

MARIA BEATRIZ TASSINARI ORTOLANI

**BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS AUTÓCTONES DE LEITE CRU E QUEIJO MINAS
FRESVAL: ISOLAMENTO DE CULTURAS BACTERIOCINOGÊNICAS,
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA E IDENTIFICAÇÃO
MOLECULAR**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

MARIA BEATRIZ TASSINARI ORTOLANI

**BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS AUTÓCTONES DE LEITE CRU E QUEIJO
MINAS FRESCAL: ISOLAMENTO DE CULTURAS
BACTERIOCINOGÊNICAS, CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTAGONISTA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA EM 13 DE FEVEREIRO DE 2009.

Profa. Vanerli Beloti

Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto

Prof. Antonio Fernandes de Carvalho

Profa. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

Prof. Luís Augusto Nero

Orientador

Laws of Applied Microbiology:

- ✓ The microorganism is always right, your friend and a sensitive partner.
- ✓ There are no stupid microorganisms.
- ✓ Microorganisms can and will do everything.
- ✓ Microorganisms are smarter, wiser, more energetic than chemists, engineers and others.
- ✓ If you take care of your microbial friends they will take care of your future and you will happily ever after.

(Perlman, 1979)

http://www.bios.niu.edu/becker/bios205/bios205_1w.pdf

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer ao meu orientador Prof. Luís Augusto Nero por toda real orientação, compreensão, ensinamentos e confiança. A quem devo muito dos meus méritos profissionais, por ser exemplo de inteligência, persistência e profissionalismo.

Aos Profs Paulo Sérgio de Arruda Pinto e Abelardo Silva Júnior por se fazerem presentes e contribuírem para minha formação profissional.

Aos estagiários do Laboratório de Inspeção de Produtos Animal, principalmente Gabi, Paulinha e Japa por estarem ao meu lado todos os dias (até nos finais de semana), auxiliando e muito na elaboração desse trabalho e como não podia ser diferente, por toda amizade e companheirismo.

Ao Departamento de Veterinária e seus funcionários, em especial: Dagô, Luiz Carlos e Rosi, pela presteza e atenção.

Ao Laboratório de Infectologia Molecular Animal e Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária por ter disposto suas instalações para a realização da fase final do projeto.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Veterinária, pela oportunidade de realizar o Mestrado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Ao pessoal da Universidade de São Paulo: Profa. Bernadette Franco, Kátia, Mônica e Matheus, pela ajuda e ensinamento adquirido.

Ao CERELA pelo auxílio na execução desse trabalho.

À minha família, em especial: meu pai Fábio e meus irmãos Fernando e Alexandre por terem contribuído na minha formação pessoal e estarem sempre na torcida pelo meu sucesso.

Ao meu namorado Gustavo, por lutar ao meu lado e fazer meus dias mais felizes com seu amor, amizade e dedicação.

Às verdadeiras amigas que fiz em Viçosa: Bruninha, Patrícia e Pedrinho, por todas as risadas e conversas. Também à turma dos Porecas, pelos momentos de descontração. E aos velhos amigos, que mesmo que distantes fisicamente, estão presentes diariamente em minha vida.

E por fim, à família Pena e Rigueira que me recebeu de braços abertos em sua casa, me dando todo o suporte familiar e carinho.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
Referências bibliográficas	16
OBJETIVOS	26
Objetivo geral	26
Objetivos específicos	26
CAPÍTULO 1: Qualidade e segurança microbiológica de leite cru e queijo minas frescal e detecção de bactérias ácido lácticas autóctones com atividade antagonista em relação à <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella sp.</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Resumo	28
Abstract	29
Abstract	29
Introdução	30
Material e Métodos	31
Amostras e diluição	31
Caracterização microbiológica	31
Atividade antagonista de BAL naturalmente presentes em leite cru e queijo minas frescal	33
Análise dos dados	34
Resultados e Discussão	34
Agradecimentos	40
Referências bibliográficas	40
Capítulo 2: Produção de bacteriocinas e identificação molecular de bactérias ácido lácticas naturalmente presentes na microbiota de leite cru e queijo minas frescal	47
Resumo	48
Abstract	49
Introdução	50
Material e Métodos	51

Coleta de amostras e isolamento de bactérias ácido lácticas	51
Atividade antagonista de BAL naturalmente presente nas amostras	52
Análises genéticas das culturas de BAL bacteriocinogênicas.....	53
Resultados e Discussão	55
Agradecimentos.....	62
Referências bibliográficas.....	63
CONCLUSÕES GERAIS	70
ANEXOS	72
Meios de cultura e reagentes utilizados	73
Resultados detalhados	77
Capítulo 1	77
Capítulo 2.....	84

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1. Árvore filogenética dos gêneros de bactérias ácido lácticas baseada na comparação de análise de sequencia 16S rRNA (Holzapfel et al., 2001). 5
- Figura 2. Mecanismos de ação das bacteriocinas de bactérias ácido lácticas segundo sua classificação em uma célula bacteriana Gram positiva (Cotter et al., 2005). 11

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Identificação molecular da região conservada 16S rRNA (~500 pb) através da reação de polimerase em cadeia. (M: marcador de 100 pb; N: controle negativo)..... 57
- Figura 2. Identificação molecular do genes codificadores de nisina: nisaf1-nisar2 (~160 pb); nisaf2-nisbr3 (~270 pb); nisaf1-nisbr3 (~430 pb) através da reação de polimerase em cadeia. (M: marcador de 100 pb; N: controle negativo; P: controle positivo)..... 60
- Figura 3. Agrupamento genético baseado na sequência parcial de nucleotídeos do *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, identificação por sequenciamento genético, sensibilidade a enzimas e presença de genes relacionados à codificação de nisina de culturas de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas isoladas de leite cru e queijo minas frescal. O comprimento da barra horizontal dos grupos é proporcional à distância genética entre os isolados. Os números sobre os grupos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas. 61

ANEXOS

Capítulo 1

- Figura 1. Halos de inibição (setas) observados no teste de detecção de atividade antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas minas frescal. Cultura indicadora de sensibilidade: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. 83

Figura 2. Halos de inibição (setas) observados no teste de detecção de atividade antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas minas frescal. Cultura indicadora de sensibilidade: <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.	83
---	----

Capítulo 2

Figura 1. Halos de inibição (setas) observados no teste de detecção de atividade bacteriocinogênica de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas minas frescal. Cultura indicadora de sensibilidade: <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.	86
--	----

Figura 2. Halo de inibição (seta) observado no teste de detecção de atividade bacteriocinogênica de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas minas frescal. Cultura indicadora de sensibilidade: <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.	86
---	----

Figura 3. Teste de confirmação de natureza protéica de substâncias antagonistas produzidas pela cultura 51M8. Enzimas pepsina e α -quimotripsina, cultura indicadora de sensibilidade: <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.	87
---	----

Figura 4. Teste de confirmação de natureza protéica de substâncias antagonistas produzidas pela cultura 51M8. Enzimas proteinase K e tripsina, cultura indicadora de sensibilidade: <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.	87
---	----

Figura 5. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 48M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.	88
---	----

Figura 6. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 31M7, e identificação segundo banco de dados BLAST.	89
---	----

Figura 7. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 17M2, e identificação segundo banco de dados BLAST.	90
---	----

Figura 8. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 54M1, e identificação segundo banco de dados BLAST.	91
---	----

Figura 9. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 03M4, e identificação segundo banco de dados BLAST.	92
---	----

Figura 10. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 48M5, e identificação segundo banco de dados BLAST.	93
Figura 11. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 38M2, e identificação segundo banco de dados BLAST.	94
Figura 12. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 04M2, e identificação segundo banco de dados BLAST.	95
Figura 13. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 54M2, e identificação segundo banco de dados BLAST.	96
Figura 14. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 22M8, e identificação segundo banco de dados BLAST.	97
Figura 15. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 53M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.	98
Figura 16. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 51M8, e identificação segundo banco de dados BLAST.	99
Figura 17. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 46M6, e identificação segundo banco de dados BLAST.	100
Figura 18. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 03M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.	101
Figura 19. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 19M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.	102
Figura 20. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 24M2, e identificação segundo banco de dados BLAST.	103
Figura 21. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 52M8, e identificação segundo banco de dados BLAST.	104
Figura 22. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 32M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.	105
Figura 23. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 43M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.	106
Figura 24. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 53M6, e identificação segundo banco de dados BLAST.	107

LISTA DE QUADROS E TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1. Exemplos de bacteriocinas já isoladas (Chen & Hoover, 2003 - modificado)	13
--	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Frequências de leite cru e queijo minas minas frescal feito de leite cru com diferentes níveis de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), <i>Escherichia coli</i> (EC), bactérias ácido lácticas (BAL) e Estafilococos coagulase positivos (ECP).....	36
--	----

Tabela 2. Parâmetros de correlação entre bactérias ácido lácticas (BAL) e contagens de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), <i>Escherichia coli</i> (EC), bactérias ácido lácticas (BAL) e Estafilococos coagulase positivos (ECP) obtidos de amostras de leite cru e queijo minas minas frescal feito de leite cru... 38	
---	--

Tabela 3. Frequências de amostras de leite cru e queijo minas minas frescal feito de leite cru que apresentaram bactérias ácido lácticas autóctones com atividade antagonista contra <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>Lactobacillus sakei</i>	39
--	----

Tabela 4. Frequências de culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de amostras de leite cru e queijo minas minas frescal produzido com leite cru com atividade antagonista contra <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , e <i>Lactobacillus sakei</i>	39
---	----

CAPÍTULO 2

Quadro 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizados na detecção por reação em cadeia da polimerase de genes relacionados a produção de nisina (Espeche et al., 2008).....	55
--	----

Tabela 1. Padrão de sensibilidade enzimática de substâncias antimicrobianas produzidas por culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas minas frescal.	56
--	----

Tabela 2. Identificação de culturas de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas isoladas de leite cru e queijo minas minas frescal e informações genéticas obtidas por sequenciamento do gene 16S rRNA.	58
--	----

ANEXOS

Capítulo 1

Tabela 1. Contagens de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), <i>Escherichia coli</i> (EC) e Bactérias Ácido Lácticas (BAL), Estafilococos coagulase positivos (ECP), <i>Listeria monocytogenes</i> (LM) e <i>Salmonella sp.</i> (SAL) de amostras de leite cru e queijo minas minas frescal produzido com leite cru na região de Viçosa, MG valores em Unidades Formadoras de Colônias/mL ou gr).	77
---	----

Tabela 2. Raio dos halos de inibição (mm) verificados no teste de antagonismo das culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas frescal contra <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Lactobacillus sakei</i>	80
--	----

Capítulo 2

Tabela 1. Raio dos halos de inibição (mm) verificados no teste de atividade bacteriocinogênica das culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas frescal contra <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Lactobacillus sakei</i> , características morfológicas e produção de catalase.	84
---	----

RESUMO

ORTOLANI, Maria Beatriz Tassinari, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular.** Orientador: Luís Augusto Nero. Co-orientadores: Vanerli Beloti e Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

A qualidade microbiológica do leite cru brasileiro é reflexo das precárias condições de higiene usualmente observadas em sua produção. Como consequência, esse produto e seus derivados apresentam altas contagens de microrganismos indicadores de higiene, sugerindo a presença de patógenos. Entretanto, devido a sua fraca capacidade de competição, os patógenos sofrem interferência direta da microbiota autóctone desses produtos. Essa interação é confirmada pela baixa ocorrência desses microrganismos em leite e derivados com elevadas contagens de indicadores de higiene. As bactérias ácido lácticas (BAL) são os principais componentes da microbiota láctea que determinam essa interferência, pela habilidade de produzir diversas substâncias com atividade antimicrobiana, como as bacteriocinas. Diversas bacteriocinas são descritas na literatura, como nisina, plantaricina e enterocinas, e são caracterizadas por possuírem atividade antagonista contra diversos patógenos e microrganismos deteriorantes, sendo frequentemente utilizadas como ferramentas para garantia da segurança alimentar. Os objetivos desse estudo foram caracterizar a microbiota de amostras de leite cru e queijo minas frescal, relacionar as populações de BAL com a de outros grupos naturalmente presentes, detectar BAL com atividade antagonista e caracterizar sua natureza bacteriocinogênica, identificar essas culturas por sequenciamento genético, e detectar a presença de genes codificadores de nisina. Amostras de leite cru (n = 36) e queijo minas frescal produzido com leite cru (n = 18) foram coletadas na região de Viçosa, MG e submetidas à pesquisa de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *Escherichia coli*, BAL, Estafilococos coagulase positivos (ECP), *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.* A partir das placas semeadas para enumeração de BAL, 389 culturas foram aleatoriamente selecionadas e avaliadas quanto à produção de substâncias antimicrobianas com atividade contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium e *Lactobacillus sakei*, e quanto à produção de bacteriocinas contra *L. monocytogenes*. Vinte culturas identificadas como bacteriocinogênicas foram submetidas a testes enzimáticos para

confirmação da natureza protéica, à identificação molecular e análise filogenética. O DNA das culturas identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foram submetidas à reação em cadeia da polimerase para detecção de genes codificadores de nisina. As amostras analisadas apresentaram altas contagens de indicadores de higiene e BAL, baixas contagens de *E. coli* e ECP e ausência de *Salmonella sp.* ou *L. monocytogenes*. As populações de BAL apresentam alta correlação com as populações de aeróbios mesófilos, sugerindo a participação efetiva desse grupo na microbiota das amostras. Foram observadas altas frequências de amostras contendo BAL com atividade antagonista contra os microrganismos alvo, com exceção à *S. Typhimurium*. Cinquenta e oito (14,9%) culturas de BAL apresentaram atividade bacteriocinogênica contra *L. monocytogenes*. As culturas submetidas à confirmação da natureza protéica das substâncias antimicrobianas apresentaram distintos padrões de sensibilidade a enzimas, confirmando a produção de bacteriocinas. As culturas bacteriocinogênicas foram identificadas como *Lactobacillus plantarum* (2) e *Lc. lactis* subsp. *lactis* (18), com similaridade genética em diferentes isolados, e agrupadas em diferentes grupos filogenéticos. Das 18 culturas identificadas como *Lc. lactis* subsp. *lactis*, 7 apresentaram genes relacionados a codificação de nisina. Os resultados obtidos indicam a presença de BAL bacteriocinogênicas como constituintes da microbiota de leite cru e queijo minas frescal, com potencial antagonista contra patógenos. Essas culturas apresentaram diferentes perfis genéticos e quanto à produção de bacteriocinas, revelando seu uso potencial no controle de *L. monocytogenes* em alimentos.

ABSTRACT

ORTOLANI, Maria Beatriz Tassinari, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2009. **Autochthonous lactic acid bacteria from raw milk and soft cheese: screening of bacteriocinogenic cultures, characterization of antagonistic activity and molecular identification.** Adviser: Luís Augusto Nero. Co-Advisers: Vanerli Beloti and Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

The poor microbiological quality of Brazilian raw milk as a result of poor hygienic conditions usually observed during the production. As consequence, raw milk and dairy products present high levels of hygiene indicators microorganisms, suggesting the presence of pathogens. However, pathogens have low competitive ability, suffering direct interference of the autochthonous microbiota of these products. This interference is confirmed by the low occurrence of pathogens in milk and dairy products with poor microbiological quality. Lactic acid bacteria (LAB) are the main member of dairy microbiota that establishes this interference, due their ability of producing several antimicrobial substances, like bacteriocins. Innumerable bacteriocins are described in literature, such as nisin, plantaricin and enterocins, and they are characterized by their antagonistic activity against pathogens and spoilage microorganisms, and they are often used as tools for food safety. The objectives of this study were characterize the microbiota of raw milk and soft cheese, associate the LAB population with other microbiological indicators, detect LAB that present antagonistic activity and characterize their bacteriocinogenic nature, identify the antagonistic cultures by genetic sequencing, and detect the presence of nisin genes. Raw milk samples (n = 36) and raw milk soft cheese (n = 18) were collected in Viçosa region, MG and submitted to microbiological analysis for mesophilic aerobes, total coliforms, *Escherichia coli*, LAB, Coagulase positive *Staphylococcus* (CPS), *Listeria monocytogenes* and *Salmonella sp.* Considering the LAB enumeration plates, 389 cultures were randomly selected and evaluated to the production of antimicrobial substances against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium and *Lactobacillus sakei*, and to the production of bacteriocins against *L. monocytogenes*. 20 bacteriocinogenic cultures were submitted to enzymatic tests to confirm the protein nature of antagonistic substances, molecular identification by genetic sequencing and phylogenetic analysis. The cultures identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* were submitted to polymerase chain

reaction in order to detect genes related to nisin codification. The analyzed samples presented higher counts of hygiene indicators microorganisms and LAB, low counts of *E. coli* and CPS, and absence of *Salmonella sp.* and *L. monocytogenes*. LAB populations presented high correlation indexes with mesophilic aerobes, suggesting the effective participation of this group in the microbiota of the samples. It was observed high frequencies of samples presenting autochthonous LAB with antagonistic activity against the target microorganisms, except against *S. Typhimurium*. 58 (14.9%) LAB cultures presented bacteriocinogenic activity against *L. monocytogenes*. The LAB cultures submitted to enzymatic tests presented distinct patterns of enzymes sensitivity, confirming the bacteriocins production. The bacteriocinogenic cultures were identified as *Lb. plantarum* (2) and *Lc. lactis* subsp. *lactis* (18) with genetic similarity to several strains and grouped in distinct phylogenetic groups. Considering the 18 *L. lactis* subsp. *lactis*, 7 presented genes related to nisin codification. The obtained results indicate the presence of bacteriocinogenic LAB as natural compounds of raw milk and soft cheese microbiota, presenting antagonistic activity against pathogens. The wide variability genetic and bacteriocins production of these cultures indicate their potential for controlling *L. monocytogenes* in foods.

INTRODUÇÃO GERAL

A qualidade microbiológica encontrada no leite cru produzido no Brasil é reflexo das precárias condições de higiene típicas da produção nacional. Associado a isso, o comércio informal desse produto e seus derivados é uma realidade em diversas regiões do país, o que pode representar um risco microbiológico aos consumidores devido à possibilidade de veiculação de microrganismos patogênicos. Entretanto, fatores intrínsecos e extrínsecos podem interferir na contaminação, sobrevivência e multiplicação de patógenos, reduzindo o número de ocorrências de enfermidades associadas ao consumo de alimentos. Dentre esses fatores, a microbiota autóctone de leite cru e derivados é considerada como o principal interferente.

As bactérias ácido lácticas (BAL), especificamente, compõem essa microbiota de forma significativa e são apontadas como as principais responsáveis pela inibição e destruição de outros microrganismos, incluindo os patogênicos. BAL são utilizadas como culturas iniciadoras em alimentos fermentados, possuem ação probiótica e também são conhecidas pela produção de várias substâncias antimicrobianas, potencialmente utilizadas na bioconservação de alimentos. As principais substâncias antimicrobianas produzidas por BAL são ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono e bacteriocinas. As bacteriocinas, em especial, são peptídeos biologicamente ativos que apresentam atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, inclusive patógenos. Dentre as diversas bacteriocinas já descritas, nisina é a mais estudada e a única considerada totalmente segura para ser utilizada em alimentos.

A identificação de BAL naturalmente presentes em leite cru e derivados com atividade antimicrobiana é de extrema importância para se elucidar as interações microbianas que ocorrem nesses alimentos e explicar a baixa ocorrência de microrganismos patogênicos. Para isso, o uso de metodologias convencionais para identificação de atividade antimicrobiana, associadas a metodologias moleculares para identificação dos isolados e detecção de genes codificadores de bacteriocinas, são fundamentais para a caracterização do potencial antimicrobiano de BAL. A partir dessa caracterização precisa, as culturas de BAL podem ser utilizadas em indústrias de alimentos como ferramentas importantes para a garantia a qualidade e segurança microbiológica de leite e derivados.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção leiteira no Brasil possui relevante importância nos mercados nacional e internacional, e contribui consideravelmente para a economia do país. Em Minas Gerais a produção de leite assume um papel representativo, uma vez que esse Estado é o maior produtor nacional (EMBRAPA, 2008) e essa atividade é base para a economia de vários produtores rurais. Embora importante para a economia nacional, o perfil das fazendas leiteiras ainda se resume a pouca ou nenhuma tecnificação, com condições higiênicas insatisfatórias e controle sanitário ineficiente (Nero et al., 2009; Arcuri et al., 2006).

Como consequência dessa situação, o leite produzido no Brasil apresenta baixa qualidade microbiológica, verificada por altas contagens de microrganismos indicadores de higiene, como aeróbios mesófilos e coliformes (Nero et al., 2009; Nero et al., 2004; Feitosa et al., 2003). Apesar dessas características, grande parte da produção leiteira no Brasil é comercializada informalmente para consumo, isto é, sem nenhum tipo de fiscalização (EMBRAPA, 2008). Além do leite cru, derivados desse produto também são amplamente consumidos pela população, como queijos artesanais, sendo produzidos nas mesmas condições insatisfatórias de higiene e frequentemente não apresentam os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde (Moraes et al., 2009; Oliver et al., 2005; Feitosa et al., 2003; Loguercio & Aleixo, 2001; Carmo et al., 2002; Pereira et al., 1999).

O consumo de leite cru e derivados é motivado por hábitos alimentares bastante sedimentados na população, que acredita que esses produtos são mais saudáveis, possuem alto valor nutricional, além de possuírem preços supostamente mais acessíveis (Kaylegian et al., 2008; Arimi et al., 2005; Oliver et al., 2005). Entretanto, devido à ausência de fiscalização, fraudes e processamento térmico, esses produtos são potenciais veiculadores de agentes patogênicos, que podem contaminar o leite nas diferentes etapas de produção e processamento, além de causar enfermidades nos animais e seres humanos (Kaylegian et al., 2008; Oliver et al., 2005; Nero et al., 2004; Chambers, 2002; De Buyser et al., 2001).

Durante a ordenha, microrganismos patogênicos podem contaminar o leite através de fontes ambientais, manipuladores e dos próprios animais. Vários patógenos podem estar presentes na superfície de utensílios utilizados na ordenha,

como *Listeria monocytogenes* (Oliver et al., 2005). Mastites também são consideradas como importantes fontes de contaminação durante produção, principalmente por *Staphylococcus aureus*, que é um potencial causador de enfermidades em humanos devido à produção de enterotoxinas termoestáveis (Cremonesi et al., 2007; Oliver et al., 2005). Por fim, a água e as fezes dos animais podem contaminar todo o ambiente de ordenha e o leite, com microrganismos como *Salmonella sp.* e isolados patogênicos de *Escherichia coli* (Kaylegian et al., 2008).

Após a ordenha, as etapas de estocagem e transporte do leite cru também podem representar outras fontes de contaminação por patógenos. Durante essas etapas, a contaminação pode ocorrer via utensílios mal higienizados e conservação do leite em temperaturas inadequadas, possibilitando o desenvolvimento de eventuais patógenos presentes nesse produto (Callaway et al., 2006). Na indústria, novamente os utensílios e equipamentos podem representar importantes fontes de contaminação, além de falhas nos processos industriais, que poderão ser ineficazes na eliminação de patógenos presentes na matéria-prima (Oliver et al., 2005). Vários trabalhos têm demonstrado a importância de leite cru e seus derivados como potenciais veiculadores de agentes causadores de enfermidades associadas a alimentos, como *Salmonella sp.*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* enterotoxigênica e enterohemorrágica, *Brucella abortus* e *Campylobacter jejuni* (Vanegas et al., 2009; Heuvelink et al., 2008; Cremonesi et al., 2007; Arimi et al., 2005; Leclerc et al., 2002; De Buyser et al., 2001).

