E. mundtii* e *E. ratti*.

5.5 Identificação dos genes das enterocinas A, B, P E L50A/B por PCR

Os 16 isolados de enterococos que foram identificados como *E. faecium* pelo Vitek[®]2, confirmados em nível de gênero por PCR e em nível de espécie por sequenciamento do gene *pheS*, e que apresentaram atividade bacteriocinogênica contra *L. monocytogenes*, possuíam, pelo menos, um dos genes estruturais que codificam as enterocinas A, B, P ou L50A/B (Tabela 6, Tabela 8). Já Özdemir et al. (2011), identificaram a presença dos genes estruturais das enterocinas A, B, P e L50A/B em 94,7% de 57 isolados de *Enterococcus* spp., obtidos de água, alimentos e animais. Outros estudos têm demonstrado uma frequência bem mais baixa de isolados de enterococos portadores dos genes de enterocinas com atividade anti-*Listeria*. Poeta et al. (2007) identificaram a presença de pelo menos um dos genes das enterocinas A, B, Q, cylL, bac 31 e L50A/B em 68% dos isolados de *Enterococcus* spp. obtidos a partir de fezes de animais selvagens, enquanto, Pangallo et al. (2004), identificaram em 57,4% de 61 isolados provenientes de fontes ambientais, água e fezes de carneiro.

Nove isolados (56,25%) carreavam o gene da enterocina A (*entA*), confirmado pela amplificação de um fragmento de 132pb (Figura 9). A frequência de isolados de enterococos portadores desse gene é bastante variável, mesmo naqueles provenientes de fontes alimentares semelhantes à avaliada neste estudo. Moraes (2011), por exemplo, encontraram 33,3% (10/30) de isolados de *Enterococcus* spp. obtidos em leite *in natura* e queijo, portando o gene da enterocina A. O gene dessa enterocina também foi identificado em enterococos isolados em outras fontes, que não leite e derivados. Strompfová et al. (2008), obtiveram 66,2% (155/234) dos isolados de *Enterococcus* spp. obtidos a partir de alimentos, animais e silagem, portando esse gene, assim como Poeta et al. (2007), que encontraram 60% (15/25). de isolados de enterococos obtidos de fezes de animais, carreando o gene da enterocina A. Já Özdemir et al. (2011), relatam que 100% dos isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de água de rio, água de tratamento de efluentes, solo, animais e vegetais apresentaram o gene da enterocina A.

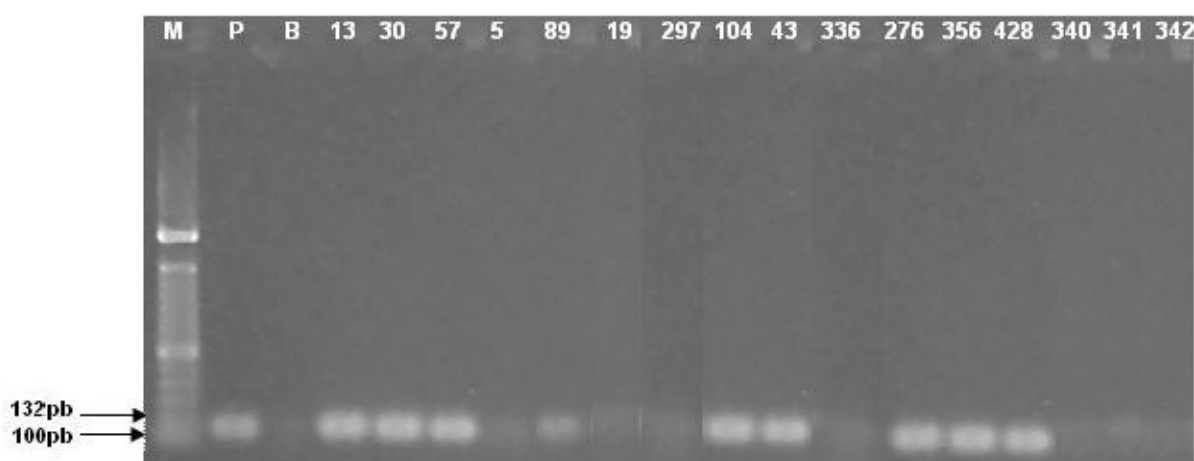


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR dos isolados de *E. faecium* provenientes de leite *in natura* para identificação do gene estrutural da enterocina A. M marcador de peso molecular Ladder 100pb; P controle positivo: *Enterococcus faecium* FAIR – E 178 (132pb); B controle negativo; 13, 30, 53, 89, 104, 43, 276, 356 e 428: isolados positivos para o gene estrutural da enterocina A; 5, 19, 297, 336, 340, 341, 342: isolados negativos para o gene estrutural da enterocina A.

Apenas um isolado (6,25%) apresentou o gene estrutural da enterocina B (Tabela 8), conforme pode ser visualizado pela amplificação de um fragmento de 201pb (Figura 10). Moraes (2011), avaliando enterococos isolados em leite *in natura* e queijo, também encontrou uma baixa frequência do gene dessa enterocina (3,3%).

Por outro lado, Poeta et al. (2007) e Özdemir et al. (2011), verificaram frequências de 48% e 98,1% do gene da enterocina B em isolados de *Enterococcus* spp. obtidos de fezes de animais selvagens e de água, alimentos e animais, respectivamente, o que infere que a presença desse gene pode estar diretamente relacionada com a fonte de isolamento da bactéria.

O isolado que portava o gene da enterocina B (isolado 57) também carregava os genes das enterocinas A, P e L50A/B (Tabela 6). De acordo com vários autores (Franz et al., 1999, De Vuyst et al., 2003, Poeta et al., 2007 e Özdemir et al., 2011), sempre que um isolado porta o gene da enterocina B, carrega, simultaneamente, o gene da enterocina A, conforme foi observado neste estudo. De acordo com De Vuyst et al. (2003) a enterocina B não possui um gene que codifica uma proteína de transporte para a sua translocação, necessitando, portanto, de proteínas de transporte codificadas em *operons* de outras enterocinas, como da enterocina A.



Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR dos isolados de *E. faecium* provenientes de leite *in natura* para identificação do gene estrutural da enterocina B. M marcador de peso molecular Ladder 100pb; P controle positivo: *Enterococcus faecium* FAIR – E 178 (201pb); B controle negativo; 57: isolado positivo para o gene da enterocina B; 5, 13, 19, 30, 89, 104, 43, 276, 297, 336, 340, 341, 342, 356, 428: isolados negativos para o gene da enterocina B.

Com relação ao gene da enterocina P, 11 (68,7%) isolados amplificaram o fragmento esperado de 87pb, como pode ser observado na Figura 11.