Alimentos potencialmente contaminados com patógenos podem representar um risco aos consumidores, principalmente pessoas imunodeprimidas e idosos, o que tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas e programas de segurança alimentar (Callaway et al., 2006). Na maioria das vezes, essas enfermidades não são diagnosticadas ou são sub-diagnosticadas pela dificuldade e demora de detectar os casos e surtos, pela falta de amostras dos alimentos contaminados envolvidos ou mesmo pelas limitações e lentidão das metodologias analíticas usualmente empregadas no diagnóstico (Cremonesi et al., 2007; Nassib et al., 2003; Leclerc et al., 2002). Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2005), *Salmonella sp.* e *S. aureus* foram os patógenos mais relacionados a enfermidades associadas aos alimentos no Brasil entre 1999 e 2004. Resultados similares foram observados na França por De Buyser et al. (2001). Em ambos os países, leite e derivados são muitas vezes associados a surtos e casos de toxinfecções alimentares.

Apesar das diversas fontes de contaminação de patógenos em leite e derivados, vários trabalhos demonstram baixo isolamento desses microrganismos em amostras com baixa qualidade microbiológica, evidenciada por altas contagens de microrganismos indicadores de higiene (Nero et al., 2008; Franco et al., 2003; Dhanashree et al., 2003; Cordano & Rocourt, 2001; Jay, 1995). Entretanto, quando se verifica uma melhoria da qualidade microbiológica desses produtos, os patógenos tendem a se apresentar em maiores concentrações e passam a ser mais facilmente detectados (D'Amico et al., 2008; Oliver et al., 2005; Nassib et al., 2003; Leclerc et al., 2002; De Buyser et al., 2001; Guerra et al., 2001; Gaya et al., 1998). Esses dados indicam uma interferência da microbiota de leite cru e seus derivados na sobrevivência desses microrganismos, uma vez que os patógenos são conhecidos por serem maus competidores e sensíveis a pequenas modificações no meio em que se encontram (Jay, 1995). Provavelmente, as bactérias ácido lácticas (BAL) são as principais causadoras dessas interferências, pois participam de forma significativa na microbiota desses alimentos e o seu metabolismo natural gera a produção de diversas substâncias com conhecida atividade bactericida e bacteriostática.

BAL é um grande grupo de microrganismos naturalmente encontrados em alimentos, inclusive leite e derivados, que incluem os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* (Figura 1) (Holzapfel et al., 2001). Os microrganismos pertencentes a esse grupo possuem várias características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum: são Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase negativas, fastidiosas, anaeróbicas, aerotolerantes e ácidotolerantes, e possuem metabolismo fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto final (Leroy & de Vuyst, 2004; de Martinis, 2003a; Axelsson, 2004). O processo de fermentação pode ser homo ou heterofermentativo: no primeiro caso são geradas moléculas de lactato, como ocorre em *Streptococcus* e *Lactococcus*, e no segundo são produzidos lactatos, etanol e dióxido de carbono, em *Leuconostoc* e alguns lactobacilos (Parada et al., 2007).

Além de estarem naturalmente presentes em vários alimentos, BAL podem ser encontradas em solo, água, esterco, esgoto e silagem. Ainda, podem ser isolados de cavidade oral, trato digestório e vagina, onde exercem influência benéfica nos ecossistemas microbianos de seres humanos e animais (Holzapfel et al., 2001).

Vários trabalhos descrevem a participação de BAL como constituintes da microbiota de leite e seus derivados, principalmente queijos artesanais (Franciosi et al., 2009; Hajikhani et al., 2007; Veljovic et al., 2007). Entretanto, no Brasil os estudos de caracterização da microbiota láctica nesses produtos são escassos, sendo que os existentes são relacionados a queijos artesanais produzidos com leite cru e às culturas iniciadoras utilizadas (Brant et al., 2007; Cavalcante et al., 2007; Cunha et al., 2004; Castro et al., 1998).

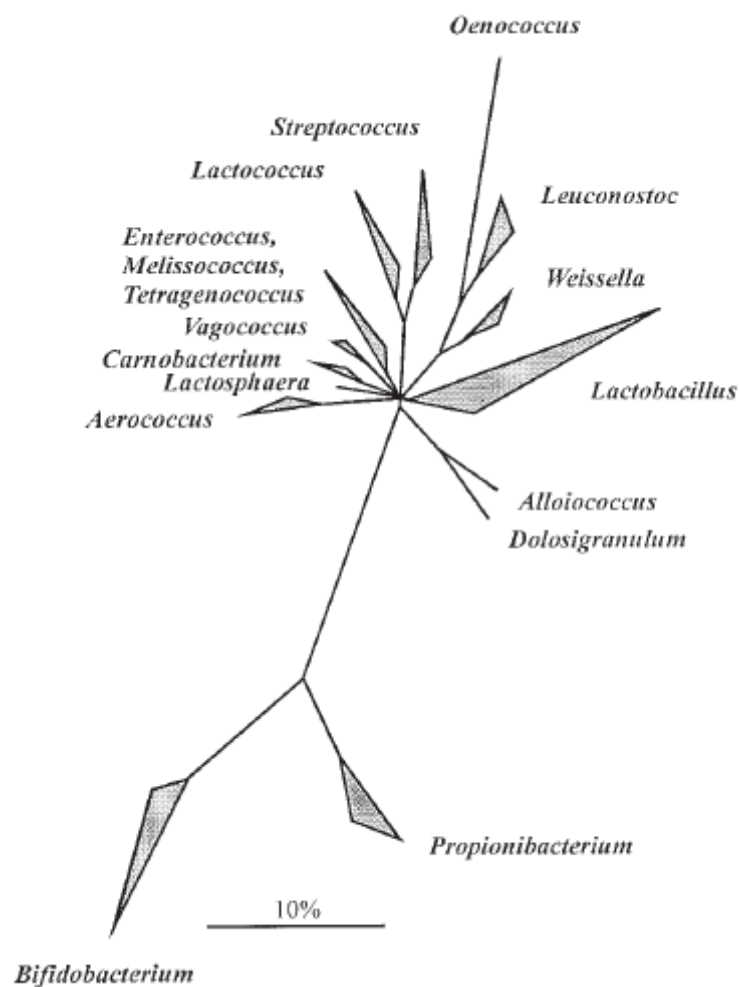


Figura 1. Árvore filogenética dos gêneros de bactérias ácido lácticas baseada na comparação de análise de sequência 16S rRNA (Holzapfel et al., 2001).

BAL possuem grande importância na indústria de alimentos e em Saúde Pública por suas características transformadoras, deteriorantes, probióticas e bioconservadoras (de Martinis et al., 2003a). Esses microrganismos são utilizados como culturas iniciadoras, provocando transformações em matérias-primas devido à

produção de ácidos e substâncias que conferem sabores e aromas específicos, originando os produtos fermentados (Rouse et al., 2007; Cotter et al., 2005; Ross et al., 2002; Kalantzopoulos, 1997). Entretanto, também podem determinar a deterioração precoce dos alimentos, pela produção de ácidos e substâncias proteolíticas (Galia et al., 2009). Algumas BAL, com características probióticas, são associadas a efeitos benéficos aos consumidores, sendo capazes de colonizar o trato gastrointestinal e promover ou dar suporte ao balanço benéfico da microbiota autóctone nesse ambiente (Pfeiler & Klaenhammer, 2007; Holzapfel et al., 2001). Finalmente, várias BAL possuem grande potencial de utilização na conservação em vários alimentos pela atividade antagonista contra microrganismos deteriorantes e patogênicos, como *L. monocytogenes* ou *S. aureus* (Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008; Coventry et al., 1997). Como vantagem adicional, a maioria das BAL são seguras para o consumo humano, não ocasionando enfermidades aos consumidores (Castellano et al., 2008; de Martinis et al., 2003a; de Martinis & Freitas, 2003).

A atividade antagonista de BAL sobre outros microrganismos ocorre por diversos mecanismos, como sensibilidade às interações microbianas, competição por nutrientes e sítios de adesão, e produção de substâncias inibitórias potencialmente letais. As principais substâncias com potencial antimicrobiano produzidas por BAL são os ácidos orgânicos (como o láctico, acético e propiônico), diacetil, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular (reuterina, reuter ciclina e ácido piroglutâmico) e bacteriocinas. Essas substâncias possuem comprovado efeito bacteriostático e/ou bactericida, e podem criar um microambiente desfavorável para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (Castellano et al., 2008; Rouse et al., 2007; Alves et al., 2006; Deegan et al., 2006; Leroy & de Vuyst, 2004; de Martinis et al., 2003a; Carr et al., 2002; Riley & Wertz, 2002; Jay, 1995; Lewus & Montville, 1991). Devido à produção dessas substâncias, BAL naturalmente presentes em quantidades significativas em leite cru e derivados podem ser consideradas como importantes fatores de inibição a alguns microrganismos patogênicos, como *L. monocytogenes* e *Salmonella sp.* (Nero et al., 2008).

A habilidade de BAL produzirem substâncias que conferem segurança e qualidade aos alimentos tem estimulado o desenvolvimento de estudos visando a detecção desses microrganismos e caracterização da atividade antimicrobiana. Essa utilização atende à crescente demanda dos consumidores por alimentos minimamente

processados, com o mínimo de conservantes e aditivos, qualidade sensorial, e ausência de perigos microbiológicos (Castellano et al., 2008; Rouse et al., 2007; Nes & Johnsborg, 2004). Dentre as substâncias com potencial antagonista produzido por BAL, as bacteriocinas possuem grande interesse pela indústria de alimentos por não provocarem alterações sensoriais e possuem atividade específica contra determinados patógenos (Hajikhani, et al., 2007). Apesar de importantes, não são todas espécies e cepas de BAL que possuem capacidade de produzir bacteriocinas (Hoover & Steenson, 1993).

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomalmente, biologicamente ativos, caracterizados pela atividade antagonista contra um grupo específico de microrganismos sensíveis da mesma espécie (estreito espectro) ou de diferentes gêneros (amplo espectro) (Cotter et al., 2005; Chen & Hoover, 2003; Carr et al., 2002). Devido a sua natureza protéica, a produção de bacteriocinas por BAL pode ser demonstrada por testes de inibição com diferentes tipos de enzimas proteolíticas (Bromberg et al., 2006; de Martinis et al., 2003b; van Reenen et al., 1998; Montville & Kaiser, 1993; Lewus & Montville, 1991; Lewus et al., 1991; Harris et al., 1989).

Para uma cultura de BAL ser considerada “bioprotetora”, não basta apenas a identificação de sua capacidade em produzir bacteriocinas, ou seja, sua natureza bacteriocinogênica. Além de ser caracterizada como não patogênica aos consumidores (Deegan et al., 2006; Wessels et al., 2004; Chen & Hoover, 2003), vários aspectos devem ser considerados para se verificar o potencial de aplicação na indústria de alimentos. A princípio, o próprio alimento do qual a cultura foi isolada seria a melhor escolha para sua aplicação (Bromberg et al., 2006; Topisirovic et al., 2006; Rodríguez et al., 2000; Schillinger & Lücke, 1989), pela maior facilidade de adaptação e produção das substâncias antimicrobianas de interesse. Independente dessa recomendação, deve ser verificado se a cultura bacteriocinogênica apresenta boa capacidade de competição com a microbiota do alimento, sem aumentar sua taxa de deterioração. Ainda, é importante verificar como fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento podem interferir na produção de bacteriocinas, bem como a sensibilidade aos diferentes tipos de processamento utilizados pela indústria (Smacchi & Gobbetti, 2000)

Alguns fatores podem comprometer a eficácia de bacteriocinas, como a emergência de microrganismos resistentes, enzimas proteolíticas não específicas,

oxidação, metais pesados, agitação excessiva, congelamento-descongelamento, ligação com componentes do alimento, divisão entre componentes apolares e polares, efeito do pH na solubilidade e faixa de pH em que ocorre maior atividade (Hoover & Steenson, 1993). A concentração das bacteriocinas em determinados alimentos também é um fator que determina a atividade antimicrobiana (Alves et al., 2006). Fatores que interferem no desenvolvimento das culturas bacteriocinogênicas também devem ser considerados, como ambientes desfavoráveis para multiplicação, perda espontânea ou redução da produção de bacteriocinas, infecção por fagos e antagonismo por outros microrganismos (Hoover & Steenson, 1993). Assim, a utilização de culturas bacteriocinogênicas na bioconservação de alimentos deve ser avaliada detalhadamente para cada sistema alimentar, além de seu espectro de ação, visando uma aplicação adequada dessas culturas no controle de patógenos ou microrganismos deteriorantes sensíveis (Alves et al., 2006).

BAL bacteriocinogênicas normalmente estão presentes em altas concentrações em leite e derivados (Rodríguez et al., 2000; Coventry et al., 1997), mas podem ser adicionadas artificialmente nesses alimentos para assegurar qualidade e segurança. Além das culturas, as bacteriocinas produzidas, purificadas ou semi-purificadas, podem ser aplicadas nesses produtos com os mesmos objetivos (Deegan et al., 2006). Em ambas as situações, a aplicação em alimentos somente pode ocorrer após essas culturas e suas bacteriocinas atingirem o status de GRAS (generally recognized as safe - usualmente reconhecido como seguro) (Deegan et al., 2006; Chen & Hoover, 2003). Essa característica é especialmente preocupante em relação a certas espécies patogênicas de *Enterococcus* que além de possuírem atividade antimicrobiana, podem apresentar alguns fatores de virulência (Ghraiiri et al., 2008; Gomes et al., 2008; Tomé et al., 2008; Han et al., 2007).

Apesar de serem descritas como portadoras de atividade antimicrobiana específica contra determinadas espécies de bactérias, as bacteriocinas podem apresentar essa mesma atividade de forma inespecífica contra espécies Gram positivas e Gram negativas que não apresentem integridade de sua membrana externa, permitindo interações com estruturas da membrana citoplasmática (Cotter et al., 2005; Wirawan, et al., 2006). Entretanto, culturas bacteriocinogênicas são imunes às próprias bacteriocinas, devido à produção de proteínas específicas de imunidade (Hoover & Steenson, 1993).

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas são classificadas de acordo com seus mecanismos de ação e particularidades de sua estrutura molecular (Deegan et al., 2006; Cotter et al., 2005; Klaenhammer, 1993). De forma geral, três classes são descritas: I e II, que são peptídeos termoestáveis com peso molecular inferior a 10 kDa, e III que são peptídeos de alto peso molecular e termolábeis. Uma quarta classe (IV) também é descrita em alguns trabalhos (Cotter et al., 2005), entretanto sem uma caracterização adequada e detalhada até o momento.

A classe I é constituída pelos denominados lantibióticos, que são pequenos peptídeos (< 5 kDa) modificados pós-translacionalmente pela formação de aminoácidos desidratados, lantioninas e metilantionina. Dentro da classe I, ainda há outra subdivisão: Ia e Ib. A subclasse Ia inclui peptídeos longos, flexíveis e com carga positiva, e determinam a destruição dos microrganismos 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 microrganismos sensíveis interferindo em suas reações enzimáticas (Deegan et al., 2006).

Na classe II são incluídos pequenos peptídeos antimicrobianos não modificados (< 10 kDa), termoestáveis e que não apresentem resíduos de lantionina (Cotter et al., 2005; Nes & Johnsborg, 2004). Esta classe é subdividida em IIa, IIb e IIc. Na subclasse IIa estão os peptídeos ativos contra *Listeria* spp., sendo conhecidos como “pediocin-like” (similares a pediocina). Na subclasse IIb estão as bacteriocinas que possuem dois peptídeos que agem sinergicamente, mesmo sendo diferentes. Por fim, a classe IIc inclui os peptídeos que requerem a presença de resíduos de cisteína na forma reduzida para que apresentem sua 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, também denominadas bacteriolisinas, pois contém em sua estrutura molecular regiões específicas com diferentes funções para translocação, receptores de ligação e atividade letal (Cotter et al., 2005).

A ação dos diferentes tipos de bacteriocinas sobre os microrganismos sensíveis ocorre por mecanismos bastante distintos (Figura 2). De uma forma geral, a bacteriocina é atraída pelas células energizadas através de uma interação inicial eletrostática. Em contato com a membrana celular, os peptídeos adotam uma

conformação em que interagem com os fosfolípidos da membrana por forças iônicas e causam um distúrbio na bicamada, determinando a formação de poros. Essa formação leva a uma dissipação do potencial de membrana e do gradiente de pH, gerando depleção do ATP intracelular e rápido efluxo de pequenos metabólitos que interrompem a biossíntese celular (Deegan et al., 2006; Héchard & Sahl, 2002).

Algumas bacteriocinas da classe I, como a nisina, apresentam dois mecanismos de ação: 1) pode ocorrer ligação com o lipídeo II, presente na membrana celular e o principal transportador de subunidades de peptídeoglicano do citoplasma para a parede celular, e em seguida impedir a síntese da parede celular de forma correta, determinando a morte celular, e 2) o lipídeo II pode ser utilizado para sua fixação e início do processo de inserção na membrana e formação do poro, determinando rapidamente a morte celular. As bacteriocinas da classe II possuem uma estrutura helicoidal anfifílica, que permite sua inserção na membrana da célula alvo, determinando sua despolarização e conseqüente morte. As chamadas bacteriolisinas agem diretamente na parede celular de bactérias Gram positivas, lisando a célula alvo (Cotter et al., 2005).

A síntese de bacteriocinas envolve quatro diferentes genes: o responsável pela produção do pré-peptídeo (pré-bacteriocina), o responsável pela produção da proteína que confere imunidade à célula produtora, o responsável pela produção das proteínas do transporte que externalizam a bacteriocina (denominado sistema de transporte ABC) e, por fim, 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 estão condensados em operons (Deegan et al., 2006) e a proteína codificada é produzida concomitantemente à bacteriocina, pois trata-se de um mecanismo de proteção das cepas bacteriocinogênicas (Wirawan, et al., 2006; Rosa & Franco, 2002).

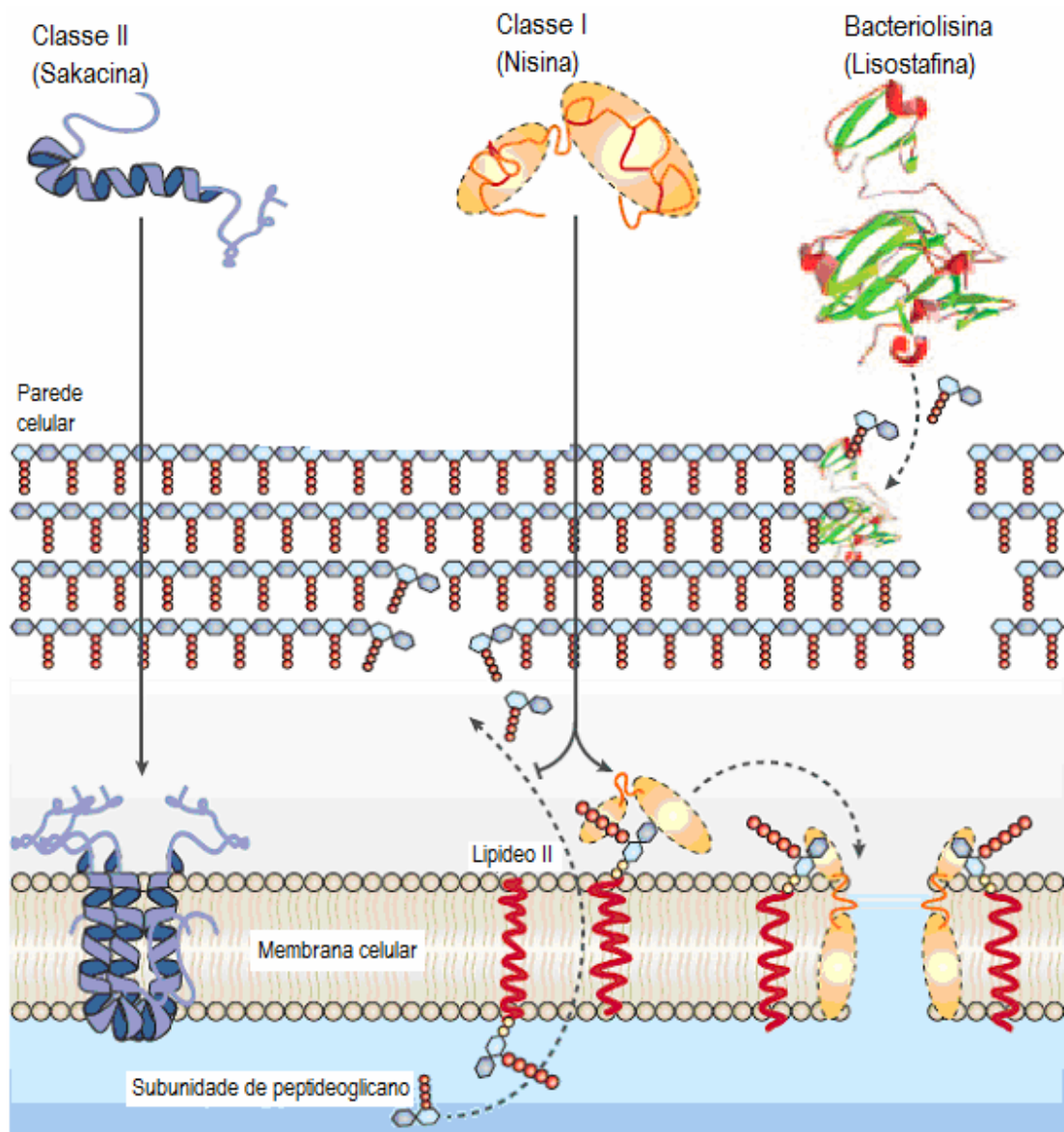


Figura 2. Mecanismos de ação das bacteriocinas de bactérias ácido láticas segundo sua classificação em uma célula bacteriana Gram positiva (Cotter et al., 2005).

A presença da membrana externa em bactérias Gram negativas restringe a ação de bacteriocinas (Deegan et al., 2006), o que já foi verificado e demonstrado em diversos trabalhos (Nero et al., 2008; Castellano et al., 2008; Bromberg et al., 2006; Coventry et al., 1997; Schillinger & Lücke, 1989). No entanto, é possível afetar a integridade da membrana externa de bactérias Gram negativas através do choque de temperatura, alta pressão e quelantes, como o EDTA, para que ocorra a interação das bacteriocinas com estruturas da parede e membrana citoplasmática e conseqüente efeito antimicrobiano (Deegan et al., 2006; Cotter et al., 2005).

Um grande obstáculo encontrado no estudo de bacteriocinas é a instabilidade na produção por inativações genômicas e definição das condições ótimas de desenvolvimento (Nes & Johnsborg, 2004). Metodologias tradicionais para detecção de bacteriocinas pode subestimar o potencial bacteriocinogênico de BAL devido à diversos fatores, como a influência das condições ambientais, capacidade de indução ou inibição de determinadas substâncias e perda da capacidade de produção, que pode ser determinada por mutação, perda ou rearranjo de genes codificadores (Gálvez et al., 2007).

Dentre as diversas bacteriocinas já isoladas e identificadas (Quadro 1), somente a nisina é considerada GRAS e utilizada comercialmente em indústrias de alimentos (Cooter et al., 2005; Chen & Hoover, 2003). Nisina é produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e é a bacteriocina mais estudada e melhor caracterizada atualmente, sendo classificada como um lantibiótico, com 34 aminoácidos e peso molecular de 3,5 KDa (monômero) (Sobrino-López et al., 2008; Rosa & Franco, 2002). Essa bacteriocina foi comercializada pela primeira vez na Inglaterra em 1953, e atualmente é aprovada como aditivo alimentar em mais de 50 países. Em 1983 foi adicionada na lista dos aditivos europeus e em 1988 foi aprovada pelo Food and Drug Administration nos Estados Unidos para o uso em queijos pasteurizados (Sobrino-López et al., 2008; Cotter et al., 2005; Chen & Hoover, 2003). No Brasil, foi aprovada pelo Ministério da Agricultura para ser utilizada em todos os tipos de queijos, inclusive os processados, numa dose máxima de 12,5 mg/kg de produto (Brasil, 1996).

Nisina tem apresentado eficiente atividade antimicrobiana em diversos sistemas alimentares, inibindo o desenvolvimento de uma ampla variedade de bactérias Gram positivas, como *L. monocytogenes*, *Bacillus* sp. e esporos de *Clostridium* sp. (Deegan et al., 2006). Entretanto, sua utilização pode ser limitada devido à interação com fosfolípidos, baixa solubilidade, distribuição desuniforme, baixa estabilidade, inativação por enzimas endógenas de alguns alimentos, inibição de culturas iniciadoras, ou ainda, pela emergência espontânea de microrganismos resistentes (Alves et al., 2006; Bromberg et al., 2006; Deegan et al., 2006). Devido a esses fatores, a identificação de novas cepas de BAL bacteriocinogênicas e a caracterização de suas bacteriocinas são de extrema importância para futura aplicação como bioconservantes em alimentos.

Quadro 1. Exemplos de bacteriocinas isoladas e identificadas (Chen & Hoover, 2003 - modificado)

Microrganismos	Bacteriocinas					
	Classe Ia lantibióticos	Classe Ib lantibióticos	Classe IIa	Classe IIb	Classe IIc	Classe III
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisina Lacticina 481		Lactococina MMFII	Lactococina M; G		
<i>Lactobacillus sakei</i>	Lactocina S		Sakacina P; A			
<i>Lactobacillus plantarum</i>				Plantaricina A; S; EF; JK		
<i>Lactobacillus helveticus</i>						Helveticina J; V-1829
<i>Lactobacillus acidophilus</i>					Acidocina B	
<i>Lactobacillus johnsonii</i>				Lactacina F		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			Mesentericina Y105			
<i>Leuconostoc gelidum</i>			Leucocina A-UAL 187			
<i>Pediococcus acidilactici</i>			Pediocina PA-1/AcH			
<i>Enterococcus faecium</i>			Enterocina A		Enterocina P; B	
<i>Carnobacterium divergens</i>			Divercina V41		Divergicina A	
<i>Carnobacterium piscicola</i>					Carnobacteriocina A	
<i>Streptomyces cinnamoneus</i>		Duramicina Cinnamicina				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Epidermina					
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Galidermina					
<i>Staphylococcus staphyloticus</i>						Lisostafina
<i>Bacillus subtilis</i>		Mersacidina				
<i>Streptomyces</i> spp.		Ancovenina				
<i>Actinoplanes</i> spp.		Actagardina				

A identificação de novas culturas de BAL bacteriocinogênicas também é justificada pela capacidade de adaptação que esses microrganismos possuem, dependendo de sua aplicação. Em condições específicas, BAL podem apresentar redução em sua capacidade biosintética, devido a degradações no genoma ocorridos durante sua evolução, e perderem ou reduzirem a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas.

A identificação de culturas de BAL bacteriocinogênicas naturalmente presentes em alimentos é usualmente realizada por testes convencionais onde é verificada a inibição de desenvolvimento de microrganismos sensíveis. A natureza protéica das bacteriocinas produzidas é determinada pela adição de enzimas proteolíticas a esses testes e verificação de ausência da atividade antimicrobiana previamente identificada (Bromberg et al., 2006; de Martinis et al., 2003b; van Reenen et al., 1998; Montville & Kaiser, 1993; Lewus & Montville, 1991; Lewus et al., 1991; Harris et al., 1989). Entretanto, para identificação de culturas bacteriocinogênicas, as metodologias moleculares representam uma ferramenta indispensável para garantia de precisão e confiabilidade dos resultados (Nes & Johnsborg, 2004). O sequenciamento genético 16S, especificamente, possui importante papel na identificação e descrição de novos isolados bacteriocinogênicos, além de permitir o estudo desses microrganismos em seus ecossistemas alimentares, determinando seu potencial bacteriocinogênico, a capacidade de proliferação e inibição de bactérias indesejáveis e resposta aos fatores de estresse (Mohania et al., 2008; Gálvez et al., 2007; Nes & Johnsborg, 2004; Holzapfel et al., 2001).

A distribuição de genes que codificam bacteriocinas entre as culturas de BAL isoladas de alimentos é um assunto que pode ser esclarecido por técnicas moleculares (Gálvez et al., 2007), pois a expressão gênica de bacteriocinas é regulada por genes usualmente organizados em agrupamentos de “operons”, que podem se localizar no cromossomo, plasmídeos, ou mesmo em “transposons” (Deegan et al., 2006; Chen & Hoover, 2003). Antes de caracterizar esses genes, é preciso caracterizar corretamente as culturas de BAL, o que pode ser realizado através do sequenciamento da porção 16S rRNA. Essa sequência é a mais comum em estudos do grupo de BAL, pois representa uma região que na evolução não foi afetada pela pressão ambiental, sendo bem conservada e comum a diversas espécies (Mohania et al., 2008; Kullen et al., 2000).

O uso das bacteriocinas é ainda limitado em produtos derivados de leite, embora seu potencial tem sido explorado industrialmente. O comportamento de BAL e sua atividade antimicrobiana contribui para a segurança microbiológica aos produtos lácteos (Sobrino-López et al., 2008) e uma vez caracterizada, estudos com BAL podem ser conduzidos para aplicações futuras na indústria de alimentos (em especial laticínios), visando a produção de alimentos microbiologicamente seguros a serem oferecidos para o mercado consumidor. A identificação da microbiota láctica antagonista é a etapa inicial de estudos mais específicos, que visam determinar quais são os fatores responsáveis por essa atividade, espectro de ação, potencial de antagonismo e purificação de substâncias inibidoras.

Referências bibliográficas

- ALVES, V. F.; MARTINEZ, R. C. R.; LAVRADOR, M. A. S.; DE MARTINIS, E. C. P. (2006) Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. *Meat Science*. 74, 623-627.
- ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.GF.; SOUZA, G.N. (2006) Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58:3, 440-446.
- ARIMI S.M.; KOROTI, E.; KANG'ETHE, E.K.; OMORE, A.O.; MCDERMOTT, J.J. (2005) Risk of infection with *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. *Acta Tropica*, 96, 1-8.
- AXELSSON, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. *Lactic Acid Bacteria - Microbiological and Functional Aspects*. 3^a ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. (2007) Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59:6, 1570-1574.
- BRASIL (1996) Ministério da Saúde. Revisão n.6 do compendio da legislação de alimentos: atos do Ministério da Saúde: ABIA, 1, 3-31.
- BRASIL (2005) Secretaria de Vigilância em Saúde ANO 5, N^o 06, Boletim eletrônico epidemiológico. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 - 2004, 28/12/2005. Disponível em www.saude.gov.br/svs.
- BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C. (2006) Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26:1, 135-144.

- CALLAWAY, T. R.; HARVEY, R. B.; NISBET, D. J. (2006) The hygiene hypothesis and foodborne illness: too much of a good thing, or is our food supply too clean? *Foodborne Pathogens and Disease*, 3:3, 217-219.
- CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, E. (2002) Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, 19, 9-14.
- CARR, F. J., CHILL, D., MAIDA, N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 28:4, 281-370.
- CASTRO, E. M. T.; FERREIRA, C. L. L. F.; VANETTI, M. C. D.; FURTADO, M. M. (1998) Caracterização de fermento artesanal empregado na fabricação de queijos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 53:304, 181-188.
- CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. (2008) A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 483-499.
- CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINHO, C. L. O.; ROJAS, E. E. G. (2007) Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 205-214.
- CHAMBERS, J.V. (2002) *The Microbiology of Raw Milk*. In: ROBINSON, R.K., *Dairy Microbiology Handbook*. Wiley-Interscience, Danves. 737p.
- CHEN, H.; HOOVER, D.G. (2003) Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Technology*, 2, 82-100.
- CORDANO, A. M.; ROCOURT, J. (2001) Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 175-178.
- COVENTRY, M. J.; GORDON, J. B.; WILCOCK, A.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B. E.; HICKEY, M.W.; HILLIER, A. J.; WAN, J. (1997) Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 248-258.

- COTTER, P. C.; HILL, C.; ROSS, R. P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews- Microbiology*, 3, 777-788.
- CREMONESI, P.; PEREZ, G.; PISONI, G.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M.; BRASCA M.; CASTIGLIONI B. (2007) Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 586-591.
- CUNHA, L. R. ; SILVA, T. T. ; PINTO, M. S. ; OLIVEIRA, F. A. ; FERREIRA, C. L. L. F. (2004) Caracterização de bactérias propiônicas endógenas, isoladas da região do Campo das Vertentes - MG. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 59:339, 314-316.
- D'AMICO, D. J.; GROVES, E.; DONNELLY, C. W. (2008) Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *Journal of Food Protection*, 71: 8, 1580-1589.
- DE BUYSER, M. L.; DUFOUR. B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. (2001) Implication of milk and milk-products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. *International Journal of Microbiology*, 67, 1-17.
- DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. (2003a) Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 29, 114-119.
- DE MARTINIS, E. C. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. (2003b) Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados à vácuo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23:2, 195-199.
- DE MARTINIS, E. C. P.; FREITAS, F. Z. (2003) Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin production. *Food Control*, 14, 197-200.
- DEEGAN, L. C.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. (2006) Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.

- DHANASHREE, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; GOEBEL, W. (2003) Incidence of *Listeria* spp. in clinical and food samples in Mangalore, Índia. *Food Microbiology*, 20, 447-453.
- EMBRAPA, (2008) Empresa Brasileira de Agropecuária. Estatísticas do leite. Disponível em <http://www.embrapa.gov.br/produção> [nov 2008]
- FEITOSA, T.; BORGES M. DE F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F. DE; MUNIZ, C. R. (2003) Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 23, 162-165.
- FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. (2009) Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19, 3-11.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; GELLI, D. (2003) Foodborne diseases in Southern South América. In: Miliotis, M.; Bier, J. (ed.) *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker: New York, 733-743.
- GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. (2009) Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *International Dairy Journal*, 19, 89-95.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.
- GAYA, P.; SANCHEZ, J.; MEDINA, M.; NUNEZ, M. (1998) Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. *Food Microbiology*, 15, 551-555.
- GHRAIRI, T.; FRERE, J.; BERJEAUD, J.M.; MANAI, M. (2008) Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*, 19, 162-169.
- 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. (2008)

- Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25, 668-675.
- GUERRA, M. M.; MCLAUCHLIN, J.; BERNARDO, F. A. (2001) *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology*, 18, 423-429.
- HAIKHXANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. (2007) Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 60:2, 105-108.
- HAN, B.; MENG, Y.; LI, M.; YANG, Y.; REN, F.; ZENG Q.; NOUT, M. J. R. (2007) A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. *Food Control*, 18, 742-746.
- HARRIS, L. J.; DAESCHEL, M. A.; STILES, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. (1989) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52, 384-387.
- HÉCHARD, Y.; SAHL, H. G. (2002) Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram positive bacteria. *Biochimie*, 84, 545-557.
- HEUVELINK, A. E.; HEERWAARDEN, C. V.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, ATILBURG, J. N. J. H. C.; BOS, M. H.; HEILMANN, F. G. C.; HOFHUIS, A.; HOEKSTRA, T.; DE BOER, E. (2008) Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk *International Journal of Food Microbiology*, In Press, Accepted Manuscript.
- HOLZAPFEL, H. W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S-373S.
- HOOVER, D. G.; STEENSON, L. R. (1993) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, Inc. San Diego. 274p.
- JAY, J. M. (1995) Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods OR, why did human listeriosis and hemorrhagic colitis become foodborne diseases? *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 15:11, 674-677.

- KALANTZOPOULOS, G. (1997) Fermented products with probiotic qualities. *Anaerobe*, 3, 185-190.
- KAYLEGIAN, K. E.; MOAG, R.; GALTON, D. M.; BOOR, K. J. (2008) Raw milk consumption beliefs and practices among new york state dairy producers. *Food Protection Trends*, 28:3, 184-191.
- KLAENHAMMER, T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology*. 12, 39-85.
- KULLEN, M. J.; SANOZKY-DAWES, R. B.; CROWELL, D. C.; KLAENHAMMER, T. R. (2000) Use of DNA sequence of variable regions of the 16SrRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 511-518.
- LECLERC. V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; DE BUYSER, M.L.; GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. (2002) Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. *Livestock Production Science*, 76, 195-202.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67-78.
- LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. (1991) Inhibition of pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1683-1688.
- LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 13, 145-150.
- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. (2001) Microbiologia de queijo tipo minas minas frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, Santa Maria, 31:6, 1063-1067.
- MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SING, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. (2008)

- Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Disease*, 9, 190-198.
- MONTVILLE, T. J.; KAISER, A. (1993) Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In: Hoover, D.G.; Steenson, L.R. (ed). *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press: New York: 1-22.
- MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; YAMAZI, A. K. ; ORTOLANI, M. B. T.; NERO, L. A. (2009) Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, in press.
- NASSIB, T.A.; EL-DIN M.Z.; EL-SHAROUD, W.M. (2003) Assessment of the presence of *Salmonella sp.* in Egyptian dairy products using various detection media. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 405-409.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. (2008) *Listeria monocytogenes* and *Salmonella sp.* in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses and Public Health*, 55, 299-305.
- NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. (2009) Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, no prelo.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. (2004). Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 211-215.
- NES, I. F.; JOHNSBORG, O. (2004) Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 100-104.

- OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. (2005) Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2:2, 115-129.
- PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50:3, 521-542.
- PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. (1999) Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella sp.* em queijo minas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 51:5, 427-431.
- PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. (2007) The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology* 15, 546-553.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56, 117-137.
- RODRÍGUEZ, E.; GONZÁLEZ, B.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. (2000) Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 10, 7-15.
- ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M. (2002) Bacteriocinas de bactérias lácticas. *Conscientiae Saúde*, 1, 9-15.
- ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 3-16.
- ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. (2007) Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 915-923.
- SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.-K (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901-1906.

- SMACCHI, E.; GOBBETTI, M. (2000) Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17, 129-141.
- SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. (2008) Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18, 329-343.
- TOMÉ, E.; PEREIRA, V. L.; LOPES, C. I.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. C. (2008) In vitro tests of suitability of bacteriocin producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Food Control*, 19, 535-543.
- TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. (2006) Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 230-235.
- VAN REENEN, C. A.; DICKS L. M. T.; CHIKINDAS M. L. (1998) Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1131-1137.
- VANEGAS, M. C.; VÁSQUEZ, E.; MARTINEZ, A. J.; RUEDA, A. M. (2009) Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. *Food Control*, 20, 430-432.
- VELJOVIC, K.; TERZIC-VIDOJEVIC, A.; VUKASINOVIC, M.; STRAHINIC, I.; BEGOVIC, J.; LOZO, J.; OSTOJIC, M.; TOPISIROVIC, L. (2007) Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2142-2152.
- WESSELS, S.; AXELSSON, L.; HANSEN, E. B.; DE VUYST, L.; LAULUND, S.; LAHTEENMAKI, L.; LINDGREN, S.; MOLLET, B.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (2004) The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 498-505.

WIRAWAN, R. E.; KLESSE, N. A.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. (2006) Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:2, 1148-1156.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Detectar culturas de bactérias ácido lácticas (BAL) naturalmente presentes em leite cru e queijo minas frescal produzido com essa matéria-prima, que apresentem atividade antimicrobiana sobre microrganismos patogênicos de interesse nesses produtos.

Objetivos específicos

1. Caracterizar a qualidade microbiológica de leite cru e queijo minas frescal da região de Viçosa, MG, pela pesquisa de microrganismos indicadores de higiene (aeróbios mesófilos, coliformes totais e *Escherichia coli*), BAL e microrganismos patogênicos (*Listeria. monocytogenes*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus*);
2. Detectar BAL naturalmente presentes em leite cru e em queijo minas frescal que apresentam atividade antagonista em relação a *L. monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* e *Lactobacillus sakei*;
3. Associar a ocorrência dos patógenos pesquisados com as populações de microrganismos indicadores de higiene e BAL;
4. Caracterizar a natureza protéica das substâncias antimicrobianas produzidas pelas BAL identificadas como antagonistas, considerando sua sensibilidade em relação a diferentes enzimas proteolíticas;
5. Promover a identificação molecular das culturas de BAL caracterizadas como bacteriocinogênicas através de sequenciamento genético;
6. Detectar a presença de genes codificadores de nisina nas culturas de BAL antagonistas identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*;
7. Agrupar as culturas de BAL seqüenciadas de acordo com seu perfil filogenético, e associá-las às características fenotípicas e genotípicas de antagonismo.

CAPÍTULO 1: Qualidade e segurança microbiológica de leite cru e queijo minas frescal e detecção de bactérias ácido lácticas autóctones com atividade antagonista em relação à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus*

Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* and *Staphylococcus aureus*.

Resumo

Considerando as interações microbianas que ocorrem naturalmente em alimentos, esse estudo teve como objetivos a caracterização da qualidade e segurança microbiológica de leite cru e queijo minas frescal, verificando possíveis associações entre suas diferentes populações microbianas, e a presença de bactérias ácido lácticas (BAL) com atividade antagonista em relação a patógenos. Trinta e seis amostras de leite cru e 18 de queijo minas frescal foram coletadas na região de Viçosa, MG e submetidas à pesquisa de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli*, BAL, Estafilococos coagulase positivos (ECP), *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.* Trezentos e oitenta e nove culturas de BAL foram aleatoriamente selecionadas e submetidas a teste de antagonismo contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* e *Lactobacillus sakei*. As amostras apresentaram resultados indicativos de deficiências higiênicas com 66,6%, 68,5% e 90,7% de AM, CT e BAL, respectivamente, além de altos e significativos índices de correlação entre essas populações. Foram observadas populações de até 10^6 UFC/mL ECP e *E. coli*, além de ausência de *Salmonella sp.* e *L. monocytogenes*. Grande parte das amostras analisadas apresentou culturas de BAL com atividade antagonista contra os microrganismos-alvo estudados, exceto contra *S. Typhimurium*. Os resultados obtidos indicam o potencial antimicrobiano da microbiota autóctone das amostras analisadas, o que pode interferir diretamente na sobrevivência e desenvolvimento dos microrganismos patogênicos pesquisados

Palavras-chave: leite, queijo, qualidade, segurança, bactérias ácido lácticas, antagonismo.

Abstract

Considering the microbial interaction that naturally occur in foods, the presented study had as objectives the characterization of microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese verifying possible associations between microbial populations, and the detection of lactic acid bacteria (LAB) with antagonistic activity against pathogens. Raw milk (n = 36) and raw milk soft cheese (n = 18) samples were collected in Viçosa region, MG and submitted to research of mesophilic aerobes, total coliforms, *Escherichia coli*, LAB, coagulase positive *Staphylococcus* (CPS), *Listeria monocytogenes* and *Salmonella sp.* 389 LAB cultures were randomly selected and submitted to antagonistic tests against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* and *Lactobacillus sakei*. The samples presented indicative results hygienic deficiency with 66,6%, 68,5% and 90,7% of AM, CT and BAL, respectively, and also high and significant correlation indexes between these populations. In addition, it was observed levels of 10^6 CFU/mL CPS and *E. coli*, and absence of *Salmonella sp.* and *L. monocytogenes*. Great part of the analyzed samples presented LAB cultures with antagonistic activity against the studied target-microorganisms, but except against *S. Typhimurium*. The obtained results indicate the antimicrobial potential of the autochthonous microbiota of raw milk and soft cheese, which can directly hinder the survival and development of the evaluated pathogenic microorganisms.

Keywords: milk, cheese, quality safety, lactic acid bacteria, antagonism.

Introdução

O leite produzido no Brasil é usualmente obtido de fazendas leiteiras caracterizadas pela baixa tecnologia de produção e condições insatisfatórias de higiene, resultando em uma produção com baixa qualidade microbiológica e com altas contagens de microrganismos indicadores (Feitosa et al., 2003; Loguercio & Aleixo, 2001; Carmo et al., 2002; Pereira et al., 1999). Aproximadamente 40% dessa produção leiteira não sofrem nenhum tipo de fiscalização oficial (Embrapa 2008; Nero et al., 2008), sendo comercializada como leite fluido e derivados lácteos, especialmente queijo minas frescal, sem nenhum tratamento térmico.

Devido a possibilidade de contaminação por agentes patogênicos nas etapas de produção, estocagem e transporte, a ingestão de leite cru e seus derivados pode representar um potencial risco aos consumidores (Oliver et al., 2005). Assim, esses produtos são comumente associados a casos e surtos de toxinfecções alimentares causados por *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* verotoxigênica (Oliver et al., 2005; Vaillant et al., 2005; de Buyser et al., 2001).

Essas enfermidades são reportadas principalmente em países desenvolvidos, onde a higiene durante a produção de leite é altamente controlada, resultando em uma matéria-prima de boa qualidade microbiológica (Leclerc et al., 2002; de Buyser et al., 2001; Guerra et al., 2001; Gaya et al., 1998). Entretanto, quando esses alimentos apresentam baixa qualidade, o isolamento de patógenos tende a ser menor (Nero et al., 2008; Dhanashree et al., 2003; Jay, 1995). Este paradoxo sugere que a microbiota autóctone do leite cru pode determinar alguma interferência no desenvolvimento de patógenos, principalmente quando presente em altas concentrações (Nero et al., 2008; Dodd et al., 2007).

Os possíveis promotores dessa situação são as bactérias ácido lácticas (BAL). Esses microrganismos são constituintes naturais da microbiota de leite e derivados (Franciosi et al., 2009), e são capazes de produzir diferentes substâncias que possuem atividade antimicrobiana, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, CO₂ e bacteriocinas (Deegan et al., 2006; de Martinis, 2003). Assim, durante seu desenvolvimento nos alimentos, ou mesmo nas diferentes etapas das metodologias convencionais de isolamento, BAL podem produzir essas substâncias e determinarem a inibição e destruição de patógenos eventualmente presentes.

Os objetivos desse estudo foram caracterizar a qualidade e segurança microbiológica de leite cru e queijo minas frescal, verificar possíveis associações entre suas diferentes populações microbianas, e detectar BAL naturalmente presentes na microbiota desses alimentos com atividade antagonista em relação a microrganismos patogênicos.

Material e Métodos

Amostras e diluição

Amostras de leite cru (n = 36) foram coletadas em condições assépticas de fazendas leiteiras localizadas no município de Viçosa - MG, Brasil, e mantidas sob refrigeração até o momento das análises, quando foram cuidadosamente homogeneizadas e submetidas à diluição seriada decimal utilizando NaCl (0,85%). Amostras de 0,5 a 1 Kg de queijo minas frescal produzido artesanalmente com leite cru sem adição de fermento e sem inspeção sanitária (n = 18) foram obtidas em feira livre, coletadas em embalagens estéreis e mantidas sob refrigeração até o momento das análises, quando 25 g de cada amostra foram removidas assepticamente e homogeneizadas com 225 mL de NaCl (0,85%), e submetidas a diluição seriada decimal com o mesmo diluente (Wehr & Frank, 2004).

Caracterização microbiológica

Aeróbios mesófilos (AM). Duas diluições de cada amostra foram selecionadas e 1,0 mL foi semeado em placas Petrifilm™ AC (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA) para enumeração de aeróbios mesófilos, com incubação a 35 °C por 48 h. As colônias formadas foram enumeradas e os resultados expressos como Unidades Formadoras de Colônias/ mL ou g (UFC/mL ou g).

Coliformes totais (CT) e *E. coli* (EC). Duas diluições de cada amostra foram selecionadas e 1,0 mL foi semeado em placas Petrifilm™ EC (3M Microbiology) para a enumeração de coliformes totais e *E. coli*, com incubação a 35 °C por 48 h. As colônias vermelhas e azuis, ambas com gás foram enumeradas como CT e as azuis com gás como *E. coli* e os resultados foram expressos como UFC/mL ou g.