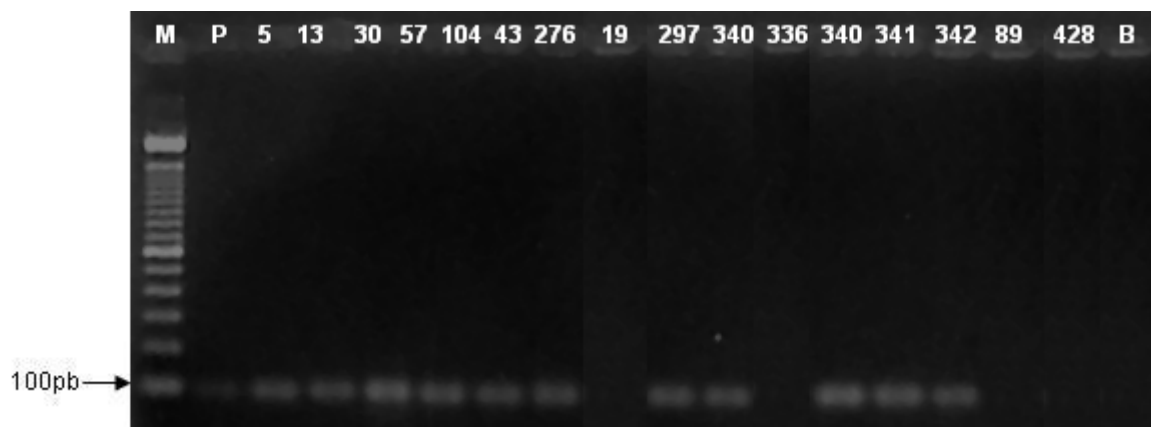


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR de isolados de *E.faecium* provenientes de leite *in natura* para identificação do gene estrutural da enterocina P. M marcador de peso molecular Ladder 100pb; P controle positivo: *Enterococcus faecium* FAIR – E 178 (87pb); B controle negativo; 5, 13, 30, 57, 104, 43, 276, 297, 340, 341, 342: isolados positivos para o gene da enterocina P; 19, 336, 356, 89, 428: isolados negativos para a enterocina P.

O gene da enterocina L50A/B foi o mais frequentemente encontrado nos isolados avaliados neste estudo (93,75%) (Tabela 8). A amplificação de um fragmento de 274pb, indica a presença do gene dessa enterocina (Figura 12).

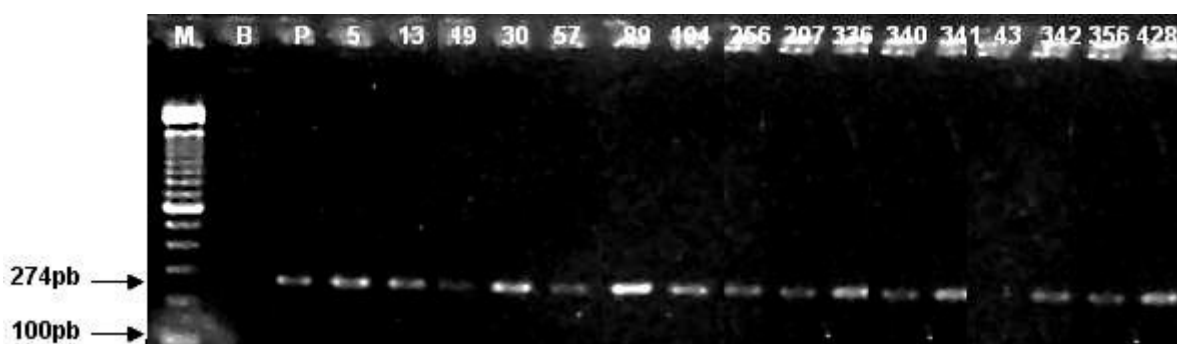


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR de isolados de *E.faecium* provenientes de leite *in natura* para identificação do gene estrutural da enterocina L50A/B. M marcador de peso molecular Ladder 100pb; P controle positivo: *Enterococcus faecium* BFE – 1072 (274pb); B controle negativo; 5, 13, 19, 30, 57, 89, 104, 256, 297, 336, 340, 341, 342, 356 e 428: isolados positivos para o gene da enterocina L50A/B; 43: isolado negativo para o gene da enterocina L50A/B.

Moraes (2011) avaliou a presença do gene da enterocina L50A/B em isolados de *Enterococcus* spp. obtidos de leite *in natura* e queijo, e não encontrou isolados portadores dessa enterocina, ratificando a importância do local de obtenção do isolado sobre seu perfil gênico. Tendo em vista que as bacteriocinas são uma forma de defesa da bactéria, a microbiota autóctone da fonte de isolamento pode influenciar na seleção de alguns isolados mais adaptados a persistirem naquele local/alimento.

Tabela 8- Ocorrência dos genes das enterocinas A, B, P e L50A/B e perfil genético de 16 isolados de *E. faecium* provenientes de leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina, avaliados por PCR.

Genes das enterocinas	Número de isolados portando os genes (%)	Perfil genético*	Número de isolados (%)
<i>ent A</i>	9 (56,25%)	<i>ent L50A/B</i>	1 (6,25%)
<i>ent B</i>	1 (6,25%)	<i>ent P + ent L50A/B</i>	5 (31,2%)
<i>ent P</i>	11 (68,75%)	<i>ent A + ent P</i>	1 (6,25%)
<i>ent L50A/B</i>	15 (93,75%)	<i>ent A + ent L50A/B</i>	3 (18,75%)
		<i>ent A+ entP + ent L50A/B</i>	5 (31,2%)
		<i>ent A + ent B + ent P + ent L50A/B</i>	1 (6,25%)

* combinação de genes das enterocinas encontrados em um isolado

Quase todos os isolados (93,7%) possuem mais de um gene das enterocinas, porém, apresentaram diferentes perfis genéticos (Tabela 8). Apenas um isolado (6,25%) carregava somente um gene, da enterocina L50A/B. Já Moraes (2011), estudando isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de leite *in natura* e queijo, verificou que 66% apresentavam mais de um gene estrutural das enterocinas. Diversos outros estudos, embora avaliando isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de fontes diferentes de leite *in natura*, também verificaram uma alta percentagem de isolados portando mais de um gene de enterocinas (HERRANZ et al., 1999; DE VUYST et al., 2003; PANGALLO et al., 2004; DAL BELLO et al., 2010). Entretanto, diferentemente do que foi observado neste estudo, Strompfová et al. (2008) encontraram 35,5% dos isolados de *Enterococcus* spp. portando apenas um gene das enterocinas A, B, P e L50AB.

Apenas um isolado (6,25%) portava conjuntamente os genes das enterocinas A e P (perfil A/P), conforme se observa na Tabela 8. Esta mesma combinação genética, porém com frequências diferentes, foi encontrada por Renye et al. (2009), que encontraram 3% de isolados com esse perfil, e por Poeta et al. (2007), que relataram a presença de 8% de isolados de *Enterococcus* spp. com essa combinação de genes para enterocinas.

O perfil P/L50AB foi identificado em 31,2% dos isolados (Tabela 8), sendo o perfil genético mais frequente, juntamente com o perfil A/P/L50AB. Já Strompfová et al. (2008) identificaram a presença da combinação dos dois genes das enterocinas P e L50A/B em 5,7% dos isolados de enterococos de animais, alimentos e ração animal. No entanto, o perfil P/L50AB não foi encontrado nos estudos de Poeta et al. (2007) e Özdemir et al. (2011) em isolados de enterococos de fezes de animais selvagens e em água, solo, animais e vegetais, respectivamente.

O perfil A/L50AB foi encontrado em 18,5% dos isolados, diferentemente do observado por Poeta et al. (2007), que não encontraram isolados de enterococos com esse perfil genético. Já isolados portando simultaneamente os genes das enterocinas B e L50A/B (perfil B/L50AB) não foram encontrados neste estudo, o que também foi relatado por Strompfová et al. (2008).

Cinco isolados (31,2%) portavam os genes de três enterocinas (perfil A/P/L50AB) (Tabela 8). É interessante frisar, que mesmo que os isolados sejam de amostras e de amostragens distintas, apenas essa combinação de três genes foi identificada. Diferente deste resultado, Poeta et al. (2007), Strompfová et al. (2008) Renye et al. (2009) e Özdemir et al. (2011) relatam isolados de enterococos portando, além desta, outras combinações de três genes das enterocinas A, B, P e L50A/B.

Com relação a presença desses mesmos três genes (perfil A/P/L50AB), Renye et al. (2009) observaram que 9% dos isolados de enterococos obtidos de queijos apresentavam essa combinação, ao passo que Strompfová et al. (2008) relatam que dos 193 isolados de enterococos obtidos de alimentos, animais e ração animal, 17,97% apresentaram esse mesmo perfil. Dessa forma, observa-se que a presença de três genes de enterocinas (perfil A/P/L50AB) não apresenta relação direta com a origem dos isolados, pois esta combinação de genes foi identificada tanto em isolados de animais como de alimentos. Neste estudo não foram identificados isolados de enterococos com atividade antagonista contra *L. monocytogenes* apresentando o perfil A/B/L50AB, no entanto, Poeta et al. (2007) identificaram esse perfil em 8% dos isolados de enterococos provenientes de fezes de animais selvagens. Da mesma forma, Özdemir et al. (2011) descrevem que dos 57 isolados de enterococos oriundos de água de rio, animais e vegetais, 7% apresentaram a combinação desses três genes.

Por outro lado, apenas um isolado (6,25%) carregava quatro genes de enterocinas (perfil A/B/P/L50AB). Özdemir et al. (2011) verificaram que dos 57 isolados de enterococos provenientes de água, animais, solo e vegetais, 14% apresentaram a combinação destes mesmos quatro genes das enterocinas semelhante ao observado por Stropfová et al. (2008), que identificaram esses quatro genes em 14,53% dos isolados.

Os resultados obtidos permitem inferir a diversidade genética e o alto potencial dos isolados de *E. faecium* obtidos de leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina para a produção de bacteriocinas (enterocinas) com atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. Isso é justificado pelo número de isolados que produziram substância antimicrobiana de natureza protéica e com atividade anti-*Listeria*, bem como por seu perfil genético, haja vista que 16 isolados portavam, pelo menos, um gene das enterocinas. Esse resultado corrobora os dados da literatura, que descrevem que as enterocinas A, B, P e L50A/B, identificadas nos isolados avaliados, pertencem a classe II das bacteriocinas, apresentando atividade contra *L. monocytogenes* (Franz et al., 2007, Renye et al., 2009, Özdemir et al., 2011).

5.6 Perfis moleculares identificados por Rep-PCR

A técnica Rep-PCR foi utilizada neste estudo com a finalidade principal de agrupar os isolados de enterococos e relacionar os perfis moleculares obtidos, com a presença ou ausência de enterocinas.

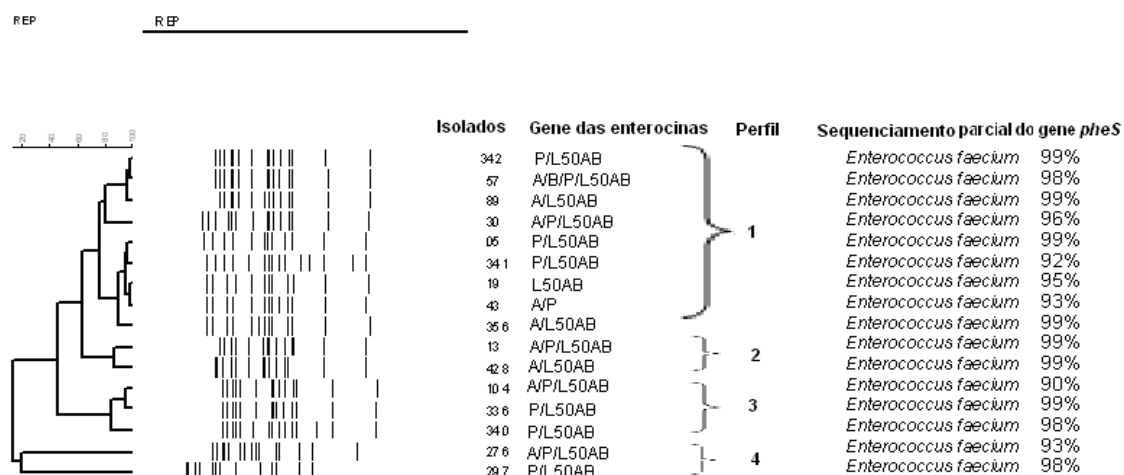


Figura 13 – Dendrograma da Rep-PCR de 16 isolados de *E. faecium*, identificando os perfis moleculares obtidos e a identificação pelo sequenciamento parcial do gene *pheS*.

Os 16 isolados de *E. faecium* foram submetidos a Rep-PCR, obtendo-se quatro perfis diferentes, identificados como 1, 2, 3 e 4 conforme pode ser visualizado na Figura 13.

Não houve relação entre os perfis gerados por Rep-PCR e a presença dos genes das enterocinas avaliadas (A, B, P e L50A/B) nos isolados. Como exemplo, o perfil 2 agrupa o isolado 13, que possui os genes das enterocinas A, P e L50A/B e o isolado 428, que carrega os genes das enterocinas A e L50A/B. Resultado semelhante foi relatado por Dal Bello et al. (2010), que utilizaram o mesmo *primer* na Rep-PCR para avaliar o perfil dos isolados de enterococos, e verificaram que isolados do mesmo perfil apresentaram diferenças na presença ou ausência dos genes das enterocinas A e P. De acordo com Dal Bello et al. (2010), isolados com mesmo perfil genético portando diferentes genes estruturais das bacteriocinas, também foi observado em RAPD, técnica similar a Rep-PCR.