Bactérias ácido láticas. Duas diluições de cada amostra foram selecionadas e 1,0 mL foi plaqueado em duplicata e em profundidade em ágar de Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) para enumeração de BAL, com incubação a 35 °C por 48 h em anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Todas as colônias formadas foram enumeradas e os resultados expressos como UFC/mL ou g.

Estafilococos coagulase positivos (ECP). Duas diluições de cada amostra foram selecionadas e 0,1 mL foi semeado em duplicata e por superfície em placas contendo ágar Baird-Parker (Oxoid), com incubação a 35 °C por 48 h (Wehr & Frank, 2004). As colônias formadas foram enumeradas e classificadas como típicas e atípicas, considerando a morfologia apresentada. De cada amostra, 5 colônias de cada tipo foram selecionadas aleatoriamente e testadas quanto às provas de catalase, coagulase e produção de termonuclease (Wehr & Frank, 2004). Considerando os resultados obtidos, as contagens de ECP foram estimadas e os resultados finais foram expressos em UFC/mL ou g.

Listeria monocytogenes. A metodologia empregada foi a descrita por Wehr & Frank (2004) homogeneizando-se 25 mL ou g de cada amostra em 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (Oxoid), com incubação a 30 °C. Após 24 e 48 h, alíquotas da cultura obtida foram estriadas em placas contendo ágar Oxford (Oxoid) e Palcam (Oxoid), e incubadas a 35 °C por 24-48 h. Quando presentes, colônias suspeitas de *Listeria* spp. foram submetidas a semeadura em placas de Ágar Tripticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE), incubadas a 30° C por 24-48h. Uma colônia típica (coloração azulada) foi selecionada e semeada em Caldo Tripticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE), para a realização das provas de confirmação pelo API-*Listeria*, e verificação de hemólise em ágar sangue para confirmação de gênero e identificação de espécie (Pagotto et al., 2001).

Salmonella sp. A metodologia empregada foi a descrita por Wehr & Frank (2004), homogeneizando-se 25 mL ou g de cada amostra em 225 mL de caldo Lactosado (Oxoid), com incubação a 35 °C por 24 h. Em seguida, alíquotas de 1,0 e 0,1 mL foram transferidas respectivamente para caldos Tetracionato (Oxoid) (35 °C por 24 h) e Rappaport-Vassiliadis (Oxoid) (42 °C por 24 h). Após incubação, alíquotas dos

dois caldos foram estriadas em placas contendo ágar Bismuto Sulfito (Oxoid), Entérico de Hektoen (Oxoid) e Xilose Lisina Desoxicolato (Oxoid), e incubadas a 35 °C por 24 h. Quando presentes, colônias suspeitas de *Salmonella sp.* foram repicadas em tubos contendo ágar Tríplice Açúcar Ferro (BD - Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) e Lisina Ferro (BD), e incubados a 35 °C por 24 h. Resultados indicativos de *Salmonella sp.* foram confirmados por testes sorológicos utilizando antisoros polivalentes somático e flagelar (Probac).

Atividade antagonista de BAL naturalmente presentes em leite cru e queijo minas frescal

Culturas referência. Culturas de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Typhimurium ATCC 41028, *S. aureus* ATCC 14458, *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 e *Lb. sakei* 2a foram mantidas sob refrigeração em tubos contendo ágar Trypticase de Soja (TSA) (Oxoid) ou MRS (Oxoid). Os *Lactobacillus* foram utilizados como controle positivo, o primeiro sendo conhecido como sensível a substâncias antagonistas e o segundo como produtor de bacteriocina. No momento de uso, as culturas purificadas foram recuperadas em caldo Trypticase de Soja (TSB) (Oxoid) ou MRS (35 °C por 24 h) e diluídas em TSB ou caldo MRS até atingirem uma turbidez semelhante à escala 1 de McFarland (3×10^8 UFC/mL).

Seleção de BAL, estocagem e recuperação. A partir das placas de MRS obtidas para contagens de BAL, 6 a 10 colônias foram aleatoriamente selecionadas por amostra. Assim, 389 colônias foram estriadas em ágar MRS (35 °C por 24-48 h) para purificação, e uma colônia isolada de cada cultura foi transferida para tubos contendo caldo MRS (Oxoid) (35 °C por 24 h). As culturas obtidas foram diluídas em caldo MRS até atingirem uma turbidez semelhante à escala 1 de McFarland (3×10^8 UFC/mL).

Atividade antagonista. Alíquotas de 2 µL de cada cultura de BAL selecionada foram inoculadas na superfície de 4 placas distintas contendo ágar M17 (Oxoid), seguido de incubação a 35 °C por 24 h. Em seguida, cada placa recebeu uma sobrecamada de 8 mL de BHI semi-sólido (contendo ágar a 0,8%) (Oxoid) com aproximadamente 10^5 UFC/mL de uma das culturas referência: *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 14458 ou *Lb. sakei* ATCC 15521

(utilizada como controle positivo de sensibilidade à substâncias antagonistas produzidas por BAL). Após solidificação da sobrecamada, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e examinadas quanto à formação de halo de inibição ao redor da cultura de BAL avaliada, indicando sua atividade antagonista em relação a cultura referência. Em todas as placas, uma alíquota de 2 µL da cultura de *Lb. sakei* 2a foi semeada como controle positivo de BAL produtora de substâncias antagonistas (de Martinis & Franco, 1998).

Análise dos dados

Os resultados obtidos foram categorizados considerando as contagens de microrganismos indicadores e BAL, e presença ou ausência dos patógenos pesquisados. As contagens obtidas foram convertidas em \log_{10} e as populações de BAL foram comparadas com AM, CT, EC e ECP por correlação simples ($P < 0.05$), para verificar possíveis associações entre esses grupos de microrganismos. As frequências de amostras contendo BAL antagonistas foram calculadas considerando a atividade inibitória sobre os microrganismos-alvo que apresentaram sensibilidade às substâncias produzidas. A mesma análise foi realizada para as culturas de BAL avaliadas quanto à atividade antagonista. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statística 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Resultados e Discussão

As frequências das amostras de leite cru e queijo minas frescal categorizadas de acordo com os níveis de contaminação por microrganismos indicadores de higiene são apresentadas na Tabela 1.

A qualidade microbiológica de leite e derivados é usualmente determinada pela enumeração de AM. Quando presentes em concentrações acima de 100.000 UFC/mL indicam deficiências higiênicas significativas na produção, enquanto populações abaixo de 20.000 UFC/mL refletem boas práticas sanitárias (Chambers, 2002). Coliformes também são utilizados para avaliar a qualidade de produtos lácteos, e populações maiores que 100 UFC/mL são consideradas indicativas de práticas de produção inadequadas e contaminação ambiental (Chambers, 2002). Considerando esses valores, os resultados obtidos indicam que grande parte das amostras de leite cru e queijo minas frescal foram produzidos em condições

higiênicas insatisfatórias (Tabela 1), o que pode sugerir a presença de microrganismos patogênicos (ICMSF, 1988). Resultados semelhantes foram obtidos por estudos sobre a qualidade de leite e derivados em diferentes regiões brasileiras e outros países, com características similares de produção leiteira (Kongo et al., 2008; Nero et al., 2008; Arcuri et al., 2006; Chye et al., 2004; Soler et al., 1995).

Apesar de apresentarem altas contagens de microrganismos indicadores de higiene, as amostras analisadas apresentaram baixas populações de *E. coli* e ECP (Tabela 1). Em relação aos outros microrganismos patogênicos, nenhuma amostra apresentou *Salmonella sp.* ou *L. monocytogenes*. Resultados semelhantes foram obtidos por Akineden et al. (2008), Kongo et al., (2008), Nero et al. (2008), Dhanashree et al. (2003) e Cordano & Rocourt (2001), que observaram baixa incidência de patógenos associado a baixa qualidade microbiológica em alimentos de origem animal. Em contrapartida, outros pesquisadores descrevem altas frequências de patógenos em alimentos com baixas contagens de microrganismos indicadores de higiene (D'Amico et al., 2008; Ghafir et al., 2008; Leclerc et al., 2002; Rudolf & Sherer, 2001; Guerra et al., 2001). Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a microbiota autóctone das amostras analisadas pode ter determinado uma interferência direta na sobrevivência e isolamento dos patógenos pesquisados, como proposto por Jay (1995, 1996).

A participação de BAL na microbiota de produtos lácteos pode ser considerada relevante, uma vez que esses microrganismos estão naturalmente presentes nos ambientes de ordenha e processamento, o que facilita a contaminação da matéria-prima e produtos beneficiados e propicia a formação de biofilmes (Franciosi et al., 2009; Casalta & Montel, 2008). Os resultados obtidos confirmam essa contribuição de BAL na microbiota das amostras analisadas, uma vez que 34 amostras de leite cru (94,4%) apresentaram contagens acima de 10^3 UFC/mL e 15 amostras de queijo minas frescal (83,3%) acima de 10^5 UFC/g (Tabela 1). Ainda, quando comparadas, as populações de BAL e microrganismos indicadores de higiene apresentaram índices positivos e significativos de correlação (Tabela 2), indicando aumento proporcional desses grupos na microbiota de leite cru e queijo minas frescal (Han et al., 2007; López-Díaz et al., 2000). Apesar de serem considerados importantes microrganismos deteriorantes em produtos lácteos (Galia et al., 2009), várias BAL são capazes de produzir diferentes substâncias com atividade antimicrobiana (Riley & Wertz, 2002; Ross et al., 2002), interferindo principalmente

Tabela 1. Frequências de leite cru e queijo minas frescal produzidos com leite cru por diferentes níveis de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), bactérias ácido lácticas (BAL) e Estafilococos coagulase positivos (ECP).

Amostras	Contagens (CFU/ml or g)	AM %	CT %	EC %	BAL %	ECP %
Leite cru	até 10^2	2,8	42,7	94,4	0	52,8
	10^2 to 10^3	0	22,2	5,6	5,6	13,9
	10^3 to 10^4	11,1	11,1	0	44,4	11,1
	10^4 to 10^5	36,1	8,3	0	19,4	16,7
	10^5 to 10^6	27,8	11,1	0	22,2	5,6
	maior que 10^6	22,2	0	0	8,3	0
Queijo minas frescal	até 10^4	0	16,7	44,4	16,7	94,4
	10^4 to 10^5	0	5,6	38,9	0	5,6
	10^5 to 10^6	0	33,3	16,7	11,1	0
	10^6 to 10^7	11,1	33,3	0	33,3	0
	10^7 to 10^8	50,0	11,1	0	38,9	0
	maior que 10^8	38,9	0	0	0	0

no desenvolvimento de patógenos e contribuindo para a segurança microbiológica nesses alimentos.

A metodologia empregada para detecção da atividade antagonista permitiu a identificação de BAL autóctones de leite cru e queijo minas frescal com capacidade de produzir diferentes substâncias antimicrobianas. Considerando esses resultados, foram observadas altas frequências de amostras contendo BAL com potencial antagonista, principalmente contra *L. monocytogenes* e *Lb. sakei* (Tabela 3). Especificamente em relação às culturas de BAL, é possível verificar atividade antimicrobiana simultânea a mais de um microrganismo sensível, e que a maioria apresentou atividade antagonista também contra *L. monocytogenes* e *Lb. sakei* (Tabela 4). Não foi verificada atividade antagonista em relação à *S. Typhimurium*. Associados às altas contagens de BAL obtidas (Tabela 1), esses resultados indicam a capacidade de interferência de BAL naturalmente presentes na microbiota de leite cru e queijo minas frescal sobre os microrganismos Gram positivos avaliados, como sugerido por Jay (1995, 1996) e Nero et al. (2008).

A ação antagonista de BAL naturalmente presentes na microbiota de alimentos de origem animal já foi descrita previamente, com atividade antimicrobiana principalmente em relação à patógenos Gram positivos. Benkerroum et al. (2000) identificou altas frequências de BAL isoladas de produtos lácteos com atividade antimicrobiana contra diversos patógenos, como *L. monocytogenes*. Coventry et al. (1997) demonstrou que amostras de leite e derivados apresentam alta porcentagem de BAL produtoras de bacteriocinas, com atividade contra *L. monocytogenes* 4A e *S. aureus*. Jones et al. (2008), Dávila et al. (2006) e Schillinger & Lücke (1989) isolaram várias culturas de BAL de produtos cárneos, e verificaram que apresentam atividade antagonista contra um ou mais patógenos. Especificamente em relação a microrganismos Gram negativos, a presença da dupla camada lipídica externa impede a interação de substâncias antagonistas específicas, como bacteriocinas, com a parede e membrana plasmática (Cotter et al., 2005), entretanto, há trabalhos onde a ausência de *Salmonella* é relatada frente à bacteriocinas, o que pode talvez explicar a ausência ou menor frequência de BAL antagonistas contra patógenos como *Salmonella sp.* e *E. coli* (presente estudo, Nero et al., 2008; Castellano et al., 2008; Bromberg et al., 2006; Neto et al., 2005; Brashears & Durre, 1999; Coventry et al., 1997; Schillinger & Lücke, 1989). Mas ainda não pode ser descartada a possível presença de outros tipos de outras substâncias antagonistas

Tabela 2. Parâmetros de correlação entre bactérias ácido lácticas (BAL) e contagens de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC) e Estafilococos coagulase positivos (ECP) obtidos de amostras de leite cru e queijo minas frescal produzidos com leite cru.

Comparação (x:y)	n	r	r ²	P	a	b	vm
Todas as amostras							
BAL: AM	49	0,93	0,87	0,00	1,12	-1,46	0,52
BAL: CT	41	0,88	0,78	0,00	0,80	2,42	1,90
BAL: EC	9	0,88	0,77	0,00	1,09	2,13	2,98
BAL: ECP	19	0,40	0,16	0,09	0,62	2,29	1,39
Leite cru							
BAL: AM	31	0,80	0,64	0,00	0,84	-0,07	0,53
BAL: CT	27	0,38	0,14	0,05	0,31	3,39	2,04
BAL: EC	7	0,24	0,06	0,60	0,35	3,16	2,61
BAL: ECP	16	0,57	0,32	0,02	0,47	2,31	0,47
Queijo minas frescal							
BAL: AM	18	0,78	0,61	0,00	1,41	-3,65	0,50
BAL: CT	14	0,62	0,39	0,02	0,51	4,50	1,64
BAL: EC	--	--	--	--	--	--	--
BAL: ECP	3	0,97	0,95	0,15	1,52	1,56	6,33

n: número de repetições, r: índice de correlação, r²: coeficiente de determinação, P: nível de significância, a: inclinação, b: intercepto, vm: variância média. Valores de P maior que 0.05 indicam índices de correlação não significativos.

contra Gram negativos não estudadas nesse trabalho, assim como a dificuldade de recuperação desse microrganismo na metodologia utilizada.

Tabela 3. Frequências de amostras de leite cru e queijo minas frescal feito de leite cru que apresentaram bactérias ácido lácticas autóctones com atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* e *Lactobacillus sakei*.

Microrganismo alvo	Leite cru n (%)	Queijo minas n (%)
<i>Listeria monocytogenes</i>	16 (44,4)	11 (61,1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 (13,8)	2 (11,1)
<i>Lactobacillus sakei</i>	12 (33,3)	8 (44,4)
Total	36	18

n: número de amostras.

Tabela 4. Frequências de culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de amostras de leite cru e queijo minas frescal produzido com leite cru com atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, e *Lactobacillus sakei*.

Microrganismo sensível*			Frequência n (%)		Total n (%)
<i>Lb. sakei</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	Leite cru	Queijo minas frescal	
+	-	-	4 (7)	0 (0)	4 (5)
+	+	-	22 (40)	18 (67)	40 (49)
+	+	+	12 (22)	3 (11)	15 (18)
-	-	+	2 (4)	0 (0)	2 (2)
+	-	+	1 (2)	0 (0)	1 (1)
-	+	-	14 (25)	6 (22)	20 (24)
Total			55 (100)	27 (100)	82 (100)

* Padrão de sensibilidade observado. +: inibição, -: ausência de inibição, n: número de culturas com padrão de sensibilidade; n: número de cultura testada

A presença de BAL antagonistas como parte da microbiota autóctone das amostras analisadas pode explicar a ausência de *L. monocytogenes*, assim como as baixas populações de *S. aureus*, como sugerido por Topisirovic et al. (2006). Além de determinarem uma inibição direta nos próprios alimentos, BAL antagonistas podem comprometer a multiplicação e isolamento adequados de patógenos nas diferentes etapas das metodologias convencionais de isolamento (Nero et al., 2008; Suh & Knabel, 2001; Vlaemynck & Moermans, 1996), o que pode também explicar os resultados negativos obtidos nesse estudo. Entretanto, a baixa contaminação desses patógenos nas diferentes etapas da produção de leite também não deve ser descartada. Da mesma forma que ocorre nos alimentos, BAL e outros microrganismos presentes no ambiente de produção podem exercer atividade inibitória sobre patógenos eventualmente presentes, reduzindo as chances de contaminação (Holzapfel et al., 2001).

Apesar das amostras analisadas apresentarem baixa qualidade microbiológica, foi constatada a ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella sp.* e baixas contagens de *S. aureus*. Essa característica pode ser explicada pela importante participação de uma microbiota previamente presente nas amostras, além da capacidade de BAL possuir potencial de produção de substâncias antimicrobianas, principalmente contra patógenos Gram positivos.

Agradecimentos

CNPq (bolsa de mestrado e projeto de pesquisa 474044/2006-8) e FAPEMIG (projeto de pesquisa CVZ 301/06).

Referências bibliográficas

- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. G. F.; SOUZA, G. N. (2006) Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58:3, 440-446.
- AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A. A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. (2008) Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 211-216.

- BENKERROUM, N.; OUBEL, H.; ZAHAR, M.; DLIA, S; FILALI-MALTOUF, A. (2000) Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 960-968.
- BRASHEARS, M. M.; DURRE, W. A. (1999) Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during growth and refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 62, 1336-1340.
- BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. (2006) Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26:1, 135-144.
- CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, E. (2002) Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, 19, 9-14.
- CASALTA, E.; MONTEL, M. C. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 271-273.
- CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. (2008) A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 483-499.
- CHAMBERS, J.V. (2002) The microbiology of raw milk. In: Robinson, R.K., *Dairy Microbiology Handbook*. Wiley-Interscience, Danves. 39-90.
- CHYE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. (2004) Bacteriological quality and safety of raw milk in Malasia. *Food Microbiology*, 21, 535-541.
- CORDANO, A. M.; ROCOURT, J. (2001) Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 175-178.
- COTTER, P. C.; HILL, C.; ROSS, R. P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews- Microbiology*, 3, 777-788.

- COVENTRY, M. J.; GORDON, J. B.; WILCOCK, A.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B.E.; HICKEY, M.W.; HILLIER, A.J.; WAN, J. (1997) Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 248-258.
- D'AMICO, D. J.; GROVES, E.; DONNELLY, C. W. (2008) Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *Journal of Food Protection*, 71: 8, 1580-1589.
- DÀVILA, E.; ZAMORA, L. M.; PLA, M.; CARRETERO, C.; PARÉS. D. (2006) Identification and antagonistic activity of lactic acid bacteria occurring in porcine blood from industrial slaughterhouses - a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 207-211.
- DE BUYSER, M. L.; DUFOUR. B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. (2001) Implication of milk and milk-products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. *International Journal of Microbiology*, 67, 1-17.
- DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. (2003) Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 29, 114-119.
- DE MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. (1998) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 119-126.
- DEEGAN, L. C.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. (2006) Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.
- DHANASHREE, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; GOEBEL, W.; Incidence of *Listeria* spp. in clinical and food samples in Mangalore, Índia. (2003) *Food Microbiology*, 20, 447-453.
- DODD, C. E. R.; RICHARDS, P. J.; ALDSWORTH, T. G. (2007) Suicide through stress: a bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 46-50.

- EMBRAPA, (2008) Empresa Brasileira de Agropecuária. Estatísticas do leite. Disponível em <http://www.embrapa.gov.br/produção> [nov 2008]
- FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. (2003) Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 23, 162-165.
- FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. (2009) Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19, 3-11.
- GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. (2009) Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *International Dairy Journal*, 19, 89-95.
- GAYA, P.; SANCHEZ, J.; MEDINA, M.; NUNEZ, M. (1998) Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. *Food Microbiology*, 15, 551-555.
- GHAFFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G. (2008) Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection*, 71:1, 35-45.
- GUERRA, M. M.; MCLAUCHLIN, J.; BERNARDO, F. A. (2001) *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology*, 18, 423-429.
- HAN, B., MENG, Y., LI, M., YANG, Y., REN, F., ZENG Q., NOUT, M. J. R. (2007). A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. *Food Control*, 18, 742-746.
- HOLZAPFEL, H. W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S-373S.

- ICMSF (1988) *Microorganisms in Foods 1: Their Significance and Methods of Enumeration*. 2nd ed. International Commission of Microbiological Specifications in Foods, Toronto, Canada.
- JAY, J. M. (1995) Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods OR why did human listeriosis and hemorrhagic colitis become foodborne diseases? *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 15:11, 674-677.
- JAY, J.M. (1996) Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Science*, 43, S59-S66.
- JONES, R. J.; HUSSEIN, H. M.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL, G.; TAGG, J. R. (2008) Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*, 25, 228-234.
- KONGO, J. M.; GOMES, A. P.; MALCATA, F. X. (2008) Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of São Jorge, a Portuguese traditional cheese from raw cow's milk. *Journal of Food Protection*, 71:5, 986-992.
- LECLERC. V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; DE BUYSER, M.L.; GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. (2002) Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. *Livestock Production Science*, 76, 195-202.
- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. (2001) Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, Santa Maria, 31:6, 1063-1067.
- LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO, B. (2000). Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*, 17, 23-32.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. (2008) *Listeria monocytogenes* and *Salmonella sp.* in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of

- indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses and Public Health*, 55, 299-305.
- NETO, L. G. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. (2005) Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57:2, 245-250.
- OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. (2005) Foodborne pathogens in milk and dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2:2, 115-129.
- PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. (2001) Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. *Health Canada's - Government of Canada*. Disponível em <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>
- PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. (1999) Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella sp.* em queijo minas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 51, 5.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56, 117-137.
- ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 03-16.
- RUDOLF, M.; SCHERER, S. (2001) High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 91-98.
- SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.-K (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901-1906.
- SOLER, A.; PONSELL, C.; DE PAZ, M.; NUÑEZ, M. (1995) The microbiological quality of milk produced in the Balearic islands. *International Dairy Journal*, 5:1, 69-74.

- SUH, J. H.; KNABEL, S. J. (2001) Comparison of different enrichment broths and background flora for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in whole milk. *Journal of Food Protection*, 64, 30-36.
- TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. (2006) Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 230-235.
- VAILLANT, V.; DE VALK, H.; BARON, E.; ANCELLE, T.; COLIN, P.; DELMAS, M. C.; DUFOUR, B.; POUILLOT, R.; LE STRAT, Y.; WEINBRECK, P.; JOUGLA, E.; DESENCLOS, J. C. (2005) Foodborne infections in France. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2:3, 221-232.
- VLAEMYNCK, G. M.; MOERMANS, R. (1996) Comparison of LEB and Fraser enrichment broths for the detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk dairy products and environmental samples. *Journal of Food Protection*, 59, 1172-1175.
- WEHR, H. M.; FRANK, J. F. (2004) *Standard methods for the examination of dairy products*. American Public Health Association, Washington. 570p.

Capítulo 2: Produção de bacteriocinas e identificação molecular de bactérias ácido lácticas naturalmente presentes na microbiota de leite cru e queijo minas frescal.

Bacteriocins production and molecular identification of naturally occurring lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese microbiota.