5.7 Avaliação da Sensibilidade a Antimicrobianos e da Atividade da β -hemolisina

Os enterococos podem ser utilizados como culturas probióticas ou como culturas iniciadoras pelas indústrias de alimentos, entretanto, alguns isolados podem ser patogênicos aos homens e animais (Ogier e Serror, 2008). Desta forma, é importante que isolados de enterococos sejam avaliados quanto a presença de fatores de virulência, como a sensibilidade a antimicrobianos e a atividade da enzima β -hemolisina.

Nesse sentido os 16 isolados de *E. faecium* foram avaliados quanto a sensibilidade a antimicrobianos de uso clínico. Observou-se que 94% demonstraram sensibilidade a ampicilina, 81% a tetraciclina e 100% a vancomicina (Tabela 9). Resultados semelhantes foram encontrados por Peters et al. (2003), os quais verificaram que 100% dos 118 isolados de enterococos de alimentos de origem animal, na Alemanha, foram sensíveis aos antibióticos ampicilina e vancomicina. Da mesma forma, Renye et al. (2009), nos EUA, relataram que todos os 33 isolados de enterococos obtidos de queijo apresentaram sensibilidade a vancomicina.

Os maiores níveis de resistência foram aos antibióticos penicilina e tetraciclina, tendo em vista que dos 16 isolados, sete (44%) e três (19%) apresentaram resistência a esses antibióticos, respectivamente (Tabela 9).

Resultados inferiores foram relatados por Peters et al. (2003) onde 0,8% dos 118 isolados de enterococos provenientes de alimentos de origem animal apresentaram resistência à penicilina. Valores inferiores de resistência a tetraciclina também foram relatados por Renye et al. (2009), onde 9% dos 33 isolados de enterococos provenientes de queijo, apresentaram resistência a este antibiótico. Já Cariolato et al. (2008) relataram que nenhum dos 81 isolados de enterococos provenientes de derivados de leite, no norte da Itália, apresentou resistência à penicilina, no entanto, 30,8% apresentaram resistência a tetraciclina. De acordo com Giraffa (2002, 2003), a resistência bacteriana a antibióticos está relacionada com o uso destas drogas na terapêutica humana e veterinária. No Brasil, a penicilina é utilizada em larga escala no tratamento de mastite do gado bovino, o que pode explicar os resultados encontrados neste estudo (ZAFALON et al., 2008).

Tabela 9- Perfil de resistência aos antimicrobianos ampicilina, penicilina, vancomicina e tetraciclina, e atividade da β -hemolisina de 16 isolados de *Enterococcus faecium* obtidos de leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina.

Isolados	Sensibilidade a Antimicrobianos				Atividade β -hemolisina
	Ampicilina (10ug)	Penicilina (10ug)	Vancomicina (30ug)	Tetraciclina (30ug)	
05	S	S	S	S	-
13	S	S	S	S	-
19	S	R	S	S	-
30	S	R	S	S	-
43	S	S	S	S	-
57	S	S	S	S	-
89	S	R	S	S	-
104	S	S	S	S	-
276	S	S	S	R	-
297	S	R	S	S	-
336	S	S	S	R	-
340	S	S	S	S	-
341	R	R	S	R	-
342	S	R	S	S	-
356	S	S	S	S	-
428	S	S	S	S	-
Sensível (S) (n/%)	15/94	9/56	16/100	13/81	
Intermediário (I) (n/%)	0/0	0/0	0/0	0/0	
Resistencia (R) (n/%)	1/6	7/44	0/0	3/19	

(-) negativo

Dos dezesseis isolados, seis (56,25%) foram sensíveis aos antimicrobianos de uso clínico avaliados, portanto, por este critério, podem ser bons candidatos para serem utilizados como culturas iniciadoras e/ou probióticas.

Ressalta-se que para que um isolado de enterococos seja utilizado como uma cultura iniciadora ou probiótica, além da sensibilidade aos antimicrobianos, se faz

necessário avaliar alguns outros fatores de virulência, como a presença da atividade da enzima β -hemolisina.

Neste estudo, nenhum dos 16 isolados apresentou atividade da enzima β -hemolisina (Tabela 9). Embora a ausência da atividade dessa enzima não signifique, necessariamente, que o isolado não possui potencial patogênico, tendo em vista que pode possuir outros fatores de virulência (Frantz, 2001), esta é uma das características fenotípicas comumente utilizadas como marcador de sua patogenicidade. Outros autores, como Poeta et al. (2007), também não encontraram isolados apresentando atividade da β -hemolisina, e relatam que esta enzima é mais frequentemente encontrada em isolados de origem clínica. Entretanto, Barbosa et al. (2010) e Eaton e Gasson (2001), relatam a presença dessa enzima em isolados de enterococos provenientes de alimentos.

5.8 Relação entre tamanho do halo de inibição contra *L. monocytogenes* nos meios de cultura MRS, BHI e BHI+catalase e natureza da atividade antagonista em 16 isolados de *E. faecium* produtores de enterocinas

Utilizou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) com o objetivo de avaliar a relação entre a atividade antagonista dos isolados de *E. faecium* e o tamanho do halo produzido contra *L. monocytogenes* nos ágaros MRS, BHI e BHI + catalase, já que nesses meios se tem um indicativo do possível efeito antagonista produzido pelos isolados. O ágar MRS apresenta uma grande quantidade de carboidrato, o que propicia a produção de ácidos orgânicos, no entanto, não inibe a produção de peróxido de hidrogênio e de enterocinas pelos enterococos; o ágar BHI possui pouco carboidrato, impossibilitando os enterococos de produzirem ácidos orgânicos e favorecendo a produção de peróxido de hidrogênio ou de bacteriocina; já, o ágar BHI + catalase possui pouco carboidrato e a adição da catalase inibe a produção de peróxido de hidrogênio, favorecendo a produção de bacteriocinas, neste caso enterocinas (MORENO, LERAYER E LEITÃO, 1999; CARR et al., 2002).

Pode-se visualizar, na Tabela 10, que quando os isolados de *E. faecium* foram comparados quanto ao tamanho dos halos de inibição nos ágaros MRS, BHI e BHI + catalase, 13 isolados (2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 e 16) dos 16 avaliados (81,25%) não apresentaram diferença significativa nos três ágaros, independente da substância antagonista produzida. Dois isolados (4 e 11) (12,5%)

não apresentaram diferença significativa nos ágaros BHI e BHI+catalase, no entanto, apresentaram diferença significativa nos ágaros MRS e BHI e BHI + catalase, independente da substância antagonista produzida. Já o isolado 1 não apresentou diferença significativa nos ágaros MRS e BHI+catalase, assim como em BHI e BHI + catalase, no entanto, demonstrou diferença significativa nos ágaros MRS e BHI, independente da substância antagonista produzida.

Tabela 10 – Média do tamanho dos halos (mm) de inibição formados nos ágaros MRS, BHI e BHI + catalase por 16 isolados de *E. faecium* contra *L. monocytogenes*.

Isolado	MRS ¹	BHI ²	BHI + C ³
	Tamanho do halo (mm)	Tamanho do halo (mm)	Tamanho do halo (mm)
01	14,0 ^{aA} ± 4,24	2,0 ^{abB} ± 1,41	3,5 ^{aAB} ± 2,12
02	13,5 ^{aA} ± 6,23	3,5 ^{abcA} ± 2,12	3,0 ^{aA} ± 2,82
03	13,5 ^{aA} ± 9,19	2,0 ^{abcA} ± 0,70	4,0 ^{aA} ± 2,82
04	12,5 ^{aA} ± 2,12	0,0 ^{aB} ± 0,00	6,0 ^{aB} ± 1,42
05	8,0 ^{aA} ± 2,82	2,0 ^{abA} ± 0,00	4,5 ^{aA} ± 0,70
06	15,0 ^{aA} ± 9,89	0,0 ^{aA} ± 0,00	2,5 ^{aA} ± 3,53
07	9,0 ^{aA} ± 0,00	5,5 ^{bcA} ± 2,12	3,5 ^{aA} ± 2,12
08	10,5 ^{aA} ± 4,95	13,5 ^{dA} ± 0,00	9,0 ^{aA} ± 1,41
09	5,0 ^{aA} ± 1,14	0,0 ^{aA} ± 0,00	9,5 ^{aA} ± 4,95
10	10,0 ^{aA} ± 1,48	2,0 ^{abA} ± 1,041	4,0 ^{aA} ± 2,82
11	10,5 ^{aA} ± 0,70	5,5 ^{bcB} ± 0,70	6,5 ^{aB} ± 0,70
12	8,0 ^{aA} ± 1,41	4,0 ^{abcA} ± 1,41	6,0 ^{aA} ± 1,41
13	7,0 ^{aA} ± 2,83	7,0 ^{cA} ± 1,41	10,0 ^{aA} ± 4,24
14	8,5 ^{aA} ± 2,12	4,5 ^{abcA} ± 0,70	6,0 ^{aA} ± 0,00
15	8,5 ^{aA} ± 0,70	5,5 ^{bcA} ± 0,70	3,5 ^{aA} ± 2,12
16	6,0 ^{aA} ± 1,41	2,5 ^{abcA} ± 0,70	4,0 ^{aA} ± 1,41

1-Ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS); 2- Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI); 3- BHI adicionado de catase na concentração de 100UI mL⁻¹ (MRS + C); Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade; Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 10, pode-se visualizar os resultados obtidos comparando-se os 16 isolados de *E. faecium* produtores de enterocinas em relação a cada ágar utilizado MRS, BHI e BHI + catalase. Os 16 isolados de *E. faecium* produtores de enterocinas não apresentaram diferença significativa no tamanho do halo de inibição formado no ágar MRS. Percebe-se, na Tabela 10, que os maiores halos de inibição foram formados por *E. faecium* produtores de enterocina no ágar MRS, o que pode ser explicado por este meio propiciar a produção de ácidos orgânicos, peróxido de

hidrogênio e enterocinas, haja vista que este meio não inibe nenhum composto antagonista produzido pelos enterococos. Outro fato importante que pode explicar o comportamento desses micro-organismos no ágar MRS, é que, de acordo com Van Den Berghe et al. (2006) os ácidos orgânicos produzidos e presentes no ágar servem como um catalizador das BAL para a produção de bacteriocinas.

No ágar BHI + catalase, os 16 isolados não apresentaram diferença significativa no tamanho dos halos de inibição produzido neste ágar. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que todos isolados de *E. faecium* testados são produtores de enterocinas e que esse ágar inibe a produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio.

Outro fato importante reforçado por esses resultados é que como os 16 isolados de *E. faecium* apresentaram o mesmo comportamento nos ágar MRS e BHI+catalase, estes ágar podem ser utilizados para uma triagem durante o isolamento de enterococos produtores de enterocinas.

No ágar BHI, foram observadas as maiores diferenças de comportamento entre os 16 isolados de *E. faecium* em relação aos tamanhos dos halos de inibição formados. Na Tabela 10, observa-se que cinco isolados (2, 3, 12, 14 e 16) (31,25%) não apresentaram diferença significativa entre si no tamanho do halo de inibição formado nesse ágar. Os isolados 1, 5 e 10, isolados 4, 6 e 9, os isolados 7, 11 e 15 e os isolados 8 e 13, não apresentaram diferença significativa entre si no tamanho do halo formado no ágar BHI. Esta variação no tamanho do halo de inibição de *E. faecium* produzido no ágar BHI pode ser explicado, pois o peróxido de hidrogênio pode interferir na produção de bacteriocinas em alguns isolados (DE MARTINIS et al., 2001).

6. CONCLUSÕES

O leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina apresenta bactérias ácido lácticas com atividade bacteriocinogênica contra *L. monocytogenes*. A atividade antagonista observada em MRS, BHI e BHI + catalase, indica a produção de mais de um composto com atividade antimicrobiana, entre eles, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Dezesseis isolados identificados como *E. faecium* são produtores de bacteriocinas, portando, pelo menos, um gene estrutural das enterocinas A, B, P ou L50A/B. Com relação a virulência, nenhum dos 16 isolados bacteriocinogênicos apresenta atividade da β -hemolisina, sendo que a metade é sensível à ampicilina, penicilina, vancomicina e tetraciclina, portanto, constituem-se em ótimos alvos para serem utilizados como bioconservadores em alimentos.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a presença de atividade antagonista dos 16 isolados de *E. faecium* de leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina produtores de enterocinas, contra outros micro-organismos patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos;
- Avaliar a presença de enzimas capazes de hidrolizar gelatina (gelatinases) e inativar sais biliares, bem como a presença dos genes de virulência *esp*, *as*, *ace*, *efaA*, *gelE*, *cylA* e o gene *vanA* que confere resistência a vancomicina nos 16 isolados de *E. faecium* com o objetivo de identificar culturas com capacidade probiótica;
- Quantificar a atividade antimicrobiana dos 16 isolados de *E. faecium*;
- Determinar a curva de produção de enterocinas para o isolado de *E. faecim* produtor de maior atividade antimicrobiana;
- Determinar o peso molecular das enterocinas produzidas pelos isolados de *E. faecium*;
- Purificar as enterocinas e sequenciar os aminoácidos;
- Avaliar a atividade e capacidade da enterocina purificada em alimentos como bioconservante.

8. REFERÊNCIAS

ABRIOUEL, H., BEN OMAR, N., COBO MOLINOS, A., LUCAS LÓPEZ, R., GRANDE, M.J., MARTÍNEZ-VIDEIRA, P., ORTEGA, E., MARTÍNEZ CAÑAMERO, M., GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal Food Microbiology**, v. 123, 38- 49, 2008.

ACHEMCHER, F.; ABRINI, J.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M. Control of *Listeria monocytogenes* in Goat's Milk and Goat's Jben by the Bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 Strain. **Journal Food Protection**, v.69, p 2370-2376, 2006.