Resumo

Bactérias ácido lácticas (BAL) vêm sendo utilizadas na indústria de alimentos na produção de alimentos fermentados, como probióticos e tem importância especial devido sua habilidade em produzir substâncias com potencial antimicrobiano a patógenos Gram positivos e microrganismos deteriorantes, como bacteriocinas. Os objetivos desse estudo foram identificar espécies de BAL bacteriocinogênicas naturalmente presentes em leite cru e queijo minas frescal, verificando os efeitos de enzimas proteolíticas sobre sua atividade antimicrobiana, e detectar a presença de genes codificadores de nisina em culturas identificadas como *Lactococcus lactis*. Trezentos e oitenta e nove BAL foram isoladas de amostras de leite cru e queijo minas frescal e submetidas à detecção de atividade bacteriocinogênica contra *Listeria monocytogenes*. Das 58 (14,9%) culturas identificadas como antagonistas, 20 foram selecionadas e a natureza protéica das substâncias antagonistas produzidas foi confirmada por testes enzimáticos. Ainda, essas culturas foram submetidas à identificação por sequenciamento genético, sendo 2 identificadas como *Lactobacillus plantarum* e 18 como *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Em 7 culturas foram detectados genes responsáveis pela codificação de nisina. As culturas bacteriocinogênicas identificadas apresentaram grande variabilidade na produção e atividade de bacteriocinas, mesmo possuindo perfil genético bastante similar. Os resultados obtidos indicam a necessidade de metodologias moleculares e fenotípicas para caracterização adequada de culturas de BAL bacteriocinogênicas, e o potencial dessas culturas em serem utilizadas como ferramentas para garantia de segurança alimentar.

Palavras-chave: leite, queijo, bactérias ácido lácticas, bacteriocinas, nisina

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are being used by food industries due to their ability in producing metabolites, like bacteriocins, with antimicrobial activity against Gram positive pathogens and spoilage microorganisms. The objectives of this study were identify naturally occurring bacteriocinogenic LAB in raw milk and soft cheese, verifying their sensitivity to proteolytic enzymes, and detect the presence of nisin codifiers genes in cultures identified as *Lactococcus lactis*. 389 LAB cultures were isolated from raw milk and soft cheese samples, and submitted to the detection of bacteriocins production against *Listeria monocytogenes*. From 58 (14.9%) LAB cultures identified as antagonistic, 20 were randomly selected and submitted to enzymatic tests in order to confirm the proteinaceous nature of antimicrobial substances. Still, these cultures were submitted to genetic sequencing being identified as *Lactobacillus plantarum* (2) and *Lc. lactis* subsp. *lactis* (18). Nisin genes were identified by polymerase chain reaction in 7 of these cultures. The identified bacteriocinogenic cultures presented high variability in production and activity of the bacteriocins, even when they shared high genetic similarity. The obtained results indicate the need of molecular and phenotypic methodologies to an adequate characterization of bacteriocinogenic LAB, and the potential use of these cultures as tools for provide food safety.

Keywords: milk, cheese, lactic acid bacteria, bacteriocins, nisin

Introdução

Bactérias ácido lácticas (BAL) vêm assumindo grande importância na indústria de alimentos e em saúde pública por seu potencial antagonista contra microrganismos patogênicos e deteriorantes. Essa atividade ocorre devido ao crescimento competitivo com outros microrganismos nos alimentos, potencializado pelos efeitos inibitórios de seus metabólitos (de Martinis et al., 2003b; Adams & Mitchell, 2002; Carr et al., 2002; Stiles, 1994). O seu principal metabólito, o ácido láctico, gera no alimento uma acidez que usualmente não é favorável à multiplicação e sobrevivência de bactérias Gram positivas e negativas (Ross et al., 2002). Ainda, BAL produzem uma série de outras substâncias com potencial antimicrobiano, como o peróxido de hidrogênio, CO₂, diacetil e as bacteriocinas (Leroy & de Vuyst, 2004; de Martinis et al., 2003a; Carr et al., 2002; Salama et al., 1995; Stiles, 1994; El-Gazar et al., 1992; Lewus & Montville, 1991; Thuault et al., 1991). Dentre estas substâncias, as bacteriocinas são as mais estudadas pela importância na aplicação em indústrias de alimentos como bioconservantes (Castellano et al., 2008; de Martinis et al., 2003a; Carr et al., 2002).

As bacteriocinas, em especial, são proteínas biologicamente ativas e caracterizadas por possuírem atividade antimicrobiana contra um grupo específico de microrganismos sensíveis (Carr et al., 2002; Lewus & Montville, 1991; Thuault et al., 1991), especialmente patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Sobrinho-López & Martín-Belloso, 2008). Devido a sua natureza protéica, as bacteriocinas são sensíveis à ação de proteases, podendo ser comprovada através de testes de inibição específicos (van Reenen et al., 1998; Montville & Kaiser, 1993; Lewus & Montville, 1991; Lewus et al., 1991; Harris et al., 1989).

Uma grande variedade de espécies de BAL já foi identificada como produtoras de diferentes bacteriocinas (Cotter et al., 2005; Chen & Hoover, 2003). Algumas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, por exemplo, são capazes de produzir nisina, a bacteriocina atualmente mais conhecida e estudada (Casalta & Montel, 2008; Cleveland et al., 2001), e a única que possui o status de segurança GRAS (generally recognized as safe) (Deegan et al., 2006; Cooter et al., 2005; Chen & Hoover, 2003).

A expressão de nisina e outras bacteriocinas é mediada por genes (Chen & Hoover, 2003) e muitos deles já foram totalmente descritos (Todokoro et al., 2006;

Maldonado et al., 2003; van Reenen et al., 2003; Li & O'Sullivan, 2002; Jack et al., 1995). Para a descrição desses genes, o sequenciamento genético é uma importante ferramenta utilizada, sendo também indispensável para a identificação precisa de novas culturas de BAL bacteriocinogênicas (Mohania et al., 2008; Nes & Johnsborg, 2004; Holzapfel et al., 2001). Associada a essas metodologias moleculares, as metodologias convencionais de detecção de bacteriocinas são também importantes, pois demonstram a capacidade das BAL identificadas em produzir as substâncias antagonistas de interesse, além de identificar possíveis fatores interferentes em sua atividade (Chen & Hoover, 2003).

Embora haja boa disponibilidade de informações sobre a atividade de BAL em diferentes tipos de alimentos (Carvalho et al., 2006; de Martinis et al., 2003a; de Martinis & Freitas, 2003; Giraffa, 2003; Heikkilä & Saris, 2003; Issa & Ryser, 2000; Lewus et al., 1991; Thuault et al., 1991), ainda não existem dados comprovando se essa atividade inibitória ocorre naturalmente em leite cru. Assim, os objetivos desse estudo foram identificar culturas de BAL bacteriocinogênicas naturalmente presentes em leite cru e queijo minas frescal, verificando os efeitos de enzimas proteolíticas sobre sua atividade antimicrobiana, e detectar a presença de genes codificadores de nisina em isolados identificados como *Lc. lactis*.

Material e Métodos

Coleta de amostras e isolamento de bactérias ácido lácticas

Amostras de leite cru (n = 36) e queijo minas frescal produzido com leite cru (n = 18) foram coletadas em condições assépticas de fazendas leiteiras e feira livre no município de Viçosa - MG, Brasil, e mantidas sob refrigeração até as análises, quando foram cuidadosamente homogeneizadas e submetidas a diluição seriada decimal utilizando NaCl (0,85%) (Wehr & Frank, 2004). Diluições das amostras foram semeadas em profundidade em ágar de Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e incubadas a 35 °C por 48 h em anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), para isolamento de BAL.

Atividade antagonista de BAL naturalmente presente nas amostras

Culturas referência. Culturas de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Lactobacillus sakei* 2a e *Lc. lactis* subsp. *lactis* DY 13 (Lyofast Dry DY 13, Prime Pharma CC, Gordons Bay, África do Sul) foram mantidas sob refrigeração em tubos contendo ágar Trypticase de Soja (TSA) (Oxoid) ou MRS (Oxoid). No momento de uso, as culturas purificadas foram recuperadas em caldo Trypticase de Soja (TSB) (Oxoid) ou MRS (35 °C por 24 h) e diluídas em TSB ou caldo MRS até atingirem uma turbidez semelhante à escala 1 de McFarland (3×10^8 UFC/mL).

Seleção de BAL, estocagem e recuperação. A partir de diferentes amostras semeadas em ágar MRS, 389 colônias foram aleatoriamente selecionadas, purificadas em ágar MRS (35 °C por 24-48 h em aerobiose), liofilizadas a -80 °C e estocadas. Para a realização do teste de antagonismo, as culturas estocadas foram recuperadas em caldo MRS (Oxoid) (35 °C por 24 h em aerobiose), e após confirmação da pureza em ágar MRS (35 °C por 24-48 h), uma colônia isolada foi semeada em caldo MRS (35 °C por 24 h). As culturas obtidas foram diluídas em caldo MRS até atingirem uma turbidez semelhante à escala 1 de McFarland (3×10^8 UFC/mL).

Detecção da atividade bacteriocinogênica. Alíquotas de 2 µL das culturas recuperadas foram inoculadas em placas contendo 10 mL de ágar infusão de cérebro e coração (BHI) (Oxoid) adicionado de uma solução de catalase (Sigma, St. Louis, MO, USA) na concentração final de 100 UI/mL e incubadas a 30 °C por 24 h. Nessa etapa, a produção de ácidos foi minimizada pela utilização de BHI, já que este meio contém pequena porcentagem de açúcar e diminui a possibilidade de fermentação e consequente formação de ácidos (Harris et al., 1989) e a eventual produção de peróxido de hidrogênio foi destruída pela catalase adicionada (Moreno et al., 1999; Corsetti et al., 1996). Após incubação, cada placa recebeu uma sobrecamada de 8 mL de BHI semi-sólido (contendo ágar a 0,8%) contendo aproximadamente 10^5 UFC/mL da cultura de *L. monocytogenes*. Após solidificação, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e examinadas quanto à formação do halo de inibição ao redor da cultura inoculada, sugerindo atividade bacteriocinogênica da cultura testada. Em todas as placas, uma alíquota de 2 µL da cultura de *Lb. sakei* 2a foi semeada como controle positivo de BAL bacteriocinogênica (de Martinis & Franco, 1998). As culturas

identificadas como bacteriocinogênicas foram caracterizadas quanto à produção de catalase e morfologia (coloração de Gram)

Confirmação da atividade bacteriocinogênica. Considerando os resultados obtidos no teste de antagonismo, 20 culturas supostamente bacteriocinogênicas que apresentaram os maiores halos foram selecionadas aleatoriamente de diferentes amostras para a confirmação da natureza protéica das substâncias antagonistas produzidas, de acordo com metodologia descrita por Lewus et al. (1991) com modificações. Colônias isoladas das culturas de BAL selecionadas foram semeadas em caldo MRS e incubadas a 25 °C por 24 h em aerobiose. Alíquotas de 2 µL de cada cultura foram semeadas em 5 repetições em placas contendo 10 mL de ágar MRS modificado (contendo dextrose a 5%), e incubadas a 25 °C por 24 h em anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Após a incubação, um orifício de 2 mm de diâmetro foi feito no ágar a 0,5 cm de distância de cada colônia formada, sendo cada um preenchido com 20 µL de solução (20 mg/mL) de uma das seguintes enzimas (Sigma): pepsina (de mucosa de estômago de suínos), α-quimotripsina (de pâncreas de bovino), proteinase K (de *Tritirachium album*) e tripsina (de pâncreas de bovino). Ainda, 20 µL de água destilada estéril foram adicionados em um dos poços como controle negativo. Após 30 min em temperatura ambiente (absorção e difusão), cada placa recebeu uma sobrecamada de 8 mL de BHI semi-sólido (contendo ágar a 0,8%) contendo aproximadamente 10⁵ UFC/mL da cultura de *L. monocytogenes*, e incubadas a 35 °C por 24 h. A confirmação da produção de bacteriocinas pelas culturas foi confirmada pela sensibilidade a uma ou mais enzimas testadas, identificada pela formação de um halo em formato de meia lua.

Análises genéticas das culturas de BAL bacteriocinogênicas

Reação em cadeia de polimerase (PCR). Foi realizada uma identificação molecular inicial para a certificação do grupo BAL através na região conservada do gene 16S rRNA (Kullen et al., 2000). Para isso, uma colônia de cada cultura foi recuperada em caldo MRS (35 °C por 24 h) e após incubação, 1 mL foi microcentrifugado por 5 min a 6000 g, o sobrenadante foi removido e o pellet processado para a extração de DNA por fervura segundo Pospiech & Neumann (1995). Para a PCR foi utilizado o kit IllustratTM PureTaq Ready-to-go PCR beads (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK).

Os oligonucleotídeos utilizados foram o plb16 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e mlb16 (5' GGCTGCTGGCACGTAGTTAG 3') (Kullen et al., 2000), que amplificam um fragmento de 500 pb da região conservada do gene 16S rRNA. Foram utilizados também: marcador de peso molecular de 100 pb e água como controle negativo e *Lc. lactis* subsp. *lactis* DY 13 como positivo. O termociclador foi programado por 5 min a 94 °C (desnaturação inicial) e 35 ciclos de 15 s a 94 °C (desnaturação), 15 s a 55 °C (anelamento), 1 min a 72 °C (extensão) e 10 min a 72 °C (extensão final). Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (w/v) e revelados em brometo de etídio.

Sequenciamento e análises das sequências de nucleotídeos. Os produtos de PCR obtidos foram purificados com o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI, USA) e submetidos ao sequenciamento automático utilizando a metodologia adaptada de Sanger et al. (1977), realizado pela empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com sequências previamente depositadas no GenBank, utilizando o programa “Basic Alignment Search Tool” (BLAST), disponível em “National Institute of Health-NCBI” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ainda, as sequências foram agrupadas de acordo com seus perfis genéticos utilizando o Software MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007), pelo método de *neighbour-joining* com correção Poisson. As análises de associação foram realizadas por 1000 *bootstrap*. A sequência parcial do gene 16S rRNA de *Lb. acidophilus* ATCC 4356 (número de acesso: M58802) foi utilizada na construção do agrupamento externo da árvore filogenética.

Identificação de genes para nisina. As culturas identificadas como *Lc. lactis* subsp. *lactis* foram pesquisadas quanto à presença de genes responsáveis pela codificação de nisina. O DNA das culturas foi extraído utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). As sequências de oligonucleotídeos (Quadro 1) utilizados e os ciclos de amplificação da PCR foram utilizados segundo Espeche et al. (2008). As combinações dos oligonucleotídeos foram nisAf1/nisAr2 (~160 pb), nisAf2/nisBr3 (~270 pb) e nisAf1/nisBr3 (~430 pb). Foi utilizado o kit Illustra™ PureTaq Ready-to-go PCR beads (GE Healthcare, UK) e o termociclador foi programado por 4 min a 94 °C (desnaturação inicial) e 30 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturação), 30 s a 49 °C (anelamento), 45 s a 72 °C (extensão) e 5 min a 72 °C

(extensão final). Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (w/v) e revelados em brometo de etídio. A cepa *Lc. lactis* subsp. *lactis* DY 13 foi utilizada como controle positivo.

Quadro 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizados na detecção por reação em cadeia da polimerase de gene relacionado a produção de nisina (Espeche et al., 2008)

Oligonucleotídeos	Sequência de oligonucleotídeos
nisAf1	5' AAA ATG AGT ACA AAA GAT TTY AAC 3'
nisBr3	5' TGC ATA ACA TCA TAG AGT TTA GG 3'
nisAf2	5' TTC ACG TAA GCA AAT AAC CA 3'
nisAr2	5' TGG TTA TTT GCT TAC GTG AA 3'

* Y: A/C/T/G

Resultados e Discussão

A atividade antagonista foi avaliada considerando a provável produção de bacteriocinas produzidas por BAL, sendo observada a presença de 58 (14,9%) culturas supostamente bacteriocinogênicas com atividade contra *L. monocytogenes*. Em um estudo similar, Coventry et al. (1997) encontraram uma alta porcentagem de culturas produtoras de bacteriocinas com atividade contra o mesmo patógeno em amostras de leite e queijo. Ainda, vários trabalhos demonstram o antagonismo de BAL isoladas de diferentes alimentos contra *L. monocytogenes* (Benkerroum et al., 2000; Rodríguez et al., 2000; Winkowski et al., 1993; Schillinger & Lücke, 1989), indicando o potencial uso de bacteriocinas no controle desse patógeno.

Conforme as características genuínas de BAL (de Martinis, et al., 2003a; Axelsson, 2004), todas as culturas isoladas apresentaram resultados negativos para o teste da catalase e foram classificadas como Gram positivos. A morfologia predominante foi de cocos (55; 94,8 %) sobre bacilos (3; 5,2 %), como observado por Franciosi et al. (2009).

A partir das culturas identificadas como antagonistas, 20 (18 cocos e 2 bacilos) foram selecionadas e submetidas à testes enzimáticos a fim de confirmar a natureza protéica e, conseqüentemente, bacteriocinogênica das substâncias antimicrobianas produzidas. A maioria das culturas produziu extratos que

apresentaram sensibilidade às enzimas, confirmando a capacidade de produzir bacteriocinas (Tabela 1). Nenhuma cultura produziu substâncias antimicrobianas sensíveis à pepsina, como já observado em estudos similares por de Martinis et al. (2003b) e Benkerroum et al. (2000). A metodologia utilizada não permitiu a identificação de sensibilidade às enzimas em apenas 3 culturas, devido à formação de um halo de inibição muito pequeno no momento das análises. Nessas culturas pode ter ocorrido perda da atividade antimicrobiana, esse evento já foi anteriormente relatado por Hoover & Steenson (1993).

Tabela 1. Padrão de sensibilidade enzimática de substâncias antimicrobianas produzidas por culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas frescal.

proteínase K	Sensibilidade às enzimas			n
	tripsina	α -quimotripsina	pepsina	
+	+	+	-	7
+	-	-	-	3
-	+	+	-	3
-	-	+	-	2
+	-	+	-	1
-	+	-	-	1
ND	ND	ND	ND	3

ND: não detectada.

A variação de sensibilidade de bacteriocinas a diferentes enzimas é importante para verificar o potencial de utilização dessas culturas no controle de patógenos em alimentos. Em leite fermentado, *Streptococcus bovis* J2 40-2 produziu substâncias antimicrobianas sensíveis à proteínase K, tripsina, e pepsina (Rashid et al., 2008). *Lactobacillus curvatus* IFPL 105 isolado de leite de cabra apresentou sensibilidade à α -quimotripsina, proteínase K e pancreatina, e resistência à tripsina e pepsina (Casla et al., 1996). Tükel et al. (2007) identificou uma bacteriocina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* MC 38 que é completamente inativada por proteínase K e α -quimotripsina. Benkerroum et al., (2000) isolou três cepas distintas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* com perfis diferentes de sensibilidade à tripsina, porém todas foram sensíveis a α -quimotripsina e pronase e resistentes à catalase e pepsina.

Mesmo com a impossibilidade de detectar a sensibilidade às proteases de alguns extratos, todas as 20 culturas foram submetidas à PCR baseadas na região

conservada do gene 16S rRNA (Kullen et al., 2000) (Figura 1) e submetidas ao sequenciamento genético (Tabela 2), confirmando as características morfológicas avaliadas anteriormente como pertencentes ao grupo das BAL. Apenas duas espécies foram identificadas, *Lc. lactis* e *Lb. plantarum*, divididas em treze isolados distintos. As amostras de queijo minas frescal produzido com leite cru tiveram a maior variabilidade dessas cepas, e além de *Lc. lactis* continham também *Lb. plantarum* (2, 10%), enquanto as amostras de leite cru apresentaram apenas *Lc. lactis* (18, 90%) (Tabela 2). Em um estudo conduzido por Dolci et al. (2008) e Rodríguez et al. (2000), *Lactococcus* foi identificado como o gênero predominante em amostras de leite cru e queijo em diferentes estágios de maturação. A análise filogenética dos isolados identificou a presença de diferentes agrupamentos de culturas com características genéticas similares, mesmo sendo identificadas como diferentes isolados de *Lc. lactis* subsp. *lactis*.

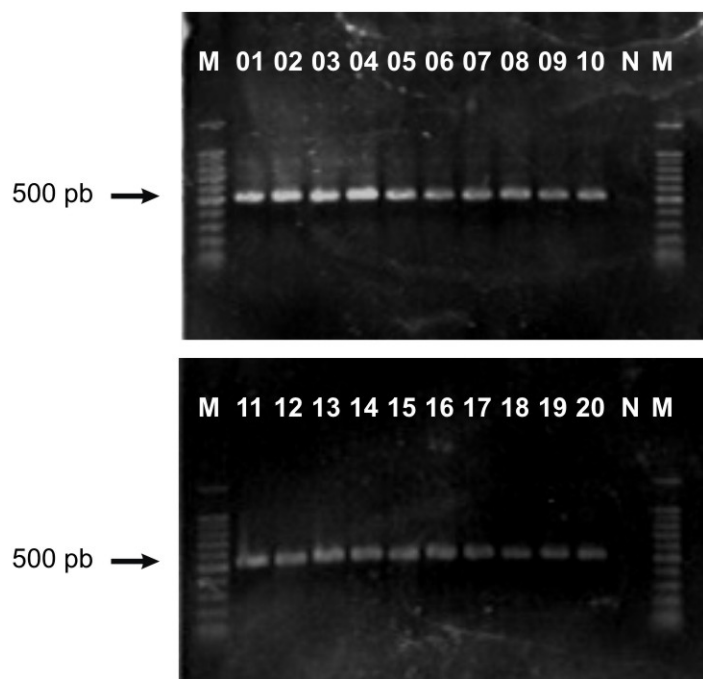


Figura 1. Produto de PCR evidenciados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se o par de oligonucleotídeo plb 16 e mlb 16. (M: marcador de 100 pb; N: controle negativo)

Tabela 2. Identificação de culturas de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas isoladas de leite cru e queijo minas frescal e informações genéticas obtidas por sequenciamento do gene 16S rRNA.

Origem	Número de culturas identificadas	Espécie	Cepa	Identidade	N. GenBank
Leite cru	5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	RO37	482/485	AF515226.1
	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	RO37	471/485	AF515226.1
	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	RO37	481/485	AF515226.1
	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	RO37	466/485	AF515226.1
	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	0711XYBLS	480/484	EU869288.1
			<i>Lactococcus lactis</i>	SL3	480/484
Queijo minas frescal	7	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	RO37	482/485	AF515226.1
	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	RO37	464/485	AF515226.1
	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	IL1403	484/491	AE006456.1
	1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	498/505	AL935261.1
	1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	L5	496/501	DQ239698.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	L2	496/501	DQ239695.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP3	496/501	AY675256.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	496/501	AL935261.1

Lb. plantarum e *Lc. lactis* subsp. *lactis* são descritos como BAL bacteriocinogênicas. *Lb. plantarum* é capaz de produzir diferentes tipos de plantaricinas, bacteriocinas que apresentam atividade antimicrobiana contra vários microrganismos, como BAL e *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes* e algumas espécies da família Enterobacteriaceae (Hernández et al., 2005; Chen and Hoover, 2003). *Lc. lactis* subsp. *lactis* é capaz de produzir várias bacteriocinas, como a nisina, a bacteriocina melhor caracterizada e inócua (Cooter et al., 2005; Chen and Hoover, 2003). A nisina por possuir um amplo espectro de ação contra diferentes microrganismos Gram positivos, como BAL e patógenos como *L. monocytogenes*, *Clostridium* spp. e *S. aureus* (Chen & Hoover, 2003), é utilizada como conservante pela indústria de alimentos (Cooter et al., 2005).

Metodologias moleculares são rotineiramente aplicadas na identificação de BAL, principalmente para estudos de caracterização em microbiota de alimentos fermentados (Gala et al., 2008; Renye Jr. et al., 2008; Botes et al., 2007; Fortina et al., 2003). Em estudos de antagonismo essas metodologias são extremamente importantes, pois permitem a identificação precisa de BAL isoladas (Mohania et al., 2008), dos genes conhecidos como codificadores de bacteriocinas já descritas, e também de novas sequências de genes que codificam novos metabólitos antimicrobianos (Nes & Johnsborg, 2004). Entre as 18 culturas identificadas como *Lc. lactis* subsp. *lactis*, apenas 7 (31M7, 17M2, 48M5, 54M2, 22M8, 19M3 e 32M3) apresentaram positividade às reações de PCR para detecção de nisina (Figura 2).

A atividade antimicrobiana da nisina e outras bacteriocinas depende do ambiente, do pH do meio, da resistência dos microrganismo patogênicos e das enzimas envolvidas (Chollet et al., 2008; Castellano et al., 2008). Nisina apresenta resistência à tripsina, α -quimotripsina, catalase e pepsina e sensibilidade a proteinase k (Chollet et al., 2008; Benkerroum et al., 2000). Considerando os resultados de caracterização de atividade bacteriocinogênica obtidos (Figura 3), apenas a cultura 32M3 aparentemente produz exclusivamente nisina. Pelos resultados dos testes enzimáticos, os demais isolados com resultados positivos para nisina (31M7, 17M2, 48M5, 54M2, 22M8 e 19M3) não demonstraram a produção dessa substância ou produziram também outras bacteriocinas (Figura 3), podendo ter o gene e não o expressar.

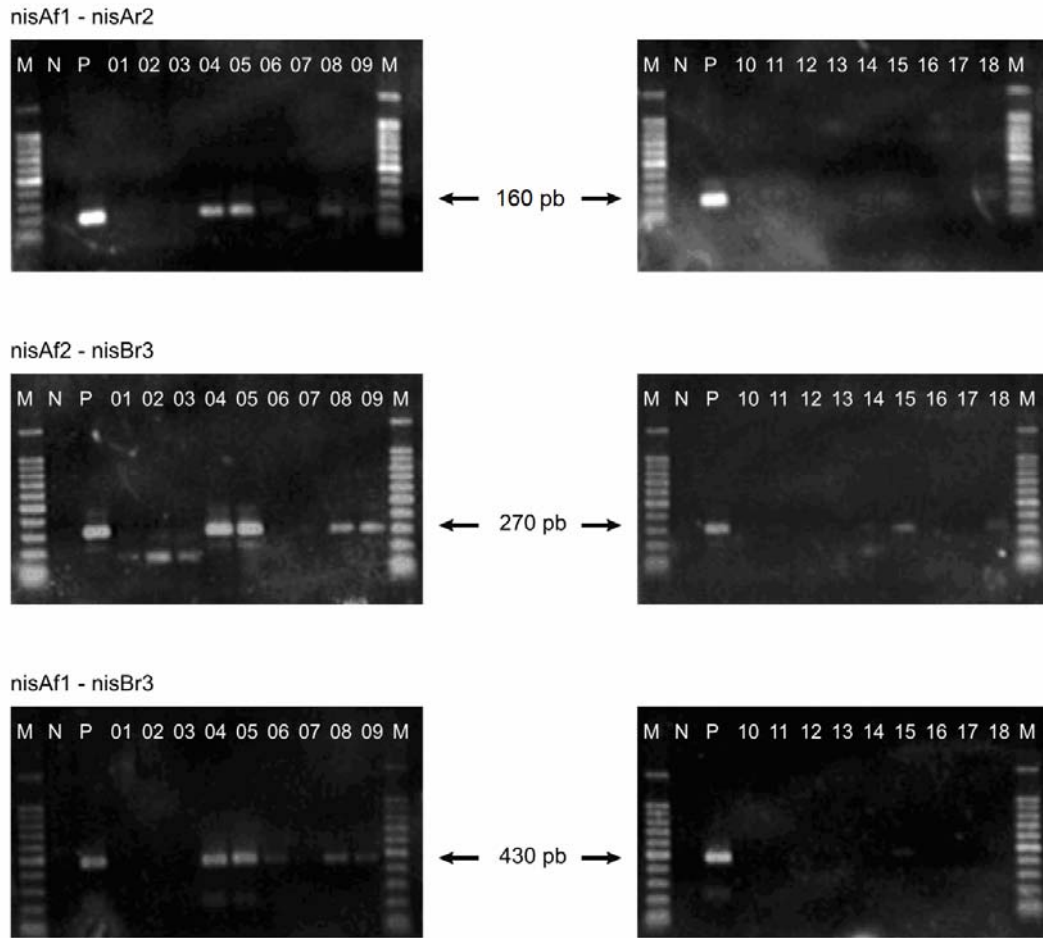


Figura 2. Produto de PCR evidenciados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se os pares de oligonucleotídeos codificadores de nisina: nisaf1-nisar2 (~160pb); nisaf2-nisbr3 (~270pb); nisaf1-nisbr3 (~430pb). (M: marcador de 100pb; N: controle negativo; P: controle positivo)

Associando os resultados da análise filogenética, identificação pelo sequenciamento genético, perfil enzimático das bacteriocinas produzidas e presença de variações do gene para codificação de nisina, é possível observar uma grande variabilidade entre os isolados (Figura 3). As 11 culturas de *Lc. lactis* subps. *lactis* pertencentes ao maior agrupamento filogenético apresentaram diferenças relevantes na sensibilidade enzimática das bacteriocinas produzidas e presença de genes para nisina. Os resultados obtidos indicam a capacidade de produção de outros tipos de bacteriocinas pelas culturas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* identificadas, indicando um amplo espectro de atividade antimicrobiana (Deegan et al., 2006). Esses resultados indicam que a utilização isolada de metodologias convencionais para detecção de

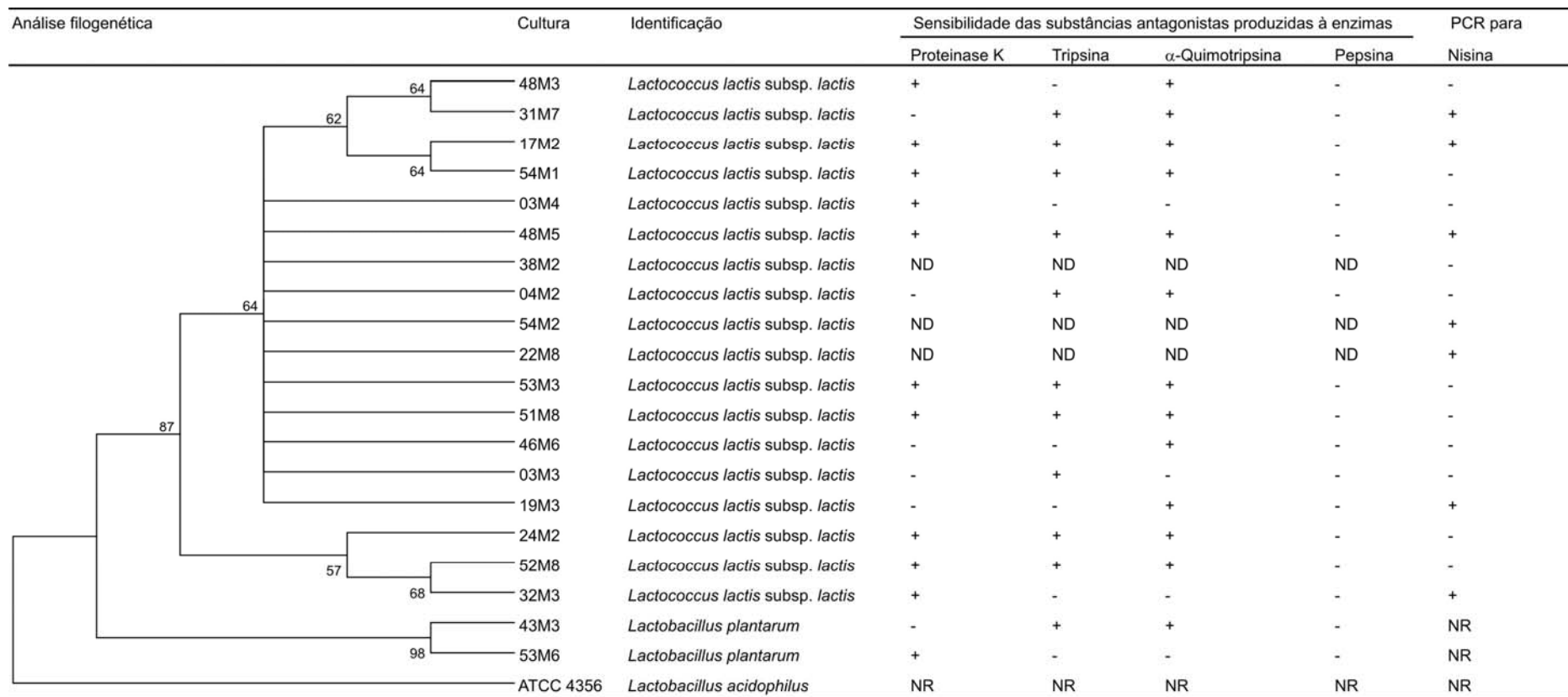


Figura 3. Agrupamento genético baseado na sequência parcial de nucleotídeos do *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, identificação por sequenciamento genético, sensibilidade a enzimas e presença de genes relacionados à codificação de nisina de culturas de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas isoladas de leite cru e queijo minas frescal. O comprimento da barra horizontal dos grupos é proporcional à distância genética entre os isolados. Os números sobre os grupos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas. ND: não detectável. NR: não realizado.

atividade bacteriocinogênica ou moleculares para identificação de genes codificadores de bacteriocinas pode gerar resultados inconclusivos, pois foi possível a identificação de culturas sem evidência de produção de bacteriocinas, mas contendo genes codificadores de nisina (54M2 e 22M8). Vários fatores podem explicar esses resultados, como a influência das condições ambientais e não indução de expressão de genes codificadores de bacteriocinas, que podem ser causados por mutações, perdas ou rearranjos genéticos (Gálvez et al., 2007).

A caracterização de BAL bacteriocinogênicas e suas bacteriocinas é um importante instrumento para atender a atual tendência mundial de consumo de produtos naturais e minimamente processados. Isso tem estimulado a indústria de alimentos a utilizar bacteriocinas, em conjunto ou não com os seus microrganismos produtores (BAL), na tentativa de reduzir o risco de contaminação natural por patógenos e deteriorantes (de Martinis & Freitas, 2003). Assim, esse estudo demonstrou a presença de BAL isoladas de leite cru e queijo minas frescal com predomínio de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, com capacidade de produzir nisina e outros tipos de bacteriocinas, com potencial aplicação em alimentos para o controle de *L. monocytogenes*. Para tal aplicação, são necessários mais estudos para esclarecer o potencial antimicrobiano dessas culturas.

Agradecimentos

CNPq (bolsa de mestrado e projeto de pesquisa 474044/2006-8) e FAPEMIG (projetos de pesquisa CVZ 301/06 e CVZ APQ-2602-5.05/07). Profa. Dra. Elaine de Martinis da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo), pelo auxílio na padronização dos testes enzimáticos e concessão da cultura de *Lb. sakei* 2a. Prof. Dr. Antonio Fernandes de Carvalho, do Departamento e Tecnologia de Alimentos (Universidade Federal de Viçosa), pela concessão da cultura de *Lc. lactis* subsp. *lactis* DY 13.

Referências bibliográficas

- ADAMS, M.; MITCHELL, R. (2002) Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 75-83.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. 2004. *Lactic Acid Bacteria - Microbiological and Functional Aspects*. 3^a ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.
- BENKERROUM, N.; OUBEL, H.; ZAHAR, M.; DLIA, S; FILALI-MALTOUF, A. (2000) Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 960-968.
- BOTES, A.; TODOROV, S. D.; VON MOLLENDORFF, J. W.; BOTHA, A.; DICKS, L. M. T. (2007) Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza. *Process Biochemistry*, 42, 267-270.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28:4, 281-370.
- CARVALHO, A. A. T.; de PAULA, R. A.; MANTOVANI, H. C.; MORAES, C. A. (2006) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiology*, 23, 213-219.
- CASALTA, E.; MONTEL, M. C. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 271-273.
- CASLA, D.; REQUENA, T.; GOMEZ, R. (1996) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPLI 05. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 35-41.
- CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. (2008) A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 483-499.

- CHEN, H.; HOOVER, D.G. (2003) Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science Technology*, 2, 82-100.
- CHOLETT E.; SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; DEGRAEVE, P. (2008) Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, 19, 982-989.
- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; SMACCHI, E. (1996) Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiology*, 13, 447-456.
- COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P.R. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews - Microbiology*, 3, 777-788.
- COVENTRY, M. J.; GORDON, J. B.; WILCOCK, A.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B.E.; HICKEY, M.W.; HILLIER, A.J.; WAN, J. (1997) Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 248-258.
- DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. (2003a) Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 29, 114-119.
- DE MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. (1998) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 119-126.
- DE MARTINIS, E. C. P.; FREITAS, F. Z. (2003) Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin production. *Food Control*, 14, 197-200.
- DE MARTINIS, E. C. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. (2003b) Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias

- láticas isoladas de produtos cárneos embalados à vácuo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23:2, 195-199.
- DEEGAN, L. C.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. (2006) Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.
- DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. (2008) Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25, 392-399.
- EL-GAZZAR, F. E.; BOHNER, H. F.; MARTH, E. H. (1992) Antagonism between *Listeria monocytogenes* and lactococci during fermentation of products from ultrafiltered skim milk. *Journal of Dairy Science*, 75, 43-50.
- ESPECHE, M. C.; OTERO, M. C.; SESMA, F.; NADER-MACIAS, M. E. F. (2008) Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary Microbiology*, article in press, 1-12.
- FORTINA, M. G.; RICCI, G.; ACQUATI, A.; ZEPPA, G.; GANDINI, A.; MANACHINI, P. L. (2003). Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology*, 20, 397-404.
- FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. (2009) Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19, 3-11.
- GALA, E.; LANDI, S.; SOLIERI, L.; NOCETTI, M.; PULVIRENTI, A.; GIUDICI, P. (2008) Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 347-351.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.
- GIRAFFA, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.

- HARRIS, L. J.; DAESCHEL, M. A.; STILES, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. (1989) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52, 384-387.
- HEIKKILÄ, M. P.; SARIS, P. E. J. (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by comensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 471-478.
- HERNÁNDEZ, D.; CARDELL, E.; ZÁRATE V. (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 77-84.
- HOLZAPFEL, H. W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S-373S.
- HOOVER, D. G.; STEENSON, L. R. (1993) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, Inc. San Diego. 07-11, 36-91.
- ISSA, M. S.; RYSER, E. T. (2000) Fate of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Escherichia coli* O157:H7 in labneh as a pre and postfermentation contaminant. *Journal of Food Protection*, 63:5, 608-612.
- JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. (1995) Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59:2, 171-2000.
- KULLEN, M.J.; SANOZKY-DAWES, R.B.; CROWELL, D.C.; KLAENHAMMER, T.R. (2000) Use of DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 511-518.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67-78.
- LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. (1991) Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:6, 1683-1688.

- LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 13, 145-150.
- LI, H.; O'SULLIVAN, D.J. (2002) Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin, in a dairy *Enterococcus* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3392-3400.
- MALDONADO, A; RUIZ-BARBA, J.L.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. (2003) Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 383-389.
- MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SING, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. (2008) Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Disease*, 9, 190-198.
- MONTVILLE, T.J.; KAISER, A. (1993) Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In: Hoover, D.G.; Steenson, L.R. (ed). *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press: New York: 1-22.
- MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F. F. (1999) Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Revista de microbiologia*, 30, 130-136.
- NES, I. F.; JOHNSBORG, O. (2004) Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 100-104.
- POSPIECH, A.; NEUMANN, B. (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram positive bacteria. *Trends Genetics*, 11, 217-218.
- RASHID, M. H.; TOGO, K.; UEDA, M.; MIYAMOTO, T. (2008) Characterization of bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* J2 40-2 isolated from traditional fermented milk 'Dahi'. *Animal Science Journal*, in press.
- RENYE JR J. A.; SOMKUTI G. A.; VALLEJO-CORDOBA B.; VAN HEKKEN D. L.; GONZALEZ-CORDOVA A.F. (2008) Characterization of the microflora

- isolated from queso fresco made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Safety*, 28, 59-75.
- RODRÍGUEZ, E.; GONZÁLEZ, B.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. (2000) Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 10, 7-15.
- ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.
- SALAMA, M. S.; SANDINE, W. E.; GIOVANNONI, S. J. (1995) A milk-based method for detecting antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 78, 1219-1223.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74:12, 5463-5467.
- SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.K. (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901-1906.
- SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. (2008) Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18, 329-343.
- STILES, M. E. (1994) Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *Journal of Dairy Science*, 77, 2718-2724.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599. Disponível em <http://www.kumarlab.net/publications>
- TODOKORO, D.; TOMITA, H.; INOUE, T.; IKE, Y. (2006) Genetic analysis of bacteriocin 43 of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6955-6964.

- THUAULT, D.; BELIARD, E.; LE GUERIN, J.; BOURGEOIS, C. M. (1991) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 74, 1145-1150.
- TÜKEL, Ç. L.; AVS, AROĞLU, M. D.; SİMS, EK, O.; AKÇELİK, M. (2007) Isolation and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MC38. *Journal of Food Safety*, 27, 17-29.
- VAN REENEN, C.A.; DICKS L.M.T.; CHIKINDAS M.L. (1998) Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1131-1137.
- VAN REENEN, C.A.; CHIKINDAS, M.L.; VAN ZYL, W.H.; DICKS L.M.T. (2003) Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Sacharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 29-40.
- WEHR, H. M.; FRANK, J. F. (2004) *Standard methods for the examination of dairy products*. American Public Health Association, Washington. 570p.
- WINKOWSKI, K.; CRANDALL, A. D.; MONTVILLE, T. J. (1993) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:8, 2552-2557.

CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho conclui-se que:

- ✓ As amostras analisadas de leite cru e queijo minas frescal apresentaram baixa qualidade microbiológica, devido a altas contagens de microrganismos indicadores de higiene (aeróbios mesófilos, coliformes totais e *Escherichia coli*) e bactérias ácido lácticas (BAL). Entretanto, foi verificada uma relativa segurança microbiológica, devido à ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.* e baixas contagens de Estafilococos coagulase positivos;
- ✓ Foi detectada BAL naturalmente presentes nas amostras com atividade antagonista em relação a *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Lactobacillus sakei*. Mas em relação à *Salmonella* Typhimurium não foi verificada atividade antagonista;
- ✓ Foi possível observar uma importante participação de BAL na microbiota das amostras, e conseqüente interferência no isolamento de patógenos Gram positivos devido à produção de substâncias antimicrobianas;
- ✓ As substâncias antimicrobianas produzidas por BAL contra *L. monocytogenes* tiveram confirmação de sua natureza bacteriocinogênica devido sua sensibilidade em relação a diferentes enzimas proteolíticas;
- ✓ As culturas bacteriocinogênicas foram identificadas por sequenciamento genético como *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum*, divididas em treze cepas distintas e em diferentes grupos filogenéticos;
- ✓ Algumas culturas de BAL antagonistas identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* apresentaram genes codificadores de nisina;
- ✓ Foi verificada uma grande variabilidade entre identificação das culturas bacteriocinogênicas, perfil filogenético, sensibilidade a enzimas e presença de genes codificadores de nisina, indicando a necessidade de estudos moleculares e convencionais na caracterização dessas culturas para exploração de seu uso como ferramentas para garantia de segurança alimentar.

Os dados científicos disponíveis sobre interações microbianas que ocorrem em leite cru, permitem concluir que a microbiota desse produto exerce uma atividade

inibitória significativa em relação a microrganismos patogênicos, especialmente *Listeria monocytogenes*.

Considerando essas evidências, é necessária a continuidade das atividades de pesquisa, visando a elucidação completa de como as BAL isoladas do leite cru com atividade antimicrobiana determinam o controle de *L. monocytogenes* em condições similares às de produção e conservação desse produto. Assim, estudos mais detalhados das BAL isoladas são necessários a fim de se verificar a presença de genes codificadores de bacteriocinas já caracterizadas, além de esclarecer o espectro de ação, quais são as condições ideais para se obter a melhor performance antimicrobiana e como fatores comuns do processo industrial podem afetar essa atividade. Essa caracterização detalhada é indispensável para uma possível aplicação futura dessas cepas no controle de microrganismos patogênicos pela indústria de alimentos.

Uma vez caracterizado o potencial de inibição das BAL isoladas de leite cru, as mesmas poderão ser aproveitadas de forma adequada pela indústria de alimentos a fim de garantir segurança alimentar em leite e derivados, além de outros produtos.

ANEXOS

Meios de cultura e reagentes utilizados

- Petrifilm™ AC
 - 3M Microbiology (St. Paul, MN, USA)
- Petrifilm™ EC
 - 3M Microbiology
- Ágar e caldo de Mann-Rogosa-Sharpe (MRS)
 - CM361, Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hampshire, England)
 - CM359, Oxoid Ltd.
 - 288130, BD - Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA)
- Ágar Baird-Parker e Emulsão de gema de ovo com telurito
 - CM275B, Oxoid Ltd.
 - SR0054C, Oxoid Ltd.
- Caldo infusão de cérebro e coração (BHI)
 - CM225, Oxoid Ltd.
- Ágar DNase: (para 100 mL)
 - 1,32 g ágar DNase
 - 0,11 g CaCl₂
 - 0,925g NaCl
 - 0,0083 g azul de toluidina
 - 0,61 g tris aminometano
 - 100 mL água destilada
- Caldo de enriquecimento para *Listeria* e Suplemento seletivo para *Listeria*
 - CM862, Oxoid Ltd.
 - SR141E, Oxoid Ltd.
- Ágar seletivo *Listeria* (formulação Oxford) e Suplemento Seletivo para *Listeria* (formulação Oxford)
 - CM856, Oxoid Ltd.
 - SR140, Oxoid Ltd.
- Ágar base Palcam e Suplemento seletivo Palcam
 - CM877B, Oxoid Ltd.
 - SR150, Oxoid Ltd.

- Caldo Lactosado
 - CM137, Oxoid Ltd.
- Caldo Tetracionato
 - CM671B, Oxoid Ltd.
- Solução de lugol
 - 6 g iodo
 - 5 g iodeto de potássio
 - 20 mL água destilada
 - Adicionar 0,2 mL em 10 mL de caldo tetracionato
- Solução verde-brilhante 0,1%
 - 0,1 g corante verde brilhante
 - 100 mL água destilada
 - Adicionar 0,1 mL em 10 de caldo tetracionato
- Caldo Rappaport-Vassiliadis
 - CM669B, Oxoid Ltd.
- Ágar Bismuto Sulfito
 - 273300, BD - Becton, Dickinson and Company
- Ágar Entérico de Hektoen (Oxoid)
 - CM419, Oxoid Ltd.
- Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (Oxoid)
 - CM469B, Oxoid Ltd.
- Ágar Tríplice Açúcar Ferro
 - 226540, BD - Becton, Dickinson and Company
- Ágar Lisina Ferro
 - 284920, BD - Becton, Dickinson and Company
- Antisoro polivalente somático para *Salmonella sp.*
 - Probac do Brasil Ltda. (São Paulo, SP, Brasil)
- Antisoro polivalente flagelar para *Salmonella sp.*
 - Probac do Brasil Ltda.
- Ágar e Caldo Trypticase de Soja (TSA) (Oxoid)
 - CM131, Oxoid Ltd.
 - CM129, Oxoid Ltd.

- Ágar M17
 - CM817, Oxoid Ltd.
- Ágar bacteriológico
 - Agar agar powder DAB6, Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA)
- Geradores de anaerobiose
 - Anaerobac, Probac do Brasil Ltda.
- Catalase
 - C1345, catalase de fígado bovino. Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
 - 1 mg em 1 mL de tampão fosfato: concentração final de 100 UI/mL
 - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2 µm
- Tampão fosfato de potássio 50 mM
 - 6,72 g KH_2PO_4 monobásico
 - 500 mL água destilada
 - Dissolver, ajustar o pH em 7,0 e completar para 1000 mL
 - Autoclavar convencionalmente
- Ágar MRS modificado
 - 10 g Peptona de protease 3
 - 10 g Extrato de carne
 - 5 g Extrato de levedura
 - 5 g Dextrose
 - 1 g Polissorbato 80
 - 2 g Citrato de amônia
 - 5 g Acetato de sódio
 - 0,1 g Sulfato de magnésio
 - 0,05 g Sulfato de manganês
 - 2 g Fosfato de potássio bibásico
 - 1000 mL água destilada
 - Dissolver todos os componentes e autoclavar convencionalmente
- Pepsina
 - P7012, pepsina de mucosa gástrica de suíno. Sigma-Aldrich Co.
 - 20 mg em 1 mL de água destilada

- Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2 µm (Millex GP, Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland)
- α-quimotripsina
 - C4129, α-quimotripsina de pâncreas bovino tipo II. Sigma-Aldrich Co.
 - 20 mg em 1 mL de água destilada
 - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2 µm (Millex GP, Millipore)
- Proteinase K
 - P8044, proteinase K de *Tritirachium album*. Sigma-Aldrich Co.
 - 20 mg em 1 mL de água destilada
 - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2 µm (Millex GP, Millipore)
- Tripsina
 - T1426, tripsina de pâncreas de bovino. Sigma-Aldrich Co.
 - 20 mg em 1 mL de água destilada
 - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2 µm (Millex GP, Millipore)
- Kit Illustra™ PureTaq Ready-to-go PCR beads (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK).
- Kit Wizard® SV Gel (Promega Corp., Madison, WI, USA)
- Kit PCR Clean-Up System (Promega)
- Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega)
- Oligonucleotídeos
 - plb16 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3')
 - mlb16 (5' GGCTGCTGGCACGTAGTTAG 3')
 - nisAf1 (5' AAA ATG AGT ACA AAA GAT TTY AAC 3')
 - nisBr3 (5' TGC ATA ACA TCA TAG AGT TTA GG 3')
 - nisAf2 (5' TTC ACG TAA GCA AAT AAC CA 3')
 - nisAr2 (5' TGG TTA TTT GCT TAC GTG AA 3')
 - Todos da XX IDT - Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) e importados pela Prodimol Biotecnologia (Belo Horizonte, MG, Brasil).

Tabela 1. Contagens de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC) e Bactérias Ácido Láticas (BAL), Estafilococos coagulase positivoss (ECP), *Listeria monocytogenes* (LM) e *Salmonella sp.* (SAL) de amostras de leite cru e queijo minas frescal produzido com leite cru na região de Viçosa, MG valores em Unidades Formadoras de Colônias/mL ou gr).

Tipo de amostra	Amostra	AM	CT	EC	BAL	ECP	LM	SAL
Leite cru	1	< 1000	550	< 10	1400	112	ausência	ausência
	2	750000	1610	< 10	392000	< 10	ausência	ausência
	3	10000	40	20	1600	22	ausência	ausência
	4	40000	70	< 10	6950	ND	ausência	ausência
	5	30000	10	< 10	3950	< 10	ausência	ausência
	6	10000	60	30	2850	384	ausência	ausência
	7	30000	30	10	4000	< 10	ausência	ausência
	8	103000	420	< 10	8900	4625	ausência	ausência
	9	720000	< 10	< 10	223000	> 250000	ausência	ausência
	10	31000	90	< 10	5500	10000	ausência	ausência
	11	1450000	13500	< 10	152000	14100	ausência	ausência
	12	345000	30	30	182500	< 10	ausência	ausência
	13	1180000	170	< 10	943000	98700	ausência	ausência
	14	89000	< 10	< 10	7550	64800	ausência	ausência
	15	31000	220	110	4100	600	ausência	ausência
	16	52000	20	< 10	24700	5940	ausência	ausência
	17	24000	50	< 10	5600	< 10	ausência	ausência
	18	1190000	1900	< 10	> 30000	< 10	ausência	ausência
	19	900000	460	< 10	57000	< 10	ausência	ausência
	20	2430000	890	< 10	137000	5000	ausência	ausência
	21	28000	10	< 10	3350	17500	ausência	ausência
	22	43000	790	< 10	13550	< 10	ausência	ausência

ND: não determinada

Continuação da Tabela 1.

Tipo de amostra	Amostra	AM	CT	EC	BAL	ECP	LM	SAL	
Leite cru	23	257000	1700	< 10	15650	< 10	ausência	ausência	
	24	12000	10	< 10	3500	< 10	ausência	ausência	
	25	3710000	> 25000	< 10	773000	< 10	ausência	ausência	
	26	5000	< 10	< 10	400	600	ausência	ausência	
	27	5000	70	10	750	< 10	ausência	ausência	
	28	> 2500000	> 25000	< 10	1978000	< 10	ausência	ausência	
	29	148000	1130	< 10	33500	2000	ausência	ausência	
	30	255000	< 10	< 10	ND	9000	ausência	ausência	
	31	326000	30	< 10	5250	< 10	ausência	ausência	
	32	1830000	14000	< 10	7000	24090	ausência	ausência	
	33	46000	18200	< 10	19450	< 10	ausência	ausência	
	34	369000	> 25000	< 10	1250	< 10	ausência	ausência	
	35	32000	610	260	6300	58500	ausência	ausência	
	36	> 2500000	> 25000	< 10	ND	< 10	ausência	ausência	
	Queijo	1	12600000	8400	3700	8740000	5000	ausência	ausência
		2	1010000000	28000000	< 100	821500000	< 100	ausência	ausência
3		22500000	32000000	< 100	53300000	< 100	ausência	ausência	
4		860000000	38000000	< 100	523000000	< 100	ausência	ausência	
5		36500000	92000000	< 100	83900000	< 100	ausência	ausência	
6		53900000	44000000	< 100	277600000	28500	ausência	ausência	
7		920000000	15200000	< 100	625000000	< 100	ausência	ausência	
8		640000000	300000	< 100	605000000	< 100	ausência	ausência	
9		6800000	132000	< 100	90000	< 100	ausência	ausência	
10		45500000	< 100	< 100	30000	< 100	ausência	ausência	

ND: não determinada.

Continuação da Tabela 1.

Tipo de amostra	Amostra	AM	CT	EC	BAL	ECP	LM	SAL
Queijo	11	11700000	213000	< 100	4250000	1680	ausência	ausência
	12	41000000	400000	100000	24000000	< 100	ausência	ausência
	13	3000000	< 100	< 100	100000	< 100	ausência	ausência
	14	129000000	131000	< 100	30000000	< 100	ausência	ausência
	15	230000000	> 25000000	< 100	262000000	< 100	ausência	ausência
	16	79000000	90000	< 100	15100000	< 100	ausência	ausência
	17	345000000	> 25000000	< 100	267500000	< 100	ausência	ausência
	18	48000000	449000	< 100	40000000	< 100	ausência	ausência

ND: não determinada.

Tabela 2. Raio dos halos de inibição (mm) verificados no teste de antagonismo das culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas frescal contra

Listeria monocytogenes, *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus sakei*.

Cultura	Origem	Microrganismo-alvo		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
1M8	leite	ND	1	ND
2M3	leite	ND	1	ND
3M3	leite	3	ND	2,5
3M4	leite	3	ND	3
3M5	leite	3	ND	ND
3M6	leite	2	ND	ND
3M7	leite	2	ND	3
3M8	leite	2,5	ND	3
4M1	leite	1,5	ND	ND
4M2	leite	2,5	ND	3
4M3	leite	1,5	ND	ND
4M5	leite	1	ND	ND
4M6	leite	1	ND	ND
12M1	leite	4	2	4
12M2	leite	4	3	5
12M3	leite	4	1	3
12M4	leite	6	3	5
12M5	leite	5	3	5
12M6	leite	5	3	4
12M7	leite	ND	1,5	2
12M8	leite	5	3	4
17M1	leite	3	1,5	3,5
17M2	leite	3	1,5	5
17M3	leite	ND	ND	2
17M4	leite	3	1,5	4,5
17M5	leite	4	0,5	3
17M8	leite	4	ND	4
19M2	leite	1	ND	1
19M3	leite	2	ND	3
19M4	leite	2	ND	1
19M7	leite	ND	ND	1
20M2	leite	1	ND	ND
21M4	leite	0,5	ND	ND
22M8	leite	3,5	1	2

ND: não determinada.

Continuação da Tabela 2.

Cultura	Origem	Microorganismo-alvo		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
23M4	leite	0,5	ND	ND
23M7	leite	0,5	ND	ND
24M2	leite	1	ND	1
29M1	leite	3	ND	0,5
29M3	leite	3	ND	2
29M4	leite	0,5	ND	ND
31M3	leite	2	ND	3
31M4	leite	2	ND	3
31M6	leite	ND	ND	1
31M7	leite	3	ND	3
31M8	leite	ND	ND	1
32M2	leite	1	ND	ND
32M3	leite	1	ND	1
32M4	leite	1	ND	ND
33M7	leite	1	ND	1
34M1	leite	1	ND	ND
35M2	leite	1	ND	1
35M3	leite	1	ND	1,5
35M4	leite	1	ND	1
35M6	leite	0,5	ND	1,5
35M7	leite	0,5	ND	0,5
37M1	queijo	3	ND	ND
38M2	queijo	1,5	ND	ND
38M3	queijo	1,5	ND	ND
43M1	queijo	2	ND	1,5
43M2	queijo	1,5	ND	ND
43M3	queijo	3	ND	1,5
44M2	queijo	1,5	ND	ND
44M7	queijo	2	ND	1
45M3	queijo	2	ND	ND
46M6	queijo	3	ND	3
48M3	queijo	3,5	ND	3
48M5	queijo	5	1,5	4,5
51M2	queijo	3	ND	2
51M3	queijo	3	ND	2,5
51M5	queijo	3	ND	2

ND: não determinada.

Continuação da Tabela 2.

Cultura	Origem	Microorganismo-alvo		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
51M6	queijo	3	ND	2
51M8	queijo	3	ND	2
52M5	queijo	2,5	ND	2
52M6	queijo	3	ND	2
52M7	queijo	3	ND	2
52M8	queijo	3	ND	2
53M3	queijo	2	ND	2
53M5	queijo	2,5	ND	2
53M6	queijo	3	ND	2
54M1	queijo	3	0,5	2,5
54M2	queijo	3	ND	2,5
54M3	queijo	2,5	0,5	2

ND: não determinada.

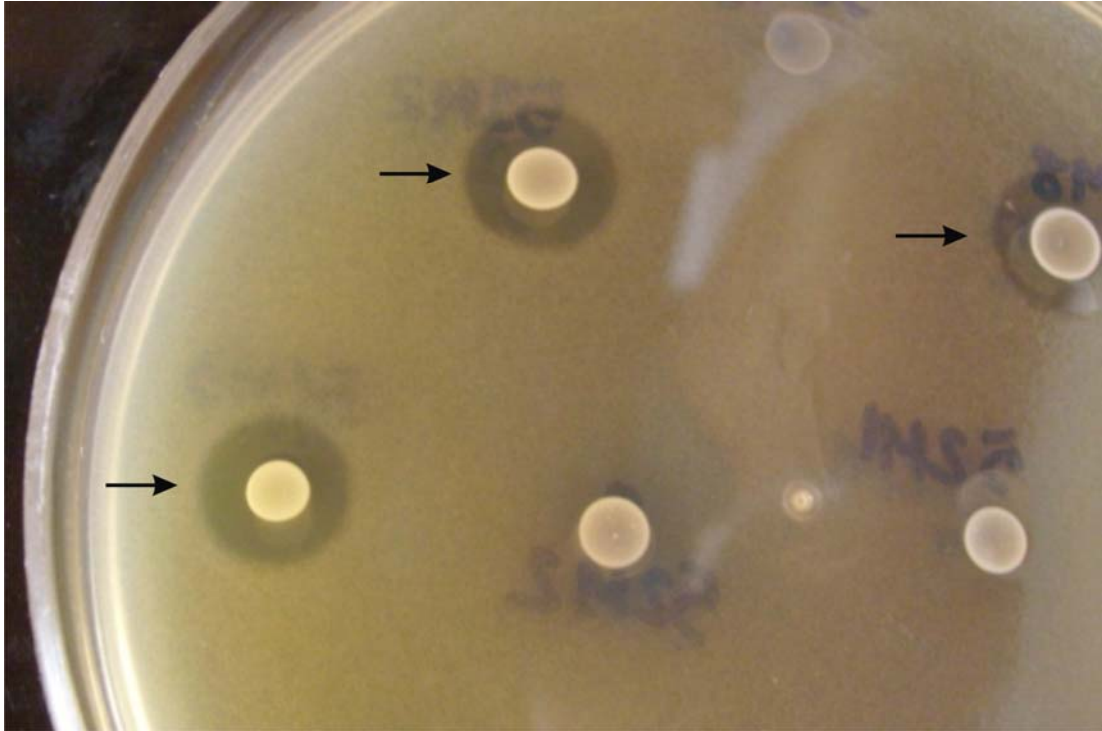


Figura 1. Halos de inibição (setas) observados no teste de detecção de atividade antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas frescal. Cultura indicadora de sensibilidade: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

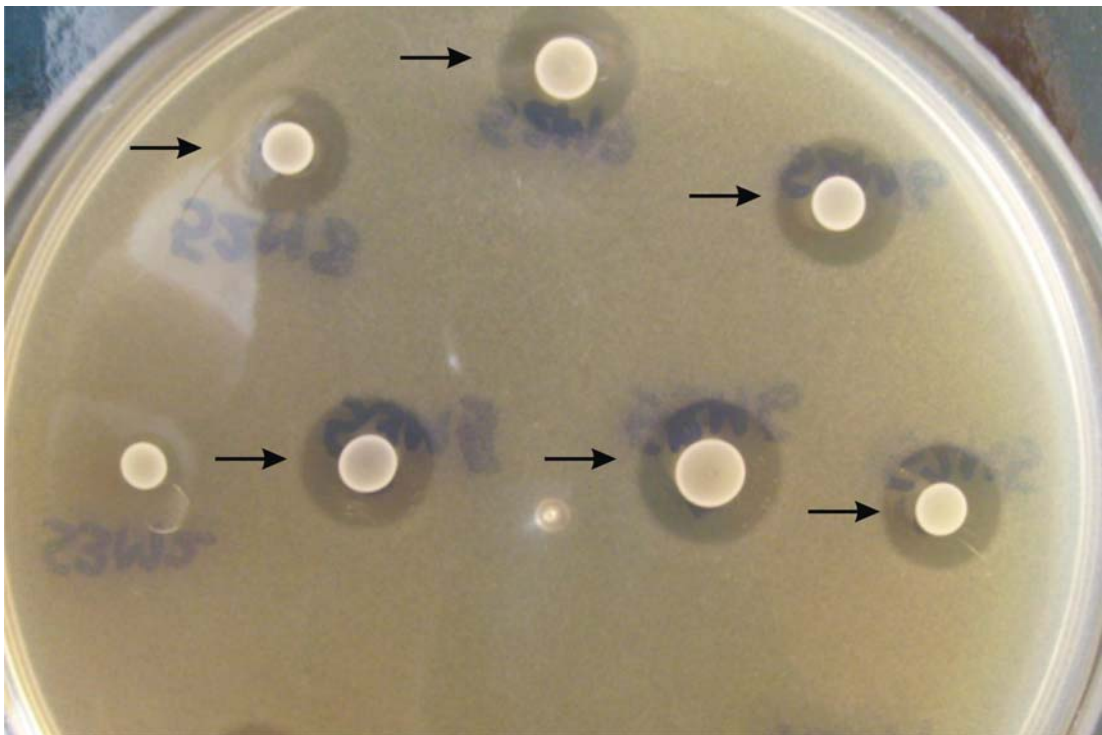


Figura 2. Halos de inibição (setas) observados no teste de detecção de atividade antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas frescal. Cultura indicadora de sensibilidade: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Capítulo 2

Tabela 1. Raio dos halos de inibição (mm) verificados no teste de atividade bacteriocinogênica das culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas frescal contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus sakei*, características morfológicas e produção de catalase.

Cultura	Origem	Microrganismo alvo			Gram	Morf.	catalase
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>			
3M3	leite	2	ND	ND	+	coco	-
3M4	leite	2	ND	ND	+	bacilo	-
3M5	leite	2	ND	2	+	coco	-
3M6	leite	1,5	ND	2	+	coco	-
3M7	leite	1,5	ND	1,5	+	coco	-
3M8	leite	1,5	ND	2	+	coco	-
4M2	leite	2	ND	ND	+	coco	-
5M6	leite	2	ND	2	+	coco	-
12M1	leite	2	1	2	+	coco	-
12M2	leite	3	2	3	+	coco	-
12M3	leite	3	2	2	+	coco	-
12M4	leite	3	2	3	+	coco	-
12M5	leite	3	2	2	+	coco	-
12M6	leite	4	2	1	+	coco	-
12M7	leite	ND	ND	3	+	coco	-
12M8	leite	3	2	2	+	coco	-
17M1	leite	3	1,5	2	+	coco	-
17M2	leite	3	1,5	2	+	coco	-
17M4	leite	3	2	2	+	coco	-
17M5	leite	3	1	2	+	coco	-
17M8	leite	3	1	2	+	coco	-
19M3	leite	1,5	ND	ND	+	coco	-
19M4	leite	2	ND	2	+	coco	-
20M2	leite	ND	ND	1	+	coco	-
21M4	leite	0,5	ND	ND	+	coco	-
22M8	leite	3	ND	1	+	coco	-
23M4	leite	0,5	ND	1	+	coco	-
24M2	leite	0,5	ND	0,5	+	coco	-
25M6	leite	1	ND	0,5	+	coco	-
29M1	leite	ND	ND	1	+	coco	-
29M3	leite	ND	ND	1	+	coco	-
31M3	leite	3	ND	2	+	coco	-

ND: não determinada.

Continuação da Tabela 1.

Cultura	Origem	Microrganismo alvo			Gram	Morf.	catalase
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>			
31M4	leite	ND	ND	2	+	coco	-
31M7	leite	2	ND	2,5	+	coco	-
32M3	leite	0,5	ND	0,5	+	coco	-
33M7	leite	1	ND	1	+	bacilo	-
35M2	leite	0,5	ND	0,5	+	coco	-
35M3	leite	0,5	ND	0,5	+	coco	-
35M4	leite	1	ND	ND	+	coco	-
35M6	leite	0,5	ND	1	+	coco	-
35M7	leite	0,5	ND	0,5	+	coco	-
38M2	queijo	3	ND	ND	+	coco	-
38M3	queijo	3	ND	ND	+	coco	-
43M1	queijo	1,5	ND	1	+	coco	-
43M2	queijo	1,5	ND	1	+	coco	-
43M3	queijo	2	ND	1	+	bacilo	-
44M7	queijo	1	ND	ND	+	coco	-
46M3	queijo	3	ND	2,5	+	coco	-
48M3	queijo	3	ND	3	+	coco	-
48M5	queijo	5	1	2,5	+	coco	-
51M2	queijo	2	ND	1,5	+	coco	-
51M3	queijo	2	ND	1,5	+	coco	-
51M5	queijo	2	ND	2	+	coco	-
51M6	queijo	2	ND	2	+	coco	-
51M8	queijo	2	ND	2	+	coco	-
52M5	queijo	2	ND	1,5	+	coco	-
52M6	queijo	2	ND	1,5	+	coco	-
52M7	queijo	2	ND	2	+	coco	-
52M8	queijo	2	ND	2	+	coco	-
53M3	queijo	2	ND	2	+	coco	-
53M5	queijo	2	ND	2	+	coco	-
53M6	queijo	2	ND	1,5	+	coco	-
54M2	queijo	2	ND	2	+	coco	-

ND: não determinada.

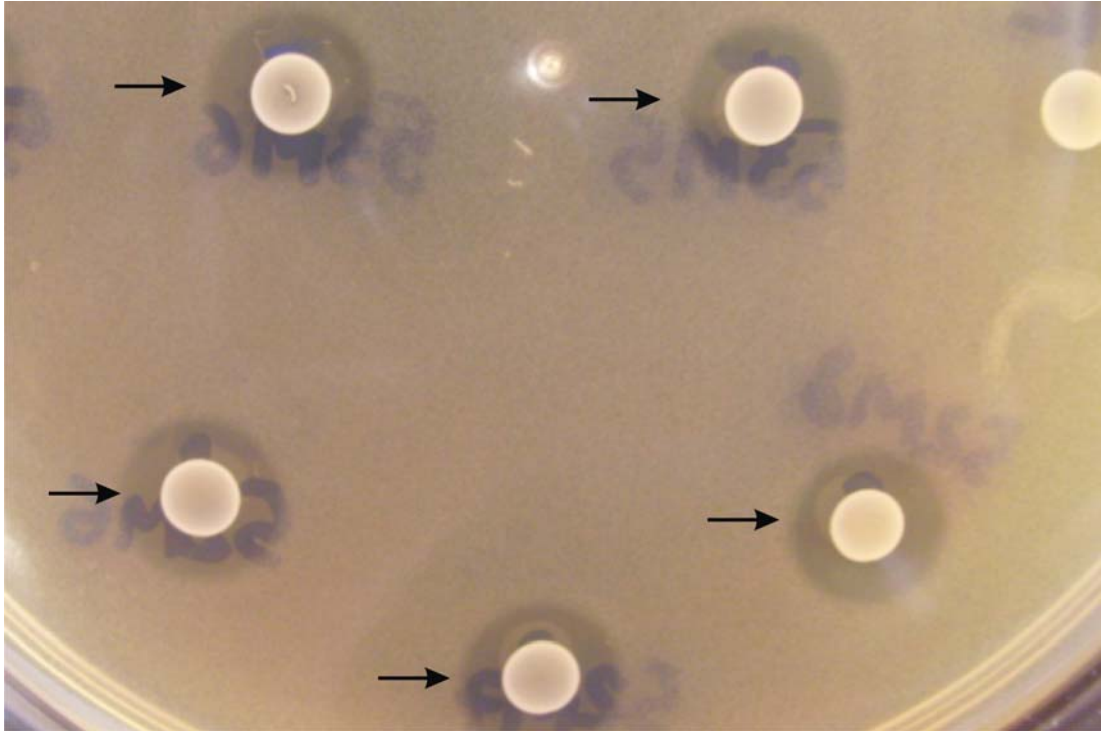


Figura 1. Halos de inibição (setas) observados no teste de detecção de atividade bacteriocinogênica de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas frescal. Cultura indicadora de sensibilidade: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

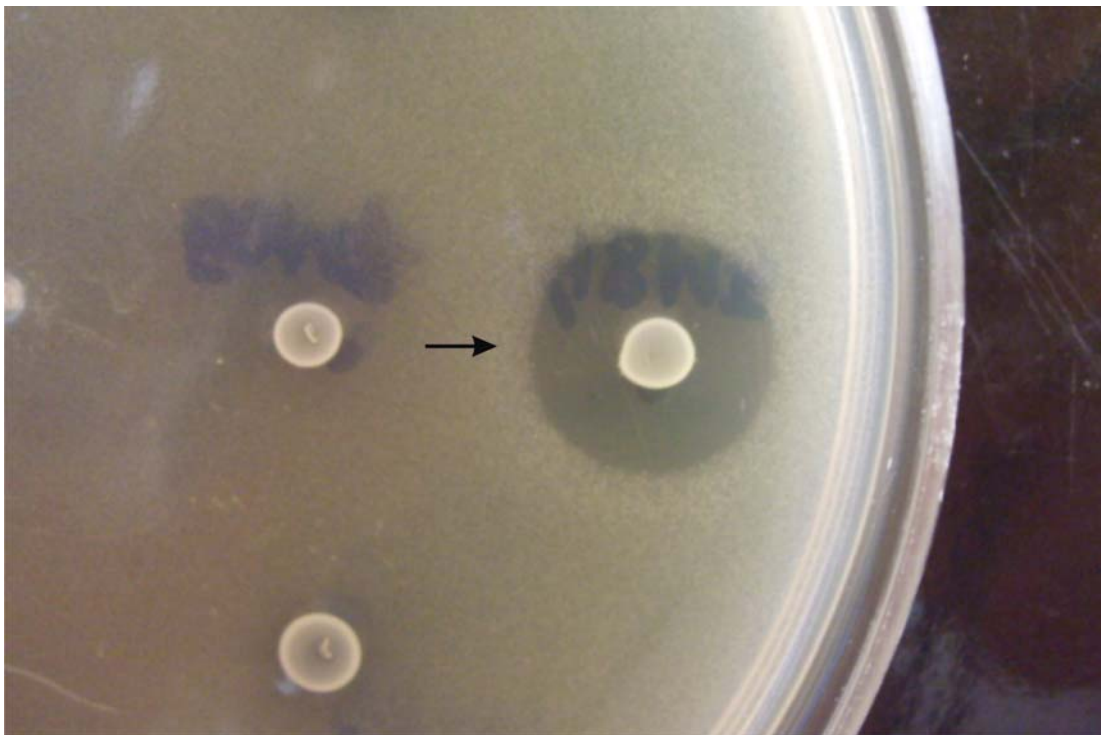


Figura 2. Halo de inibição (seta) observado no teste de detecção de atividade bacteriocinogênica de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo minas frescal. Cultura indicadora de sensibilidade: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

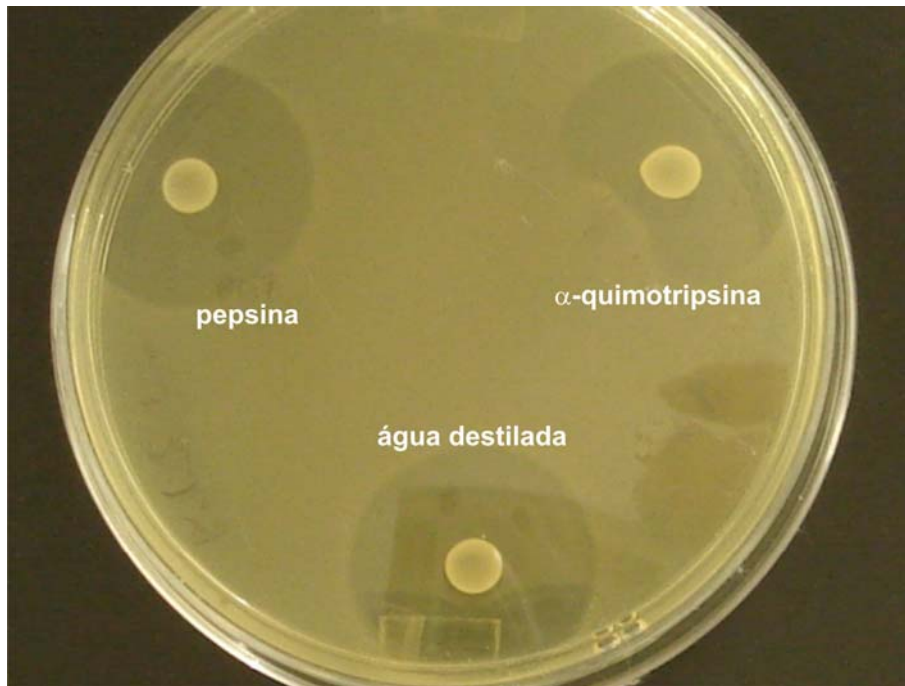


Figura 3. Teste de confirmação de natureza protéica de substâncias antagonistas produzidas pela cultura 51M8. Enzimas pepsina e α -quimotripsina, cultura indicadora de sensibilidade: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

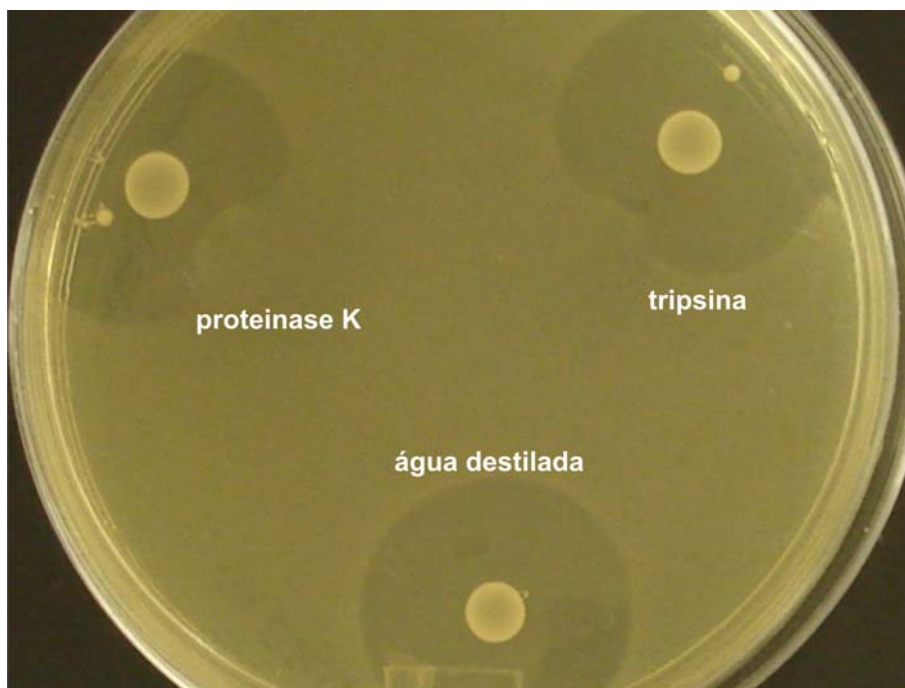


Figura 4. Teste de confirmação de natureza protéica de substâncias antagonistas produzidas pela cultura 51M8. Enzimas proteinase K e tripsina, cultura indicadora de sensibilidade: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Sequências do gene 16S rRNA apresentadas na mesma ordem em que são apresentadas na análise filogenética da figura 3 do capítulo 2.

```
>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 14  CGTC-CTTGA-GAGCTTT-CACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 70
      |||
Sbjct 485  CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 71  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 130
      |||
Sbjct 425  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 131  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 190
      |||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 191  CACCCTCTCAGGTCGGCTAATGATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 250
      |||
Sbjct 305  CACCCTCTCAGGTCGGCTAATGATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 251  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 310
      |||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 186

Query 311  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 370
      |||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 371  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 430
      |||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 431  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCAGGATCAAA 490
      |||
Sbjct 65  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCAGGATCAAA 6

Query 491  CTCTA 495
      |||
Sbjct 5  CTCTA 1
```

Figura 5. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 48M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain RO37 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
 Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
 Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 16  CGTC-CTTGA-GAGCTTTCC-CTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 72
          |||||
Sbjct 485  CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 73  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGGTTGCTCGGTTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 132
          |||||
Sbjct 425  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGGTTGCTCGGTTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 133  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 192
          |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 193  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 252
          |||||
Sbjct 305  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 253  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 312
          |||||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 186

Query 313  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 372
          |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 373  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 432
          |||||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 433  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCAGGATCAAA 492
          |||||
Sbjct 65   CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCAGGATCAAA 6

Query 493  CTCTA 497
          |||||
Sbjct 5    CTCTA 1
  
```

Figura 6. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 31M7, e identificação segundo banco de dados BLAST.

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
 Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
 Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 11  CGTC-CTTGA-GAGCTTTCC-CTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 67
      |||||
Sbjct 485  CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 68  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 127
      |||||
Sbjct 425  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 128  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 187
      |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 188  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 247
      |||||
Sbjct 305  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 248  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACTTAAAACTTGTG 307
      |||||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACTTAAAACTTGTG 186

Query 308  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCTCCGCTCAAAGGCA 367
      |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCTCCGCTCAAAGGCA 126

Query 368  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 427
      |||||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 428  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAAA 487
      |||||
Sbjct 65   CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAAA 6

Query 488  CTCTA 492
      |||||
Sbjct 5    CTCTA 1
  
```

Figura 7. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 17M2, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain RO37 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 15  CGTC-CTTGA-GAGCTTT-CACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTACGA 71
      |||||
Sbjct 485  CGTCACTTGATGAGCTTTCCTACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTACGA 426

Query 72  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGGTGCTCGGTTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 131
      |||||
Sbjct 425  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGGTGCTCGGTTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 132  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 191
      |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 192  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 251
      |||||
Sbjct 305  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 252  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTAAAACCTTGTG 311
      |||||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTAAAACCTTGTG 186

Query 312  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCGCTCAAAGGCA 371
      |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 372  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 431
      |||||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 432  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAA 491
      |||||
Sbjct 65  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAA 6

Query 492  CTCTA 496
      |||||
Sbjct 5  CTCTA 1

```

Figura 8. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 54M1, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 12  CGTC-CITGA-GAGCTTT-CACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 68
      |||||
Sbjct 485  CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 69  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 128
      |||||
Sbjct 425  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 129 ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 188
      |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 189  CACCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 248
      |||||
Sbjct 305  CACCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 249  AATAACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTAAAACCTGTG 308
      |||||
Sbjct 245  AATAACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTAAAACCTGTG 186

Query 309  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 368
      |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 369  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 428
      |||||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 429  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAAA 488
      |||||
Sbjct 65  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAAA 6

Query 489  CTCTA 493
      |||||
Sbjct 5  CTCTA 1

```

Figura 9. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 03M4, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 14   CGTC-CTTGA-GAGCTTTCC-CTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 70
          |||||
Sbjct 485   CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 71   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 130
          |||||
Sbjct 425   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 131  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 190
          |||||
Sbjct 365   ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 191  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 250
          |||||
Sbjct 305   CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 251  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACTTAAAACCTGTG 310
          |||||
Sbjct 245   AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACTTAAAACCTGTG 186

Query 311  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCTCCGCTCAAAGGCA 370
          |||||
Sbjct 185   TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCTCCGCTCAAAGGCA 126

Query 371  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 430
          |||||
Sbjct 125   GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 431  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAA 490
          |||||
Sbjct 65    CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAA 6

Query 491  CTCTA 495
          |||||
Sbjct 5    CTCTA 1

```

Figura 10. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 48M5, e identificação segundo banco de dados BLAST.

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 12   CGTC-CTTGA-GAGCTTTCC-CTCTACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 68
          |||||
Sbjct 485   CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 69   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 128
          |||||
Sbjct 425   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 129  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 188
          |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 189  CACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 248
          |||||
Sbjct 305  CACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 249  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAAACCTTGTG 308
          |||||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAAACCTTGTG 186

Query 309  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 368
          |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 369  GATTCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 428
          |||||
Sbjct 125  GATTCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 429  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGCCAGGATCAAA 488
          |||||
Sbjct 65   CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGCCAGGATCAAA 6

Query 489  CTCTA 493
          |||||
Sbjct 5    CTCTA 1
```

Figura 11. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 38M2, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 16  CGTC-CITGA-GAGCTTT-CACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 72
      |||||
Sbjct 485  CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 73  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 132
      |||||
Sbjct 425  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 133  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 192
      |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 193  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 252
      |||||
Sbjct 305  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 253  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 312
      |||||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 186

Query 313  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 372
      |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 373  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 432
      |||||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 433  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAA 492
      |||||
Sbjct 65  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAA 6

Query 493  CTCTA 497
      |||||
Sbjct 5  CTCTA 1

```

Figura 12. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 04M2, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 17  CGTC-CTTGA-GAGCITTCC-CTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 73
          |||||
Sbjct 485  CGTCACTTGATGAGCTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 74  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGC GTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 133
          |||||
Sbjct 425  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGC GTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 134 ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 193
          |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 194 CACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 253
          |||||
Sbjct 305  CACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 254 AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAAACCTTGTG 313
          |||||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAAACCTTGTG 186

Query 314 TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 373
          |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 374 GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 433
          |||||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 434 CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAA 493
          |||||
Sbjct 65   CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAA 6

Query 494 CTCTA 498
          |||||
Sbjct 5   CTCTA 1

```

Figura 13. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 54M2, e identificação segundo banco de dados BLAST.

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
 Length=1511

Score = 870 bits (471), Expect = 0.0
 Identities = 481/485 (99%), Gaps = 4/485 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 14  CGTC-CTTGA-GAGCTTTCC-CTCTCACCAACGTTCTTCTCTACC-ACAGAGTTTTACGA 69
          |||||
Sbjct 485  CGTCACTTGATGAGCTTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 70  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 129
          |||||
Sbjct 425  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 130  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCCTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 189
          |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCCTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 190  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 249
          |||||
Sbjct 305  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 250  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAAACCTTGIG 309
          |||||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAAACCTTGIG 186

Query 310  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 369
          |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 370  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 429
          |||||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 430  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAAA 489
          |||||
Sbjct 65   CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAAA 6

Query 490  CTCTA 494
          |||||
Sbjct 5    CTCTA 1
  
```

Figura 14. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 22M8, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 15  CGTC-CTTGA-GAGCTTT-CACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 71
      |||||
Sbjct 485  CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 72  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGGCTTGGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 131
      |||||
Sbjct 425  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGGCTTGGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 132  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 191
      |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 192  CACCCCTCTCAGGTCCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 251
      |||||
Sbjct 305  CACCCCTCTCAGGTCCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 252  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTAAAACCTTGTG 311
      |||||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTAAAACCTTGTG 186

Query 312  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCGCTCAAAGGCA 371
      |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 372  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 431
      |||||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 432  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAAA 491
      |||||
Sbjct 65  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAAA 6

Query 492  CTCTA 496
      |||||
Sbjct 5  CTCTA 1

```

Figura 15. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 53M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain RO37 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 13   CGTCA-TTGA-GAGCTTTCC-CTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 69
          |||
Sbjct 485   CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 70   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 129
          |||
Sbjct 425   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 130  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 189
          |||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 190  CACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 249
          |||
Sbjct 305  CACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 250  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 309
          |||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 186

Query 310  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 369
          |||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 370  GATTCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 429
          |||
Sbjct 125  GATTCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 430  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAA 489
          |||
Sbjct 65   CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAA 6

Query 490  CTCTA 494
          |||
Sbjct 5    CTCTA 1

```

Figura 16. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 51M8, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 865 bits (468), Expect = 0.0
Identities = 480/485 (98%), Gaps = 4/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 14   CGTC-CTTGA-GAGCTTT-CACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACC-ACAGAGTTTTACGA 69
          |||||
Sbjct 485   CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 70   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 129
          |||||
Sbjct 425   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 130  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 189
          |||||
Sbjct 365   ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 190  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTTACCTCACCAACTAGCT 249
          |||||
Sbjct 305   CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 250  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAACTTTGTG 309
          |||||
Sbjct 245   AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACCTTAAACTTTGTG 186

Query 310  TTTAAAGTTTTTATGCGGGATTAGCATTTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 369
          |||||
Sbjct 185   TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 370  GATTCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 429
          |||||
Sbjct 125   GATTCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 430  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAA 489
          |||||
Sbjct 65    CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAA 6

Query 490  CTCTA 494
          |||||
Sbjct 5    CTCTA 1

```

Figura 17. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 46M6, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>dbj|AB376347.1| Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence,
clone: megu74
Length=531

Score = 874 bits (473), Expect = 0.0
Identities = 481/484 (99%), Gaps = 3/484 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 13  CGTC-CITGA-GAGCTTTC-CTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 69
      |||||
Sbjct 484  CGTCACTTGATGAGCTTTCCTACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 425

Query 70  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 129
      |||||
Sbjct 424  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 365

Query 130 ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 189
      |||||
Sbjct 364  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 305

Query 190 CACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCT 249
      |||||
Sbjct 304  CACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCT 245

Query 250 AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACTTAAACTTGTG 309
      |||||
Sbjct 244  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACTTAAACTTGTG 185

Query 310 TTTAAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 369
      |||||
Sbjct 184  TTTAAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 125

Query 370 GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTCGGTACAAGTACCAACCTT 429
      |||||
Sbjct 124  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTCGGTACAAGTACCAACCTT 65

Query 430 CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAA 489
      |||||
Sbjct 64  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAA 5

Query 490 CTCT 493
      ||||
Sbjct 4  CTCT 1

```

Figura 18. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 03M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 482/485 (99%), Gaps = 3/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 14   CGTC-CTTGAT-AGCTTT-CACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTACGA 70
          |||||
Sbjct 485   CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTACGA 426

Query 71   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGGTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 130
          |||||
Sbjct 425   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGGCGGTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 131  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 190
          |||||
Sbjct 365   ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 191  CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 250
          |||||
Sbjct 305   CACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 251  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTCAAACCTAAAACCTGTG 310
          |||||
Sbjct 245   AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTCAAACCTAAAACCTGTG 186

Query 311  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 370
          |||||
Sbjct 185   TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 371  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 430
          |||||
Sbjct 125   GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 431  CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAAA 490
          |||||
Sbjct 65   CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAAA 6

Query 491  CTCTA 495
          |||||
Sbjct 5   CTCTA 1

```

Figura 19. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 19M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 785 bits (425), Expect = 0.0
Identities = 466/485 (96%), Gaps = 5/485 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 14   CGTC-CTTGAT-AGC-TT-CACTCTCACCAACGTTCTTCTCTA-CAACAGAGTTTTACGA 68
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 485   CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 69   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTTCTCCATTGCCGAAG 128
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 425   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTTCTCCATTGCCGAAG 366

Query 129  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCCCAATGIGGCCGAT 188
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCCCAATGIGGCCGAT 306

Query 189  CACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 248
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 305  CACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 249  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCTTCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 308
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCTTCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 186

Query 309  TTTAAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 368
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 369  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCTTCTCCTGTTGGTACAAGTACCTACCTT 428
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 429  CACCGCTCAACTTGTATGTGTTATGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCACGAGCTCA 488
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 65   CACCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAA 6

Query 489  CTCTA 493
          |||||
Sbjct 5   CTCTA 1

```

Figura 20. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 24M2, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 776 bits (420), Expect = 0.0
Identities = 464/485 (95%), Gaps = 4/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 12   CGTC-CTTGAT-AGCTTT-CACTCTC-CCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 67
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 485   CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGA 426

Query 68   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTTCCCCATTGCCGAAG 127
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 425   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAG 366

Query 128  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 187
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 365  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 188  CACCCCTCTCAGGTGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 247
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 305  CACCCCTCTCAGGTGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 248  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCTTCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 307
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 245  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCAATTCATCTTTCAAACCTTAAACTTGTG 186

Query 308  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCCAAGGCA 367
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 185  TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCCAAGGCA 126

Query 368  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCTTCTGTTGGTACAAGGACCAACCTT 427
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 125  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 428  CTCCGCTCAACTTGTATGIGTTATGCACGCCCCAGCGTTCGTCTGTGCCACGAGCTAA 487
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 65   CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGTGCCACGAGCTAAA 6

Query 488  CTCTA 492
          |||||
Sbjct 5   CTCTA 1

```

Figura 21. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 52M8, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|AF515226.1| Lactococcus lactis subsp. lactis strain R037 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length=1511

Score = 815 bits (441), Expect = 0.0
Identities = 471/485 (97%), Gaps = 4/485 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 12   CGTC-CTTGAT-AGCTTT-CACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACC-ACAGAGTTTTACGA 67
          |||||
Sbjct 485   CGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCACAGAGTTTTACGA 426

Query 68   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCTCCATTGCCGAAG 127
          |||||
Sbjct 425   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCTCCATTGCCGAAG 366

Query 128  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 187
          |||||
Sbjct 365   ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT 306

Query 188  CACCTCTCAGGTGCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 247
          |||||
Sbjct 305   CACCTCTCAGGTGCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCT 246

Query 248  AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCTTCTTTCAAACCTTAAAACCTTGTG 307
          |||||
Sbjct 245   AATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCTTCTTTCAAACCTTAAAACCTTGTG 186

Query 308  TTTCAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 367
          |||||
Sbjct 185   TTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCA 126

Query 368  GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCTTCTGTTGGTACAAGTACCAACCTT 427
          |||||
Sbjct 125   GATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTT 66

Query 428  CACCGCTCAACTTGTATGTGTTATGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCCTGAGCCACGATCAAA 487
          |||||
Sbjct 65   CAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCCTGAGCCACGATCAAA 6

Query 488  CTCTA 492
          |||||
Sbjct 5   CTCTA 1

```

Figura 22. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 32M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>emb|AL935261.1| D Lactobacillus plantarum strain WCFS1 complete genome; segment
10/11
Length=298050

Features in this part of subject sequence:
  rRNA-16S r-RNA

Score = 889 bits (481), Expect = 0.0
Identities = 498/505 (98%), Gaps = 5/505 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 11      CGTC-AT-CCTG-ACAGTT-CTCTCAGATATGTTCTTCTTTAAC-ACAGAGTTTTACGAG 65
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 239990  CGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAG 240049

Query 66      CCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTTCGTCCATTGTGGAAGA 125
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 240050  CCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTTCGTCCATTGTGGAAGA 240109

Query 126     TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATT 185
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 240110  TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATT 240169

Query 186     ACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTA 245
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 240170  ACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTA 240229

Query 246     ATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGC 305
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 240230  ATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGC 240289

Query 306     GGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGGGTTATCCCCCGCTTCTGGGC 365
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 240290  GGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGC 240349

Query 366     AGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAG 425
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 240350  AGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAG 240409

Query 426     CACCAATCAATACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCAGCGTTCGT 485
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 240410  CACCAATCAATACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCAGCGTTCGT 240469

Query 486     CCTGAGCCAGGATCAAACCTCAAAA 510
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 240470  CCTGAGCCAGGATCAAACCTCAAAA 240494

```

Figura 23. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 43M3, e identificação segundo banco de dados BLAST.

```

>gb|DQ239698.1| Lactobacillus plantarum strain L5 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1532

Score = 893 bits (483), Expect = 0.0
Identities = 496/501 (99%), Gaps = 5/501 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 13  CGTC-AT-CCTG-ACAGTT-CTCTCAGATATGTTCTTCTTTAAC-ACAGAGTTTTACGAG 67
          ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 501  CGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACACAGAGTTTTACGAG 442

Query 68  CCGAAACCCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCATTGTGGAAGA 127
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 441  CCGAAACCCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCATTGTGGAAGA 382

Query 128  TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATT 187
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 381  TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATT 322

Query 188  ACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTA 247
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 321  ACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTA 262

Query 248  ATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGC 307
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 261  ATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGC 202

Query 308  GGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCGCTTCTGGGC 367
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 201  GGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCGCTTCTGGGC 142

Query 368  AGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAATCATGATGCAAG 427
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 141  AGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAATCATGATGCAAG 82

Query 428  CACCAATCAATACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGT 487
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 81  CACCAATCAATACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGT 22

Query 488  CCTGAGCCAGGATCAAACCTCT 508
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 21  CCTGAGCCAGGATCAAACCTCT 1

```

Figura 24. Sequência do gene 16S rRNA da cultura de bactéria ácido láctica bacteriocinogênica 53M6, e identificação segundo banco de dados BLAST.