ACUÑA, L.; PICARIELLO, G.; SESMA, F.; MORERO, R.D.; BELLOMIO, A. A new hybrid bacteriocin, Ent35–MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. **FEBS Open Bio**, v.2, p12-19, 2012.

ACURCIO, Leonardo Borges. **Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de ovelha**. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AKPINAR, A.; YERLIKAYA, O.; KILIÇ, S. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts. **Journal of Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 675-682, 2011.

ANNAMALAI, N.; MANIVASAGAN, P.; BALASUBRAMANIAN, T.; VIJAYALAKSHMI, S. Enterocin from *Enterococcus faecium* isolated from mangrove environment. **Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6311-6316, 2009.

ANVISA (2008) Agência de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos.

<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm> acesso em: 02/09/2011.

ARAÚJO, Tatiane Ferreira. **Caracterização e identificação de *Enterococcus* spp. isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo minas artesanal da região da Canastra, Minas Gerais**. 2008. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, P.G.; PENNA, T.C.V. Nisin biotechnological production and application: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v.20, p.146-154, 2009.

ASSISTAT 7.6 (2011).Disponível em: < www.assistat.com > acesso em 05 de março, 2011.

ARRIBAS, P.N; SESEÑA, S.; POVEDA, J.M.; CHICÓN, R.; CABEZAS, L.; PALOP, L. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. **Food Microbiology**, v.28, p.891-899, 2011.

ASTERI, I.; KITTAKI, N.; TSAKALIDOU, E. The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.2, p.234-242, 2010.

BARBOSA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**, v.21, p.651-656, 2010.

BIEDERNBACH, D.J.; MOET, G. J.; JONES, R. M. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.50, p.59-69, 2004.

BELLEI, B., MIGUEL, M. MERE DEL AGUILA, E.M., SILVA, J. T., PASCHOALIN., V. M.F. Purification of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* and its effectiveness for preservation of fresh-cut lettuce. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v.3, 119-125, 2011.

BRASIL. Instrução Normativa n. 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Brasília, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.

CAMPOS, C.A.; RODRÍGUEZ, O.; CALO-MATA, P.; PRADO, M.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Research International**, v.39, p.356-364, 2006.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p.131–149, 1999.

CARIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control**, v.19, p.886-892, 2008.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.4, p.281-370, 2002.

CARVALHO, M.G. S.; STEIGERWALT, A.G.; MOREY, R.E.; SHEWMAKER, P. L.; TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. Characterization of Three New Enterococcal Species, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E2, and *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E3, Isolated from Human Clinical Specimens. **Journal Of Clinical Microbiology**, v.42, p. 1192–1198, 2004.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews Food Science**, v.2, p.82-100, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.** Approved standards. CLSI document M2-A3). Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005. p.M100-S15.

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HÅVARSTEIN, L. S.; HERNÁNDEZ, P. E.; NES, I. F. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel sec-Dependent Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4321-4330, 1997.

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HOLO, H.; HERNANDEZ, P. E.; NES, I. F.; HÅVARSTEIN, L. S. Enterocins L50A and L50B, Two Novel Bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are Related to *Staphylococcal* Hemolysins. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1988-1994, 1998.

CINTAS, L.M; CASAUS, P.; HERRANZ, C.; NES, I.F.; HERNÁNDEZ, P.E. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Food Science and Technology International**, v.7. p.281-305,2001.

COQUE TM, WILLEMS RJ, FORTUN J, TOP J, DIZ S, LOZA E, CANTON R & BAQUERO F Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycinresistance? **Antimicrob Agents Chemother**, v.49: 2693–2700 2005.

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P.R. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.777-788, 2005.

DAL BELLO, B., RANTSIOU, K., BELLIO, A., ZEPPA, G., AMBROSOLI, R, CIVERA, T., COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **Food Science and Technology** 43, 1151-1159, 2010.

DE MARTINIS, E.C.P, PÙBLIO, M.R.P., SANTAROSA, P.R., FREITAS, F.Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, 32, 32-37, 2001.

DE VUYST L, FOULQUIÉ - MORENO MR, REVETS H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, 99–318, 2003.

DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v.16 p.1058-1071, 2006.

DRIDER, D., FIMLAND, G., HÉCHARD, Y., MCMULLEN, L.M., PRÉVOST, H., The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, 564–582, 2006.

DROSINOS, E.H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; GAITIS, G.; MOSCHONAS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, p.307-317, 2005.

EATON,TJ.,GASSON,MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potencial of genetic esechange between food and medical samples. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 1628-1635, 2001.

EL-SODA, M., AYAD, E.H.E., NASHAT, S., EL-SADEK, N., METWALY, H. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. Egypt. **Food Microbiology** 21, 715–725, 2004.

EMBRAPA, (2011) Empresa Brasileira de Agropecuária. Estatísticas do leite. Disponível em:
<<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>
> acesso em 02/09/2011.

EPAGRI, (2011) Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Disponível: <<http://www.epagri.sc.gov.br/>> acesso: 23/02/2011.

FAO/WHO. Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food. Córdoba, Argentina, **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization**, pp 1–34, 2001

FIMLAND, G., JOHNSEN, L., DALHUS, B., NISSEN-MEYER, J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. **Journal of Peptide Science**. v. 11, 688–696., 2005.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology** , v. 155, n. Pt 6, p. 1749-57, 2009.

FLEMING, H.P.; ETCHELLS, J.L.; COSTILOW, R.N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. **Applied Microbiology**, v.30, n.6, p.1040-1042, 1975.

FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; VUYST, L. DE. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows milk. **International Dairy Journal**, 19, 3-11, 2009.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68-69, p. 70-77, 2000.

FRANZ C.M, WOROBO R.W, QUADRI LEN, SCHILLINGER U, HOLZAPFEL W.H, VEDERAS J.C, STILES M.E. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. **Applied and Environmental Microbiology** , v.65, 2170–2178, 1999.

FRANZ, C. M. A. P., M. J. VAN BELKUM, W. H. HOLZAPFEL, H. ABRIOUEL, AND A.GALVEZ. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology**. Rev. 31:293–310 2007.

FRANZ, C. M. A. P.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B.; YOUSIF, N. M. K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W. H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.4385-4389, 2001.

FRANZ C.M.A.P.; SPECHT I.; HABERER P.; HOLZAPFEL W.H. Bile Salt Hydrolase Activity of Enterococci Isolated from Food: Screening and Quantitative Determination. **Journal of Food Protection**, v.64, p. 725-729, 2001a.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.51-70, 2007.

GARNEAU, S.; MARTIN, I. N. ; VEDERAS, J.C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.84, p. 577-592, 2002.

GEVERS, D.; GEERT, H.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p.31-36, 2001.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.163-171, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.215-222, 2003.

GODFREE, A. F., KAY, D.; WYER, M. D. *Streptococci faecal* as indicators of faecal contamination in water. **Soc Appl Bacteriol Symp** Ser 26, p.110 -119, 1997.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C.; FELIS, G.E.; SECHI, L.A.; FRANCO, B. D.G.M.; DE MARTINIS, E.C.P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, p.668-675, 2008.

GRANDE, MA.J., LUCAS, R., ABRIOUEL, H., VALDIVIA, E., BEN OMAR, N., MAQUEDA, M., MARTÍNEZ-BUENO, M., MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M., GÁLVEZ, A. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology** 106, 185–194, 2006.

GUERRA, Maria Manuela. M.; BERNARDO, Fernando M. A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Altanejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Lisboa, v. 96, p. 65-69, 2001.

HARRIS, L.J.; DAESCHEL, M.A.; STILES, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.51, p.29-31, 1989.

HENKER J.; LAASS, M.; BLOKHIN, B.M.; BOLBOT, Y.K.; MAYDANNIK, V.G.; ELZE, M.; WOLFF, C.; SCHULZE, J. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. **European Journal of Pediatrics**, v. 166, n. 4, p. 311–318, 2007.

HERNÁNDEZ, P.X.; ÁLVAREZ, M.S.; MARTÍN, C.F. A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 42, p.273-277, 2002.

HERRANZ, C.; MUKHOPADHYAY, S.; CASAUS, P.; MARTINEZ, J.; RODRIGUEZ, J. M.; NES, I. F.; CINTAS, L. M.; HERNÁNDEZ, P. E. Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. **Current Microbiology**, v.39, p.282-290, 1999.

HERREROS MA, ARENAS R, SANDOVAL MH, CASTRO JM, FRESNO JM Y TORNADIJO ME. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. **International Dairy Journal**, 17: 328-335, 2007.

HOLZAPFEL, H. W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p.365-373, 2001.

HUGAS , M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat science**, v.49, n.98, p. 139-150, 1998.

JACKSON, C. R.; FRDORKA-CRAY, P. J.; BARRETT, J.B. Use of a Genus –and- Species – specific Multiplex pCR for identification of Enterococci. **Agriculture**, v. 42, n.8, p.3558-3565, 2004.

JONES, R. J.; HUSSEIN, H.M.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL, G.; TAGG, J. R. Isolation of lactic bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. **Food microbiology**. v. 25, n.2, p.228-234, 2008.

KAISER, A.L; MONTVILLE, T.J. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p. 4529–4535, 1996.

KAYAOGLU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. **Critic Review Oral Biology Medicine**. v.15, p. 308-320, 2004.

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, 255-262, 2003.

KHAN, H.; FLINT, S.; YU, P.-L. Enterocins in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 1-10, 2010.

KE, D.; PICARD, F.J.; MARTINEAU, F.; MÉNARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of a PCR Assay for Rapid Detection of *Enterococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n°11, p.3497-3503, 1999.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, 123 - 131, 2003.

KRUIS W, FRIC P, POKROTNIEKS J, LUKAS M, FIXA B, ET AL. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. **Gut** 53: 1617–1623 (2004).

LEROY, F.; DEVUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p. 67-78, 2004.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, 13, 145-150, 1991.

LINE, J.E; SVETOCH, E.A; ERUSLANO, V. V.; PERELYGIN, E.V; MITSEVICH, I.P.; LEVCHUK, V.P.; SVETOCH, O.E. , SEAL, B.S.; SIRAGUSA, G.R.; STERN, N.J. Isolation and Purification of Enterocin E-760 with Broad Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p. 1094–1100, 2008.

LUPSKI, J. R., WEINSTOCK, G. M. DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal Bacteriology**. V.174, p. 4525–4529, 1992.

MANNU, L.; PABAA, E. A.; COMUNIANA, D. R.; ZANETTIB, S.; DUPRE, I.; SECHI, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance

between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.291-304, 2003.

MARUGG, J.D. ; GONZALEZ,C.F.; KUNKA, B.S. ; LEDEBOER, A.M. ; PUCCI, M.J. ;TOONEN, M.Y. ; WALKER, S.A. ; ZOETMULDER,L.C. ; VANDENBERGH, P.A. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2360–2367, 1992.

MARCOS, B.; AYMERICH, T.; MONFORT, J.M.; GARRIGA, M. Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, n.1, p.152-158, 2007.

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SINGH, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**, v.9, p.190-198, 2008.

MONTVILLE, T.J.; KAISER, A. Antilisterial proteins classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins, In: HOOVER, D.G.; STEENSON L.R. (ed.), Bacteriocins of lactic and bacteria. New York, **Academic Press**, p. 1-22, 1993.

MORAES, P.M. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo frescal, pesquisa de genes associados à produção de bacteriocinas e detecção de fatores de patogenicidade em *Enterococcus spp.*** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2011.

MORAES, PM ; PERIN, L.M.; ORTOLONI, M.B.T.; Yamazi,A.K.; Viçosa, G.N.; Nero, L.A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **Food Science and Technology**. Viçosa, v.43, p.1320-1324, 2010.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.130-136, 1999.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. **Society**, v. 13, n. 4, 2000.

MURRAY, B.E; WEINSTOCK, G. M. Enterococci: New Aspects of an Old Organism. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v.111, p.328-334, 1999.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Determinação da compatibilidade de desenvolvimento de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29,167-170, 2009.

NALLAPAREDDY, S.R.; QIN, X.; WEINSTOCK, G. M.; HOOK, M.; MURRAY, B.E. Mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen tipe IV and laminin as well as collagen type I enterococcus faecalis adhesin, Ace. **Society**, v. 68, p.5218-5224, 2000.

NASER, S.M.; THOMPSON, F.L.; HOSTER, B.; GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species basead on *rpoA* and *pheS* genes. **Microbiology**, v.151, 2141-2150, 2005.

NES, I.F e JOHNSBORD,O. Exploration of antimicrobial potencial in LAB by genomic. **Current Opinium Biotechmology**,15,100-104, 2004.

NES, I., DZUNG, B.D., HA^oVARSTEIN, L.S., BRURBERG, M.B., Biosynthesis of bacteriocins of lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 70, 113– 128, 1996.

OGIER, J.C., SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus. **International Journal Food Microbiol.** 126, 291- 301, 2008.

OLIVEIRA, R.B.P., OLIVEIRA, A., GLÓRIA B.M. Screening of lactic acid bacteria from vacuum packaged beef for antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, 368-374, 2008.

ORTOLANI, Maria Beatriz Tassinari. **Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ÖZDEMİR, G. B.; ORYAŞIN, E.; BIYIK, H. H.; ÖZTEBER, M.; BOZDOĞAN, B. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 182-187, 2011.

PANGALLO D, HARICHOVA J, KARELOVA E, DRAHOVSKA H, CHOVANOVA K, FERIANE P, TURNA J, TIMKO J. Molecular investigation of enterococci isolated from different environmental sources. **Biology** 59:829–837, 2004.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50,p. 521-542, 2007.

PASCHOALIN V. M. F., BELLEI B., MIGUEL M., MERE DEL AGUILA E. M., SILVA J. T. Purification of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* and its effectiveness for preservation of fresh-cut lettuce. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v.3(5), 119-125, 2011.

PETERS, J.; MAC.K, WICHMANN-SCHAUER, H., KLEIN, G., ELLERBROEK, L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. **International Journal of food Microbiology**.88, 311-314, 2003.

POETA, P; COSTA, D.; ROJO-BEZARES,B.; ZARAZAGA , M.; KLIBI, N.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin

structural genes in faecal enterococci of wild animals. **Microbiological Research**. v.162, p. 257-263, 2007.

POPPI, L.B; MANCILHA, I.M; Ferreira, A.J.P.; LEAL, D.D.M. Nota prévia: Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.11, 113-119, 2008.

RENYE, J. A; SOMKUTI, G. A; PAUL, M.; HEKKEN, D. L. VAN. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style cheeses. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 261-8, 2009.

REYNOLDS, R.; POTZ, N.; COLMAN, M; Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001-2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.6, p.1018 -1032, 2004

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Conscientiae Saúde**, 1, 9-15, 2002.

SEMEDO, T.; SANTOS, M. A.; LOPES, M. F. S.; MARQUES, J. J. F.; CRESPO, M. T. B.; TENREIRO, R. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: A common trait in the genus? **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p.13-22, 2003.

SOBRINO-LOPEZ, A.; VIEDMA-MARTÍNEZ, P.; ABRIQUEL, H.; VALDIVIA, E.; GÁLVEZ, A.; MARTIN-BELLOSO, O. The effect of adding antimicrobial peptides to milk inoculated with *Staphylococcus aureus* and processed by high-intensity pulsed-electric field. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 2514-2523, 2009.

STERR, Y.; WEISS, A.; SCHMIDT, H. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. **International journal of food microbiology**, v. 136, n. 1, p. 75-82, 2009.

STROMPFOVÁ, VIOLA; LAUKOVÁ, A.; SIMONOVÁ, M.; MARCINÁKOVÁ, M. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. **Veterinary microbiology**, v. 132, n. 3-4, p. 293-301, 2008.

STROMPFOVÁ V, MARCINÁKOVÁ M, SIMONOVÁ M, GANCARCŮ I KOVÁ S, JONECOVÁ Z, SCIRANKOVÁ L', et al. *Enterococcus faecium* EK13 – an enterocin A-producing strain with probiotic character and its effect in piglets. **Anaerobe**. v.12, p.242– 248, 2006.

SUJATA M. BHAVNANI S.M; , DRAKE, J. A., FORREST, A.; DEINHART J. A.; JONES R. N.; BIEDENBACH, D.J.; BALLOW, C. H. A nationwide, multicenter, case-control study comparing risk factors, treatment, and outcome for vancomycin-resistant and susceptible enterococcal bacteremia. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**. v. 36, p. 145-158, 2000.

SVEC, P.; VANCANNEYT, M.; DEVRIESE, L.A.; NASER, S.M.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; HOSTE, B.; SWINGS, J. *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, 2183–2187, 2005.

TAMIME, A.Y. Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 2-15, 2002.

TECHERA, Silvana Carro. **Atividade anti *Listeria monocytogenes* de bactérias ácido lácticas isoladas em queijos artesanais produzidos na região de Pelotas, Brasil**. 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. (Org.). Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção. **Universidade Federal de Viçosa**, v. 1, p. 35-60, 2003.

TEUBER, M.; MEILE, L. SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.76, p.115-137, 1999.

TODOROV, S D; HO, P.; VAZ-VELHO, M.; DICKS, L M T. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. **Meat science**, v. 84, n. 3, p. 334-43, 2010.

TOPISIROVIC, L., JOKOVIC, N., NIKOLIC, M., BEGOVIC, J., JOVCIC, B., SAVIC, D. A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. **International Journal of Food Microbiology**, 127, 305–311, 2008.

TREITMAN A.N; YARNOLD P.R; WARREN J. e NOSKIN G.A. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). **Journal Clinical Microbiology**, v.43, p. 462–463, 2005.

UKENA, S.N.; SINGH, A.; DRINGENBERG, U. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Inibits Leaky Gut By Enhancing Mucosal Integrity. **Plos One**, V.2, N.12, P 1308, 2007

VALENZUELA, A.S.; BEN-OMAR, N.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; VELJOVIC, K.; CAÑAMERO, M.M.; TOPISIROVIC, M.K.L.; GÁLVEZ, A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. **Food Control**, v.20, p.381-385, 2009.

VAN DEN BERGHE, E.; DE WINTER, T.; DE VUYST, L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p. 159-170, 2006

VANCANNEYT, M., LOMBARDI, A., ANDRIGHETTO, CH., KNIJFF, E., TORRIANI,S., BJO`RKROTH, K.J., FRANZ, CH.M.A.P., FOULQUIE´ MORENO, M.R.,REVETS, H., DE VUYST, L., SWINGS, J., KERSTERS, K., DELLAGLIO, F.,HOLZAPFEL, W.H. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology** 68, 1381– 1391, 2002.

VIDEIRA, P.M.; ABRIQUEL, H.; SOBRINO LÓPEZ, A.; OMAR, N.B; LÓPEZ,R.L.; VALDIVIA, E.; BELLOSO, O.M.; GÁLVEZ, A. Effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against the spoilage bacterium *Lactobacillus diolivorans* in apple juice. **Food Microbiology**, v.26, p. 491-496, 2009.

WILLEMS RJ, HOMAN W, TOP J. Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **Lancet** , v. 357, p.853–855 (2001).

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology**. v. 51, p.221-271, 1987.

WEISBURG, W.G. ; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A. ; LANE, D.J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

ZAFALON, L.F. ; LANGONI, H.; BROCCOLO, C.R.; BENVENUTTO,F.; CASTELANI, L. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, p. 56-65, 2008.

ZAHA, Arnaldo et al. **Biologia Molecular Básica**. 3.ed.Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001. 336p.

9. Anexo A - Relatório de identificação do gênero e espécie pelo sistema Vitek

®2

Universidade Federal de Pelotas

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Jul 20, 2011 14:06 GMT-03:00
Printed by: labmicro

Patient Name:
Isolate Group: WPS356-1

Patient ID:

Bionumber: 010003061731771
Selected Organism: Enterococcus faecium

Comments:	

Identification Information	Card: GP	Lot Number: 242211740	Expires: Sep 30, 2012 12:00 GMT-03:00
	Completed: Jul 19, 2011 16:56 GMT-03:00	Status: Final	Analysis Time: 5.00 hours
Selected Organism	97% Probability Enterococcus faecium		
	Bionumber: 010003061731771	Confidence: Excellent identification	
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			
Enterococcus faecium dRAF(15),			

Biochemical Details																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	+	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	-	56	PUL	-
57	dRAF	+	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

Installed VITEK 2 Systems Version: 04.02
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified: