

NATAN DE JESUS PIMENTEL FILHO

**ATIVIDADE DAS BACTERIOCINAS BOVICINA HC5 E NISINA SOBRE
Listeria monocytogenes E *Staphylococcus aureus*
EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P644a
2010

Pimentel Filho, Natan de Jesus, 1983-

Atividade das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre
Listeria monocytogenes e *Staphylococcus aureus* em
queijo Minas frescal / Natan de Jesus Pimentel Filho.
– Viçosa, MG, 2010.
xi, 58f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-58.

1. Alimentos - Microbiologia. 2. *Listeria monocytogenes* -
Efeito da bovicina HC5. 3. *Staphylococcus aureus* - Efeito
da bovicina HC5. 4. *Listeria monocytogenes* - Efeito da
nisina. 5. *Staphylococcus aureus* - Efeito da nisina.
6. Bacteriocinas. 7. Queijo. 8. Bactérias patogênicas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

NATAN DE JESUS PIMENTEL FILHO

**ATIVIDADE DAS BACTERIOCINAS BOVICINA HC5 E NISINA SOBRE
Listeria monocytogenes E *Staphylococcus aureus*
EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2010.

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Coorientador)

Prof^a. Míriam Teresinha dos Santos

Pesq. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Dra. Rosinéia Aparecida de Paula

Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

*Quando tudo parecer impossível
vista o seu melhor sorriso
utilize o seu coração como escudo
e lute com o seu olhar,
assim derrotará os que não lhe merecem
e conquistará mais aliados
para a multidão que o
aplaude de pé...*

Alexandra Manoela Oliveira Cruz

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu alicerce, por me fortificar e me capacitar, pelas oportunidades e por renovar minhas esperanças todas as manhãs.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo financiamento desta pesquisa.

Aos meus pais, Natan e Teresinha, por sempre acreditaram em mim e incentivarem minha caminhada acadêmica.

À minha irmã, Caroline, por ser meu porto seguro, amor da minha vida, a quem sou eternamente grato por todo carinho e dedicação.

Aos meus irmãos, Giulio e David, pela união, bom humor e cumplicidade em todos os momentos.

Ao meu sobrinho, Henzo, por alegrar minha vida.

Aos meus avós e demais familiares, em especial tia Cida e tia Iva, pelo incentivo, confiança e conselhos.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela excelente orientação e por ser um exemplo na minha formação, por todo aprendizado transmitido, confiança e oportunidade.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho, pela amizade, simpatia e colaboração imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos professores Francisco Diez Gonzalez e Hilário Cuquetto Mantovani, pelos ensinamentos, aconselhamentos e sugestões.

À professora Miriam Teresinha dos Santos, pela amizade, por participar da banca, pelas críticas e sugestões.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia que contribuíram para a construção do meu conhecimento.

À Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto e Dra. Rosinéia Aparecida de Paula, por participar da banca, pelas críticas e sugestões.

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED), na pessoa do pesquisador Ricardo Dias de Souza pela colaboração na realização das análises de detecção de enterotoxinas.

À Danisco, por fornecer a nisina utilizada nesta pesquisa.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial à Nilcéa e Laura, pela amizade e auxílio.

Ao funcionário Monteiro, do Departamento de Zootecnia, pela ajuda na liofilização de bovicina HC5.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Patógenos Alimentares e Anaeróbios: Adriana Ponce, Alexandra, Aline, Ana Íris, Cláudia, Danielle, Déborah, Emilene, Evandro, Fernanda Godoy, Fernanda Sant'anna, Gabriela, Gardênia, Janaína, Marcelo, Mônica, Ramila, Samira, Simone, Solimar e Wanessa pela maravilhosa convivência e pelo carinho.

À querida Adriana Leandro, pela amizade, disponibilidade em ajudar e pela descontração.

Às minhas amigas, Livia e Patrícia, que desde 2002 me acompanham nessa jornada.

Aos amigos que tanto estimo, Adriana Ponce, Alexandra, Aline e Guilherme, pelo companheirismo e ajuda durante toda a execução dos experimentos e escrita.

À Danielle, Laélia, Vanessa e Fernanda Godoy, por tantas noites de estudo e pela amizade nesses dois anos de curso.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho e para o crescimento pessoal.

BIOGRAFIA

NATAN DE JESUS PIMENTEL FILHO, filho de Natan de Jesus Pimentel e Teresinha Rizzo Pimentel, nasceu em Itabira, Minas Gerais no dia 06 de janeiro de 1983.

Em maio de 2002 iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, tornando-se bacharel em outubro de 2006.

Em março de 2008, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos e Controle de Qualidade, submetendo-se à defesa de dissertação em 23 de fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Queijo Minas frescal	3
2.2. Micro-organismos patogênicos em queijos	4
2.3. Alimentos seguros	7
2.4. Bacteriocinas	9
2.4.1. Nisina	12
2.4.2. Bovicina HC5	13
2.5. Tecnologia de barreiras	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Condições de cultivo e estocagem das bactérias	17
3.2. Indução da produção de toxinas	19
3.3. Preparo e determinação da atividade da bovicina HC5	19
3.4. Preparo e determinação da atividade da nisina	20
3.5. Determinação da atividade de bovicina HC5 e, ou nisina sobre o crescimento de <i>Listeria</i> e de <i>S. aureus in vitro</i>	20
3.6. Efeito de bovicina HC5 e, ou nisina sobre a viabilidade de <i>Listeria</i> e <i>S.</i> <i>aureus</i> em leite	21
3.7. Atividade de bovicina HC5 e nisina sobre a viabilidade de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> em queijo Minas frescal	21

3.7.1. Produção de queijo Minas frescal e inoculação com as estirpes patogênicas	21
3.7.2. Análises microbiológicas.....	22
3.8. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo Minas frescal mantidos sob temperatura abusiva de estocagem	23
3.9. Delineamento experimental.....	24
3.10. Análises estatísticas	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Efeito de bovicina HC5 e, ou nisina sobre <i>Listeria</i> e <i>S. aureus</i> em caldo TSB	25
4.2. Efeito de bovicina HC5 e, ou nisina sobre <i>Listeria</i> e <i>S. aureus</i> em leite	33
4.3. Efeito de bovicina HC5 e nisina sobre a viabilidade de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> em queijo Minas frescal	38
4.4. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo Minas frescal mantidos sob temperatura abusiva de estocagem	42
5. CONCLUSÕES.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

RESUMO

PIMENTEL FILHO, Natan de Jesus, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Atividade das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: Antônio Fernandes de Carvalho, Francisco Diez Gonzalez e Hilário Cuquetto Mantovani.

O queijo Minas frescal é um dos produtos lácteos mais consumidos no Brasil e suas características químicas tornam-o um meio apropriado para o crescimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal. O crescimento de estirpes de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *S. aureus* foi acompanhado em caldo tripticase de soja (TSB) e em leite integral comercialmente esterilizado (UAT), a 37 °C em presença de bovicina HC5 e nisina adicionadas isoladas ou combinadas. Queijo Minas frescal foi produzido e inoculado com população inicial de 10^4 UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* e *S. aureus* e adicionado de 600 UA.mL⁻¹ de bovicina HC5 e nisina. Na presença de concentrações de 10, 20 e 50 UA.mL⁻¹ de bovicina HC5 em caldo TSB houve aumento da fase lag e redução da velocidade específica de crescimento das estirpes de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *S. aureus*. O crescimento foi completamente inibido quando bovicina HC5 foi adicionada nas concentrações 100 e 150 UA.mL⁻¹ e em concentrações de nisina acima de 10 UA.mL⁻¹. *L. innocua* isolado de queijo Minas foi sensível a baixas concentrações das bacteriocinas enquanto *L. innocua* LMA83 apresentou um aumento de 10 h na

fase lag quando 10 e 20 UA.mL⁻¹ de nisina foram acrescentadas ao caldo TSB. Em concentrações de nisina e bovicina HC5 acima de 50 UA.mL⁻¹, nenhum crescimento de *L. innocua* foi observado. A presença das bacteriocinas em concentrações de até 50 UA.mL⁻¹ aumentou a fase lag mas, não impediu o crescimento de *S. aureus* enquanto as concentrações 100 ou 150 UA.mL⁻¹ de bovicina HC5 inibiram a multiplicação bacteriana. A combinação das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina em caldo TSB inibiu o crescimento de *L. monocytogenes*, *S. aureus* EMBRAPA 4018 e *L. innocua* em concentrações inferiores do que quando usadas isoladamente. Em leite UAT, concentrações de bovicina HC5 acima de 400 UA.mL⁻¹ reduziram o número de células viáveis de *L. monocytogenes* Scott A em um ciclo log. Entretanto, nisina foi bactericida apenas quando foi usada na concentração de 1200 UA.mL⁻¹, sendo o crescimento reassumido após 3 h de incubação. *L. innocua* LMA83 foi sensível a todas as concentrações de bovicina HC5 adicionadas ao leite enquanto nenhuma redução no número de células viáveis foi observada após adição de nisina. *S. aureus* ATCC 6538 cresceu em leite mesmo na presença de 400 ou 800 UA.mL⁻¹ de bovicina HC5 e efeito bacteriostático foi observado na concentração 1200 UA.mL⁻¹. A concentração 1200 UA.mL⁻¹ de nisina exerceu efeito bactericida sobre células de *S. aureus*. Em queijo Minas frescal, a adição das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina combinadas na concentração 600 UA.g⁻¹ reduziu o número de células viáveis inicial de 10⁴ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* Scott A para valores abaixo de 1 UFC.25 g⁻¹, após nove dias de estocagem a 4 °C. Efeito bactericida sobre *S. aureus* ATCC 6538 foi observado nos queijos adicionados das bacteriocinas combinadas durante 15 dias de estocagem a 4 °C. Entretanto, após esse período, a multiplicação de *S. aureus* foi retomada. A presença das bacteriocinas combinadas na concentração 600 UA.g⁻¹ não impediu a produção de enterotoxinas estafilocócica C por *S. aureus* EMBRAPA 4018 em queijos mantidos sob temperatura de 15 °C de estocagem. Estes resultados demonstraram que bovicina HC5 e nisina foram efetivas no controle dos patógenos avaliados em leite e queijo Minas frescal, em especial quando usadas associadas.

ABSTRACT

PIMENTEL FILHO, Natan de Jesus, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2010. **Activity of the bacteriocin bovicin HC5 and nisin on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Minas frescal cheese** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: Antônio Fernandes de Carvalho, Francisco Diez Gonzalez and Hilário Cuquetto Mantovani.

The Minas frescal cheese is one of the most appreciated dairy products in Brazil. Their chemical characteristics constitute a suitable medium for the growth of spoilage and pathogens microorganisms. This study aims to evaluate the effect of bovicin HC5 and nisin on the growth of both *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in the Minas frescal cheese. Growth of strains of *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *S. aureus* was carried out in tryptic soy broth (TSB) and in whole milk commercially sterilized (UHT) at 37 °C in the presence of bovicin HC5 and nisin either added individually or in combination. Minas frescal cheese was manufactured and inoculated with an initial population of 10^4 CFU.g⁻¹ of both *L. monocytogenes* and *S. aureus*, 600 AU.mL⁻¹ of both bovicin HC5 and nisin were then added. The increase in the lag phase and the reduction of the specific growth rate of the strains of *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *S. aureus* was verified at the concentrations of 10, 20 and 50 AU.mL⁻¹ of bovicin HC5 in TSB broth. Growth was completely inhibited when bovicin HC5 was added at concentrations of 100 and 150 AU.mL⁻¹ and at nisin concentrations above 10 AU.mL⁻¹. *L. innocua* isolated from Minas cheese was sensitive to low concentrations of both bacteriocins while *L. innocua* LMA83 had an increase in 10 h in the lag phase when 10 and 20

AU.mL⁻¹ of nisin were added to the TSB broth. In nisin and bovicin HC5 concentrations above 50 AU.mL⁻¹, no growth of such strains was observed. The presence of the bacteriocins at concentrations up to 50 AU.mL⁻¹ increased the lag phase but did not prevent the growth of *S. aureus*. On the other hand, concentrations of 100 or 150 AU.mL⁻¹ of bovicin HC5 inhibited the bacterial multiplication. The combination of the two bacteriocins bovicin HC5 and nisin in TSB broth inhibited the growth of *L. monocytogenes*, *S. aureus* EMBRAPA 4018 and *L. innocua* at lower concentrations. However when used separately, higher concentrations of each bacteriocin should be applied. In milk, concentrations of bovicin HC5 above 400 AU.mL⁻¹ reduced the number of viable cells of *L. monocytogenes* Scott A in one log cycle. However, nisin was bactericidal just when used at 1200 AU.mL⁻¹, being the growth resumed after 3 h of incubation. *L. innocua* LMA83 was sensitive to all bovicin HC5 concentrations added to milk while no reduction in the number of viable cells was observed after adding nisin. *S. aureus* ATCC 6538 in milk would still grow in the presence of 400 or 800 AU.mL⁻¹ of bovicin HC5, being the bacteriostatic effect observed at the concentration 1200 AU.mL⁻¹. Bactericidal effect on *S. aureus* cells was showed by nisin at 1200 AU.mL⁻¹. In Minas frescal cheese, the number of initial viable cells was reduced from 10⁴ CFU.g⁻¹ of *L. monocytogenes* Scott A to values below 1 CFU.25 g⁻¹ by additions of the bacteriocins combined at the concentration of 600 AU.mL⁻¹ after nine days of storage at 4 °C. After adding the combined bacteriocins in cheese for 15 days of storage at 4 °C, bactericidal effect on *S. aureus* ATCC 6538 was observed. However, growth was resumed after that period. The presence of the combined bacteriocins at 600 AU.mL⁻¹ did not prevent the production of staphylococcal enterotoxin C by *S. aureus* EMBRAPA 4018 in cheeses stored under 15 °C. The present results demonstrate that bovicin HC5 and nisin are indeed effective in the control of pathogens assessed in milk and Minas frescal cheese, especially when associated.

1. INTRODUÇÃO

Queijo Minas frescal é um dos produtos lácteos mais apreciados no Brasil. É um queijo branco e macio produzido a partir de leite de vaca pela coagulação enzimática do leite pasteurizado, apresenta valores de pH entre 6,3 e 6,5, umidade superior a 55 % e baixa concentração de sal. Em função de suas características químicas, esse queijo constitui meio apropriado para o crescimento de diversos patógenos sendo que o consumo desse produto contaminado tem, frequentemente, sido associado a diversos casos e surtos de doenças de origem alimentar. A contaminação de queijos com *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* é associada à pasteurização inadequada e, ou contaminação pós-pasteurização. Embora a pasteurização do leite seja suficiente para inativar micro-organismos patogênicos, enterotoxinas estafilocócicas, estáveis ao calor, podem tornar o produto de alto risco à saúde do consumidor. O uso de leite de boa qualidade e as boas práticas de fabricação devem ser associadas para minimizar os riscos de contaminações.

O uso empírico de micro-organismos e de seus produtos para preservação de alimentos é prática comum na história da humanidade. Ácido láctico e outros produtos do metabolismo de bactérias lácticas, incluindo peróxido de hidrogênio, diacetil, acetoína, reuterina, reuter ciclina, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas agem como biopreservativos pela alteração das propriedades intrínsecas dos alimentos e inibem micro-organismos deterioradores. As bacteriocinas compreendem um amplo e diverso grupo de peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente que apresentam efeito bactericida e, ou bacteriostático.

No Brasil, apenas a bacteriocina nisina pode ser utilizada em queijos como conservante e, embora o efeito da nisina sobre diversos patógenos esteja comprovado, o aumento da tolerância ou resistência a essa bacteriocina tem sido relatado.

Bovicina HC5 é uma bacteriocina produzida por *Streptococcus bovis* HC5, estável ao calor e a baixos valores de pH que vem sendo estudada na inibição de bactérias deterioradoras e patogênicas de origem alimentar, e demonstrou possuir potencial inibidor igual ou maior do que o da nisina. A capacidade de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* e de algumas outras bactérias gram-positivas já está comprovada.

Bacteriocinas têm aplicação na tecnologia de barreiras, podendo ser utilizadas combinadas a outros tratamentos na preservação dos alimentos. Diversas bacteriocinas já foram avaliadas e apresentaram ação conservante combinadas com nisina, com aumento do efeito antibacteriano da associação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade de bovicina HC5 e, ou nisina sobre *Listeria* e *S. aureus in vitro*, em leite e em queijo Minas frescal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Queijo Minas frescal

Em 2008, a produção brasileira de queijos foi de 640 mil toneladas (USDA, 2009). Nos últimos sete anos, o consumo de queijos no Brasil aumentou 161 mil toneladas, sendo o total consumido em 2008, 627 mil toneladas (Figura 1) e um aumento de 4,3 % no consumo era esperado para 2009. O queijo Minas frescal é um dos produtos lácteos mais apreciados no Brasil e, devido ao bom rendimento durante a fabricação, é comercializado a preços mais acessíveis a uma ampla faixa da população.

O queijo tipo Minas frescal é obtido a partir de leite de vaca por coagulação enzimática do leite integral ou semidesnatado pasteurizado, com coalho e, ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997). É um queijo branco macio classificado como semigordo com pH variando entre 6,3 e 6,5, muita alta umidade, com valores acima de 55 %, baixa concentração de sal, que varia de 1,4 a 1,6 % (BRASIL, 1997) para ser consumido fresco pois, não requer maturação.

Esses queijos são produzidos industrialmente por três diferentes processos: adição de culturas lácticas para produção de ácido láctico, que inibe o crescimento de micro-organismos indesejáveis, melhora a atividade coagulante e facilita a remoção do soro (FOX, 2000); acidificação direta pela adição de ácido láctico, que aumenta o rendimento dos queijos e reduz as alterações físico-químicas durante a vida de prateleira e pelo processo de ultra-filtração

utilizando o método MMV desenvolvido por Maubois, Mocquot e Vassal (MAUBOIS e MOCQUOT, 1975) que melhora as condições higiênicas do produto pelo fato de o processamento ocorrer em circuito fechado.

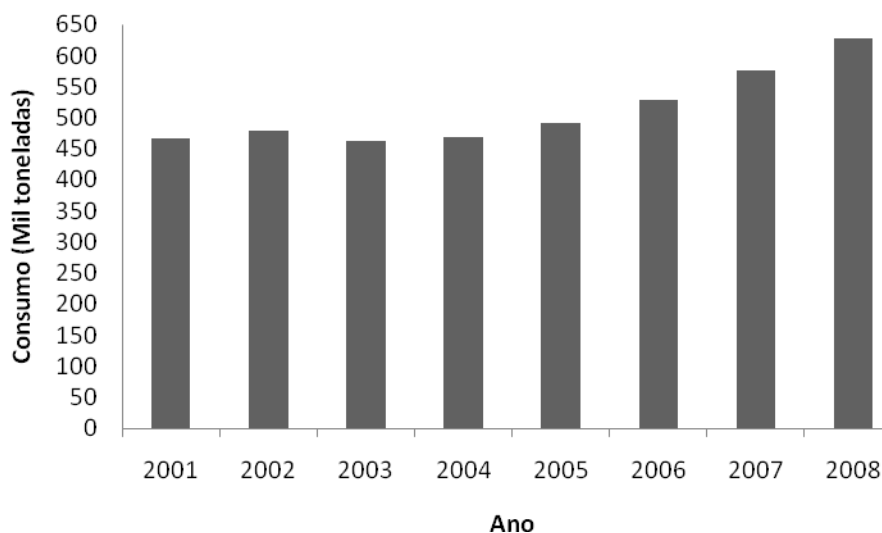


Figura 1. Consumo de queijo no Brasil de 2001 a 2008. Adaptado USDA (2009).

Por adotar tecnologia simples em sua fabricação, o queijo Minas é comumente produzido e vendido em potes plásticos, sacos plásticos e em peças (SOUZA et al., 2008a). Os queijos frescos que são submetidos ao mínimo processamento antes de serem embalados são altamente perecíveis e apresentam prazo de validade curto, mesmo sob refrigeração (SILVA et al., 2003). Esses queijos constituem meios apropriados para a multiplicação de muitos patógenos e têm sido frequentemente, associados com diversas doenças de origem alimentar em muitos países.

2.2. Micro-organismos patogênicos em queijos

Em razão de características específicas, os queijos frescos, como o queijo Minas frescal, constituem em excelente substrato para multiplicação de micro-organismos ou para a manutenção da sua viabilidade por longos períodos, o que aumenta o risco potencial da ocorrência de patógenos (CARVALHO et al., 2007a; NALDINI, 2009). As contaminações por micro-organismos podem ocorrer a partir do leite usado como matéria-prima, ou por

meio de contaminações cruzadas durante ou após o processamento. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* são considerados os principais perigos que ameaçam a segurança alimentar de queijos (DE BUYSER et al., 2001). Essas contaminações, aliadas às alterações decorrentes da atividade microbiana podem tornar o queijo inaceitável ou até mesmo impróprio para o consumo em poucos dias (ROCHA et al., 2006).

Surtos de listerioses resultantes do consumo de produtos lácteos contaminados com *L. monocytogenes* aumentaram o interesse pelo estudo do comportamento desse patógeno durante o processamento e subsequente armazenamento de vários produtos lácteos (SILVA et al., 2003). Embora *Listeria* seja inativada sob condições normais de pasteurização, a presença do patógeno no produto final pode decorrer em função de contaminação pós-pasteurização. *L. monocytogenes* causa doenças em grupos de risco, incluindo mulheres grávidas, recém-nascidos e adultos imuno-comprometidos e resulta em alta taxa de mortalidade nesse grupo (ARQUÉS et al., 2008).

L. monocytogenes presente no leite cru pode, potencialmente, ser introduzido no ambiente de indústrias de processamento de queijos. Em estudos conduzidos em duas unidades de fabricação de queijo Minas frescal no Estado da Bahia, Silva et al. (2003) isolaram *L. monocytogenes* de leite cru de uma das indústrias e do piso da câmara de refrigeração dos queijos. O patógeno não foi isolado de amostras similares coletadas na outra indústria. Mena et al. (2004) constataram *L. monocytogenes* em 50 % das amostras de queijo fresco e Vitas et al. (2004) detectaram *L. monocytogenes* e *L. innocua* em 1,0 % e 6,1 %, respectivamente, das 99 amostras de queijos macios. Kabuki et al. (2004) avaliaram ambientes e amostras de queijos frescos de três diferentes indústrias em Nova York e recuperaram *L. monocytogenes* em 27 (11 %) das 246 amostras de ambientes e de 6,3 % das 111 amostras de queijo fresco.

Em queijo Minas frescal produzido com leite pasteurizado adicionado de ácido láctico, Carvalho et al. (2007a) detectaram *L. monocytogenes* em 9,7 % e *L. innocua* em 12,9 % das 31 amostras analisadas. Embora *L. innocua* não seja patogênica para humanos, o seu crescimento em amostras de queijos indica a possibilidade de crescimento de *L. monocytogenes*. Brito et al. (2008) pesquisaram 37 estabelecimentos varejistas na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais e constataram que todas as 50 amostras de leite pasteurizado e de

queijo Minas frescal de nove das 10 marcas analisadas foram negativas após testes de enriquecimento seletivo para *L. monocytogenes*. Entretanto, 60% das 10 amostras de uma mesma marca apresentaram resultados positivos para a presença do patógeno.

Staphylococcus spp. são micro-organismos comumente contaminantes de leite e derivados e estão muitas vezes associados a surtos de doenças de origem alimentar. *S. aureus* é o principal agente causador da mastite bovina, capaz de produzir enterotoxinas responsáveis por uma das causas predominantes de gastroenterites (ARQUÉS et al., 2008). As enterotoxinas pertencem ao grupo das exotoxinas e são proteínas de baixo peso molecular, de 24 a 30 kDa, sintetizadas por algumas espécies de *Staphylococcus*, em especial *S. aureus* (DIAS et al., 2008).

Considerando o rápido surgimento da síndrome, entre 30 min e 6 h após a ingestão do alimento contendo a toxina pré-formada e o rápido retorno ao estado normal de saúde, na maioria dos indivíduos, é especulado que a grande parte dos casos não seja reportada (PINTO et al., 2005; DIAS et al., 2008).

Em diversas pesquisas têm sido isolado *Staphylococcus* coagulase-negativo produtores de enterotoxinas (ROZAND et al., 1996; BLAIOTTA et al., 2004; VERAS et al., 2008), entretanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA, reconhece apenas estafilococos coagulase-positivo como indicador de higiene e qualidade de alimentos (BRASIL, 2001).

Staphylococcus produtores de enterotoxina A (SEA) e D (SED) são as bactérias mais frequentemente associadas a intoxicações alimentares (PORTOCARRERO, 2002) possivelmente por produzirem enterotoxinas em uma ampla faixa de condições de crescimento, como atividade de água, pH e potencial de oxirredução. De acordo com Tranter (1996), 1 µg de toxina é suficiente para induzir sintomas quando a população do micro-organismo atinge 10^5 UFC.g⁻¹. Essas substâncias são termoestáveis e mantêm a atividade mesmo após tratamentos térmicos empregados pelas indústrias de alimentos. Assim, representam um risco para consumidores e torna-se necessário o controle desses micro-organismos durante todas as etapas da cadeia de produção de alimentos.

Altas porcentagens de contaminação de queijo Minas frescal com *S. aureus* têm sido relatadas na literatura. Almeida Filho e Nader Filho (2000) obtiveram contagem de *S. aureus* acima de 10^3 UFC.g⁻¹ em 50 % de 80

amostras de queijo Minas frescal e Peresi et al. (2001) detectaram contagem de estafilococos coagulase-positivos acima do limite máximo aceitável (BRASIL, 2001) em 60 % das 30 amostras do mesmo produto. Estudos realizados por Carvalho et al. (2007a) detectaram estirpes de *S. aureus* coagulase-positivo acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (10^3 UFC.g⁻¹) (BRASIL, 2001) em 12,9 % das 31 amostras de queijo Minas frescal produzidos com adição de culturas lácticas. André et al. (2008) constatarem *S. aureus* em 17 das 24 amostras de queijo Minas frescal analisadas e em 54,2 % das 17 amostras contaminadas, a contagem de *S. aureus* estava acima do limite estabelecido pela legislação brasileira.

Entre fevereiro e maio de 1999 a Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais notificou dois surtos de intoxicação alimentar que envolveram 378 indivíduos. No primeiro surto, 50 indivíduos adoeceram após consumirem queijo Minas e os sintomas de intoxicação como diarreia, vômito, vertigem, calafrios e dores de cabeça ocorreram cerca de 2 h após a ingestão. O segundo surto afetou 328 indivíduos que apresentaram sintomas como diarreia e vômito após consumirem leite cru. Amostras desses alimentos foram coletadas e as análises dos queijos apresentaram contagem de *S. aureus* entre $1,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ a valores superiores a $2,0 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ e presença de enterotoxinas dos tipos A, B e C. O leite analisado apresentou contagem de $2,4 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ e toxinas dos tipos A e B (CARMO et al., 2002). Dias et al. (2008) investigaram 139 surtos de doenças de origem alimentar ocorridos em 73 municípios mineiros, de janeiro de 2006 a julho de 2008, sendo que em todos os surtos confirmados, os sinais, os sintomas e o período de incubação eram característicos de intoxicação estafilocócica.

2.3. Alimentos seguros

A consciência sobre os benefícios e riscos à saúde associados ao consumo de alimentos tem aumentando entre os consumidores. A produção de alimentos seguros inclui a inspeção das matérias-primas que entram na cadeia alimentar, a adoção de medidas que impeçam o crescimento microbiano, reduzam ou eliminem a população de micro-organismos contaminantes e previnam a contaminação pós-processamento.

Pasteurização e esterilização são procedimentos predominantemente empregados na indústria de alimentos em razão da eficácia na segurança alimentar. Entretanto, o tratamento térmico excessivo pode resultar em desnaturação protéica indesejável, escurecimento não enzimático e perda de vitaminas e compostos aromáticos voláteis (LADO e YOUSEF, 2002). Processamento que empregam altas pressões, radiação ionizante, campo elétrico pulsado e radiação ultravioleta são tecnologias de conservação emergentes empregadas na produção de alimentos seguros, por manterem as qualidades sensoriais e nutricionais. Outras tecnologias continuam a ser avaliadas quanto ao potencial de aplicação na conservação de alimentos.

O uso empírico de micro-organismos e, ou seus produtos naturais para a preservação de alimentos é prática comum na história da humanidade (ROSS et al., 2002). Peptídeos, com propriedades antimicrobianas, sintetizados ribossomicamente são produzidos por muitos organismos vivos procariotos e eucariotos superiores (PAPAGIANNI, 2003). Bactérias do ácido láctico, que incluem os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus* e *Weissella* (STILES e HOLZAPFEL, 1997) têm função essencial nas fermentações para produção de alimentos, sendo rotineiramente empregadas como culturas iniciadoras ou *starter* no processamento de produtos lácteos, carnes e vegetais. Entretanto, a contribuição mais importante desses micro-organismos para o produto é preservar as qualidades nutritivas da matéria-prima, estender a vida de prateleira e inibir bactérias deterioradoras e patogênicas (O' SULLIVAN et al., 2002). Ácido láctico e outros produtos do metabolismo das bactérias lácticas, incluindo peróxido de hidrogênio, diacetil, acetoína, reuterina, reuteriцина, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas agem como bioconservantes pela alteração das propriedades intrínsecas dos alimentos e inibem micro-organismos patogênicos e deterioradores (MAGNUSSON e SCHNÜRER, 2001; DEEGAN et al., 2006).

As bacteriocinas são amplamente estudadas enquanto potenciais e valiosas alternativas biológicas para melhorar a segurança alimentar (MADUREIRA, 2008).

2.4. Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas com atividade antimicrobiana, produzido por diferentes grupos de bactérias. Elas diferem dos antibióticos em, pelo menos, dois aspectos: são ribossomicamente sintetizadas, enquanto os antibióticos são em geral metabólitos secundários (RODRIGUEZ et al., 2002) e têm espectro de inibição relativamente limitado, pois são letais apenas para bactérias relacionadas às estirpes produtoras (RILEY e WERTZ, 2002a). Bacteriocinas de bactérias gram-positivas são especialmente ativas contra bactérias gram-positivas, como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e células vegetativas e esporos de *Clostridium botulinum* (O' SULLIVAN et al., 2002; DEEGAN et al., 2006; GARCÍA-ALMENDÁREZ et al., 2008). A produção de bacteriocinas pode ser considerada vantajosa, pois podem inativar ou inibir bactérias que competem pelo mesmo nicho ecológico ou pela mesma fonte de nutrientes (DEEGAN et al., 2006).

As bacteriocinas incluem uma diversidade de proteínas em termos de tamanho, alvo, modo de ação e mecanismo de imunidade.

Bacteriocinas de bactérias gram-positivas são tão abundantes e até mesmo mais diversas do que aquelas encontradas em bactérias gram-negativas. De acordo com Riley e Wertz (2002b), essas substâncias diferem daquelas produzidas por bactérias gram-negativas, principalmente, em função da produção da bacteriocina não resultar necessariamente na morte da bactéria produtora como ocorre com as gram-negativas. Por exemplo, a colicina produzida por *E. coli* é letal para a célula produtora e para qualquer célula vizinha reconhecida pela bacteriocina. Essa diferença crítica está associada ao mecanismo de transporte para liberação das bacteriocinas codificado pelas bactérias gram-positivas. Em adição, as bactérias gram-positivas apresentam um sistema específico para regulação da síntese de bacteriocinas enquanto bacteriocinas de bactérias gram-negativas dependem, exclusivamente, do sistema regulatório do hospedeiro, sendo expressas por exemplo, sob condições de estresse da célula (RILEY e WERTZ, 2002b).

A classificação proposta por Cotter et al. (2005) divide as bacteriocinas em duas categorias distintas. A classe I inclui os peptídeos que contêm anéis de lantionina em sua estrutura ou lantibióticos, resultantes da associação de duas moléculas de alanina ligadas por uma ponte dissulfeto, ou β -

metilantionina, sendo a nisina o principal representante dessa classe. A classe II abrange as bacteriocinas que não passam por modificação pós-traducional. Peptídeos de alto peso molecular termolábeis, designados bacteriolisinas, são agrupadas separadamente na classe III devido ao mecanismo de ação distinto que envolve a hidrólise da parede celular bacteriana.

As bacteriocinas podem exercer efeito antimicrobiano por mecanismos diferentes, sendo o envelope celular geralmente o ponto alvo (DEEGAN et al., 2006). Os lantibióticos, a exemplo da nisina possuem duplo mecanismo de ação (Figura 2), pois interferem na síntese da parede celular e permeabilizam a membrana de células sensíveis por meio da formação de poros que resulta em efluxo de íons, dissipação da força protomotiva, hidrólise de ATP e eventual perda de viabilidade e lise celular (BRUNO e MONTVILLE, 1994; ENNAHAR et al., 2000; COTTER et al., 2005). Bacteriocinas da classe II, como por exemplo, pediocina, inserem-se na membrana celular do micro-organismo pela porção C-terminal e promovem a formação de poros e consequente dissipação do potencial de membrana (Figura 2) (KAISER e MONTVILLE, 1996; COTTER et al., 2005). Essas atividades antimicrobianas das bacteriocinas podem oferecer diversos benefícios para a preservação de alimentos (THOMAS et al., 2000) como a extensão da vida de prateleira, fornecimento de proteção extra durante condições de abuso de temperatura, controle de patógenos de origem alimentar, redução das perdas econômicas associadas à deterioração dos alimentos, redução da aplicação de conservantes químicos, além de permitir a aplicação de tratamentos térmicos menos drásticos sem que haja o comprometimento da segurança alimentar.

O mecanismo de imunidade das bactérias produtoras de bacteriocinas é capaz de proteger a célula contra a sua própria bacteriocina. Dois sistemas de imunidade aos lantibióticos já foram identificados. No primeiro deles, a proteção é dependente de uma proteína de imunidade específica, LanI, e o segundo consiste especialmente em proteínas do transportador ABC (LanFEG) (DEEGAN et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2008). As proteínas LanI antagonizam a ação dos lantibióticos, impedindo a inserção da bacteriocina na membrana celular, enquanto o transportador ABC age expelindo o peptídeo antimicrobiano da célula ou da membrana (STEIN et al., 2005).

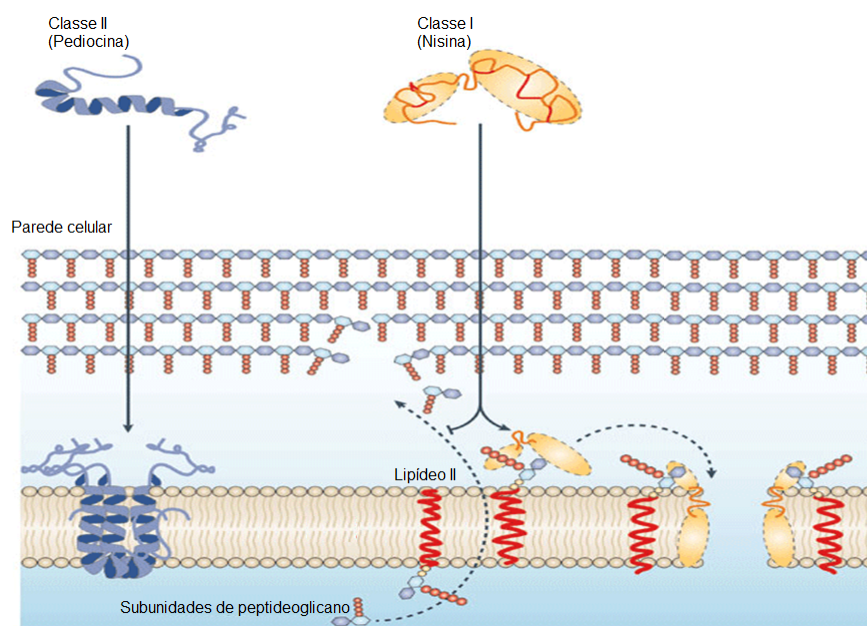


Figura 2. Mecanismo de ação de bacteriocinas das classes I e II (COTTER et al., 2005).

As únicas bacteriocinas disponíveis no comércio são nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, e pediocina PA-1, produzida por *Pediococcus acidilactici*, comercializadas como Nisaplin® (descrição do produto-PD45003-7EN; Danisco, Copenhagen, Dinamarca) e ALTA™ 2431 (Kerry Bioscience, Carrigaline, Cork, Irlanda), respectivamente (Deegan et al., 2006). Existem também várias outras bacteriocinas prontas para serem comercializadas relatadas na literatura científica, como a lacticina 3147 e lacticina 481, que apresentam potencial para exploração como bioconservante natural de alimentos.

A eficácia das bacteriocinas como conservantes de alimentos depende de uma série de fatores que, na maioria dos casos, envolvem interação com os componentes do alimento, precipitação, inativação ou distribuição irregular das moléculas de bacteriocina na matriz alimentar (GÁLVEZ et al., 2007).

Os estudos das bacteriocinas conhecidas e a descoberta de novas bacteriocinas combinadas com o desenvolvimento de tecnologias alternativas aumentou a possibilidade de uso desses peptídeos e otimizado o potencial da aplicação em alimentos (DEEGAN et al., 2006).

2.4.1. Nisina

Nisina é produzida por estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* isoladas de leite e produtos vegetais que apresentam amplo espectro de ação sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, além da germinação de esporos de *Bacillus* e *Clostridium*. É usada também como bioconservante e um agente potencial em produtos veterinários e farmacêuticos (ARAUZ et al., 2009). É a bacteriocina mais estudada e empregada na preservação de alimentos, reconhecida pela *Food and Drug Administration* (FDA) desde 1989 como substância *Generally Recognized as Safe* (GRAS) para uso em alimentos sendo aceita em mais de 45 países. No Brasil, em 1996, o uso da nisina foi autorizado em queijos como conservante na concentração de até 12,5 mg.kg⁻¹ (BRASIL, 1996). Nisina é efetiva no controle do crescimento microbiano em diversos produtos lácteos.

Devido à natureza ácida da molécula, nisina é completamente estável em soluções de pH 2,0, portanto pode ser estocada durante período prolongado a temperaturas de 2 °C a 7 °C (NASCIMENTO et al., 2008a).

Estudos demonstraram a eficácia da nisina sobre *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *Clostridium sporogenes* (ROBERTS e ZOTTOLA, 1993; PLOCKOVA et al. 1996). Na análise da vida de prateleira de queijo tipo ricota foi demonstrado que 2,5 mg.L⁻¹ de nisina inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* por mais de oito semanas, enquanto queijos produzidos sem nisina apresentaram contagem da bactéria considerada indesejável no período de uma a duas semanas (DAVIES et al., 1997).

Rodríguez et al. (2000) demonstraram a proteção fornecida por uma cultura *starter* produtora de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* em leite e coalhada.

O efeito inibitório de 10,0 e 16,7 mg.kg⁻¹ de nisina sobre a população de *S. aureus*, coliformes totais, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* foi avaliado em queijo branco tipo Telita fabricado na Venezuela (MÁRQUEZ e ROJAS, 2007). As contagens de *S. aureus* foram significativamente menores (p<0,05) nas amostras de queijo contendo as diferentes concentrações da bacteriocina do que nas amostras controle, ou seja, sem a adição de nisina, entretanto, não foi constatada variação nas contagens de coliformes totais e de *E. coli*. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e de *L. monocytogenes* (MÁRQUEZ e ROJAS, 2007).

A adição de nisina em pó em leite para a produção de queijos sem a utilização de cultura *starter* pode controlar o crescimento microbiano, sendo que a concentração da bacteriocina permaneceu inalterada após a pasteurização (SOBRINO-LÓPEZ e MARTÍN-BELLOSO, 2008).

Nascimento et al. (2008b) estudaram o espectro de ação da nisina sobre diferentes estirpes de *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Os autores verificaram que a bacteriocina inibiu 100 % da população de *L. monocytogenes* nas concentrações de 200 a 400 UA.mL⁻¹ e de *S. aureus* nas concentrações de 150 a 200 UA.mL⁻¹, contudo, apenas 10 (40 %) das estirpes de *B. cereus* apresentaram sensibilidade nas concentrações variando de 100 a 200 UA.mL⁻¹. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que a atividade da bacteriocina em leite foi 50 % menor que a observada em caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe).

Entretanto, o reconhecimento da possibilidade da aquisição de resistência à nisina em concentrações subinibitórias dentre os patógenos de origem alimentar sensíveis como *L. monocytogenes* compromete a eficácia da bacteriocina na conservação do alimento (ARQUÉS et al., 2008). A resistência de mutantes espontâneos às bacteriocinas pode estar relacionada a mudanças ocorridas na membrana e na parede celular, como alteração do potencial elétrico, da fluidez, da composição lipídica da membrana e alteração da carga ou espessura da parede celular (MANTOVANI e RUSSEL, 2001). Bactérias gram-negativas, normalmente, são resistentes à nisina em função da composição lipopolissacarídica de sua membrana externa que atua como barreira à ação de nisina na membrana citoplasmática (ARAUZ et al. 2009).

2.4.2. Bovicina HC5

Bovicina HC5 é uma bacteriocina com amplo espectro de ação produzida pelo *Streptococcus bovis* HC5 isolado do rúmen de bovinos cujas propriedades de estabilidade ao calor (121 °C por 20 min), à presença de oxigênio e a baixos valores de pH demonstram o potencial de seu uso em alimentos para prevenir a germinação de esporos e controlar o crescimento de patógenos (HOULIHAN et al., 2004; CARVALHO, 2006; SOUZA, 2008b). Essa bacteriocina, classificada como um lantibiótico (MANTOVANI et al., 2002; MANTOVANI e RUSSEL, 2008; XAVIER e RUSSELL, 2009), age sobre a

membrana plasmática das bactérias sensíveis com consequente formação de poros os quais levam à perda de potássio intracelular.

Bovicina HC5 apresenta características muito úteis uma vez que bactérias que podem tornar-se facilmente resistentes à nisina não tornaram-se significativamente mais resistentes a bovicina HC5, mesmo após serem repetidamente transferidas para doses subletais dessa bacteriocina (MANTOVANI e RUSSELL, 2003).

Bovicina HC5 pode inibir várias bactérias como *Clostridium aminophilum* (MANTOVANI e RUSSELL, 2002), *Clostridium sporogenes* (FLYTHER e RUSSELL, 2004), *Clostridium tyrobutyricum*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, dentre outros. Mantovani e Russell (2003) demonstraram o efeito da bovicina HC5 sobre *L. monocytogenes*, com redução de 5 a 7 ciclos log no número de células viáveis, após 2 h de exposição à bacteriocina.

Carvalho (2006) verificou que a adição de 40 a 160 UA.mL⁻¹ de bovicina HC5 em caldo infuso de cérebro e coração (BHI) reduziu a velocidade específica de crescimento e a densidade óptica (DO) máxima atingida por *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *C. tyrobutyricum*. Esse mesmo estudo apontou que a concentração de 100 UA.mL⁻¹ de bovicina HC5 foi bactericida para células vegetativas inoculadas em polpa de manga sendo esse efeito mais pronunciado em condições acídicas.

Bovicina HC5 apresentou atividade bactericida sobre células vegetativas de *A. acidoterrestris* em diferentes valores de pH e atividade esporicida sobre esporos desta bactéria inoculados em polpa de manga e tampão fosfato (CARVALHO et al., 2007b; CARVALHO et al., 2008; SOUZA, 2008b). Os valores do tempo de redução decimal (D) diminuíram de 77 a 95 % quando os esporos de *A. acidoterrestris* foram tratados termicamente na presença de bovicina HC5 comparados aos controles em temperaturas entre 80 e 95 °C (CARVALHO et al., 2008).

De acordo com Mantovani e Russell (2003), a bovicina HC5 pode ser mais potente e útil que a nisina. Cabe ressaltar que estudos para verificar efetividade de bovicina HC5 em leite e derivados ainda não foram realizados.

2.5. Tecnologia de barreiras

A segurança, a estabilidade microbiológica e a qualidade sensorial e nutricional de muitos alimentos é fundamentada na aplicação de fatores preservativos subletais combinados, denominado barreiras. Tecnologia de barreiras é utilizada em países industrializados bem como naqueles países em desenvolvimento, para uma conservação efetiva de alimentos (LEISTNER, 2000; BEALES, 2004).

Embora na produção de queijos bacteriocinas sejam utilizadas há anos, a combinação de bacteriocinas com calor e tratamentos não térmicos, como altas pressões, campo elétrico pulsado e outros antimicrobianos, abrem possibilidades inovadoras para aplicação em outros produtos lácteos utilizando-se a tecnologia das barreiras.

Combinando-se nisina com outros componentes antimicrobianos, como monolaurina, sistema de lactoperoxidase ou outras bacteriocinas, pode-se induzir a sensibilidade em micro-organismos resistentes (SOBRINO-LÓPEZ e MARTÍN-BELLOSO, 2008).

Lisozima, que pode ser adicionada em queijos para evitar defeitos causado por *Clostridium* spp., inibiu diferentes espécies de lactobacilos quando misturada à nisina, enquanto a mistura não apresentou nenhuma influência sobre *Lactococcus* produtor de nisina utilizado como cultura *starter* (KOZÁKOVÁ et al., 2005). De acordo com estudos realizados por Arqués et al. (2008), a combinação de reuterina e de nisina teve efeito sinérgico sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus* em leite.

Tratamentos com uma combinação de bacteriocinas, por exemplo, nisina e bacteriocinas da classe II, reduziram teoricamente, a incidência de bactérias resistentes (BOUTTEFROY e MILLIÈRE, 2000). O uso de duas ou mais bacteriocinas seria útil, não apenas para reduzir as doses de bacteriocinas adicionadas, mas também para evitar a sobrevivência de células adaptadas ou resistentes à bacteriocina (GÁLVEZ et al., 2007).

Assim, em razão dos riscos de contaminação de queijos frescos com *L. monocytogenes* e *S. aureus*, a existência de surtos de listerioses e gastroenterites causadas pela presença de enterotoxinas estafilocócicas, a busca de tecnologias alternativas de conservação para alimentos e a importância de se ampliar os estudos da efetividade da bovicina HC5 em

alimentos, justifica-se a pesquisa com a utilização de bovicina HC5 adicionada individualmente ou associada à nisina, visando ampliar o controle de patógenos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Patógenos Alimentares do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, na usina piloto do Laticínios da Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE) e no Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), em Belo Horizonte.

3.1. Condições de cultivo e estocagem das bactérias

A relação das bactérias utilizadas neste estudo e a origem encontra-se na Tabela 1.

Streptococcus bovis HC5 foi cultivado em condições de anaerobiose a 39 °C em meio basal, conforme descrito por Mantovani e Russell (2001).

O micro-organismo indicador *Lactococcus lactis* ATCC 19435 foi cultivado a 37 °C em meio MRS (DE MAN et al., 1960).

Listeria monocytogenes ATCC 7644, *L. monocytogenes* Scott A, *L. innocua* LMA83, isolado de indústria de laticínios, *L. innocua* isolado de queijo Minas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* EMBRAPA 4018 foram cultivados em caldo tripticase de soja – TSB (Merck, Alemanha) e incubados em B.O.D. (Modelo 347 CD, Fanem, São Paulo) a 37 °C.

Os estoques das bactérias usadas foram feitos a partir de culturas em caldo infuso de cérebro e coração - BHI (Difco[®], EUA) estriadas em ágar padrão para contagem - PCA (Oxoid, Inglaterra) e em meio seletivo de acordo com o micro-organismo em questão. Colônias isoladas foram submetidas à confirmação da identidade por meio de testes bioquímicos e morfo-tinturiais. As culturas de *Listeria* sp. foram submetidas aos testes de motilidade típica em ágar SIM (BBL[®], EUA), catalase, coloração de Gram, teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer (VM-VP), fermentação dos carboidratos manitol, xilose e ramnose, produção de β -hemólise e teste CAMP de acordo com metodologia descrita em BRASIL (2003). As estirpes de *S. aureus* foram submetidas aos testes de catalase e coloração de Gram. As colônias foram confirmadas pelos testes do kit STAPHCLIN[®] (Laborclin) (BAKER, 1985) e as provas bioquímicas foram realizadas pela FUNED. As culturas purificadas foram mantidas congeladas a -20 °C em meio de crescimento com 20 % de glicerol. Desses estoques foram retiradas alíquotas utilizadas em todas as etapas do experimento.

Tabela 1. Relação e origem das bactérias utilizadas neste estudo

Bactérias	Isolado de	Origem
<i>S. bovis</i> HC5	Rúmen bovino	James B. Russell
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	-	ATCC*
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	-	-
<i>L. innocua</i> LMA83	Indústria de laticínios	LMA**
<i>L. innocua</i>	Queijo Minas	LMA**
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	ATCC*
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	-	ATCC*
<i>S. aureus</i> EMBRAPA 4018	Mastite bovina	EMBRAPA***
<i>L. lactis</i> ATCC 19435	-	ATCC*

*ATCC = American Type Culture Collection

**LMA = Laboratório de Microbiologia de Alimentos/ Departamento de Microbiologia - UFV

***EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

3.2. Indução da produção de toxinas

As toxinas utilizadas como padrão neste estudo, bem como os antissoros específicos, foram cedidos pelo pesquisador Ricardo Souza Dias, responsável pelo Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da FUNED.

Após a confirmação da identidade das culturas de *S. aureus* pelas provas bioquímicas, as mesmas foram transferidas para tubo contendo 5 mL de caldo BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. As análises de enterotoxinas estafilocócicas (SE) foram feitas no Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da FUNED de acordo com metodologia descrita por Robbins et al. (1974).

3.3. Preparo e determinação da atividade da bovicina HC5

O preparo do extrato de bovicina HC5 foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mantovani (2002) e Carvalho (2006). Culturas de *S. bovis* HC5 foram cultivadas em meio basal até a fase estacionária e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 N. Em seguida, a cultura foi aquecida a 70 °C por 30 min e as células foram coletadas por centrifugação a 1700 g por 15 min a 5 °C (Sorvall® RT 6000 D, GMI, Minnesota, EUA). Após o descarte do sobrenadante, o material foi lavado com 50 mL de tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 6,7). As células foram ressuspensas no mesmo volume de cloreto de sódio (100 mM) com pH ajustado para 2,0 utilizando-se HCl 1 N. Em seguida, a suspensão de células foi incubada por 2 h a temperatura ambiente em agitador magnético. A suspensão de células foi então centrifugada a 1700 g por 15 min a 5 °C) e o sobrenadante liofilizado foi ressuspensão em 10 mL de tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 2,0) e estocado em geladeira até o momento do uso.

A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada pelo método de difusão em ágar detalhado por Tagg et al. (1976) e quantificada pelo método de diluição crítica descrito por Hoover e Harlander (1993). Alíquotas de 25 µL de diluições seriadas do extrato em tampão fosfato de sódio com pH 2,0 foram aplicadas em orifícios com 5 mm de diâmetro em ágar contendo 10⁵ UFC.mL⁻¹ do micro-organismo indicador *L. lactis* ATCC 19435. Após incubação a 37 °C

por 24 h o diâmetro do halo de inibição foi medido. A atividade foi expressa em unidades arbitrárias (UA.mL⁻¹) e calculada como o recíproco da maior diluição que ainda apresentou inibição visível de, pelo menos, 5 mm de diâmetro de halo, descontando-se o diâmetro do orifício. A solução de tampão fosfato de sódio foi usada como controle.

3.4. Preparo e determinação da atividade da nisina

A solução de nisina (Nisaplin[®], Danisco) foi preparada diluindo-se 10 g de nisina em 25 mL de tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 2,0). A atividade da bacteriocina foi determinada pela metodologia descrita anteriormente para bovicina HC5 utilizando-se *L. lactis* ATCC 19435 como micro-organismo indicador.

3.5. Determinação da atividade de bovicina HC5 e, ou nisina sobre o crescimento de *Listeria* e de *S. aureus* *in vitro*

Para determinar a concentração de bovicina HC5 e, ou nisina que inibiam *Listeria* e *S. aureus* foram realizados estudos *in vitro* em microplacas em quadruplicatas. As culturas de *Listeria* e de *S. aureus* foram ativadas em 5 mL de caldo TSB e incubadas a 37 °C por 18 h. As células foram coletadas por centrifugação, a 3000 g por 15 min, lavadas em solução salina peptonada 0,1 % e ressuspensas em caldo TSB.

Culturas de *Listeria* e de *S. aureus*, numa densidade populacional de 10⁶ UFC.mL⁻¹, foram tratadas com bovicina HC5 e nisina nas concentrações 10, 20, 50, 100 e 150 UA.mL⁻¹, nos testes utilizando-se as bacteriocinas isoladas. Nos ensaios com bovicina HC5 e nisina combinadas, foram avaliadas as concentrações de 10 e 50 UA.mL⁻¹ de cada bacteriocina.

As microplacas foram incubadas a 37 °C e as leituras de absorvância a 630 nm foram feitas nos tempos 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 h de incubação em leitora de ELISA (Thermo Plate, modelo TP-Reader). O tratamento controle consistiu no cultivo das bactérias em meio TSB sem a adição das bacteriocinas.

3.6. Efeito de bovicina HC5 e, ou nisina sobre a viabilidade de *Listeria* e *S. aureus* em leite

O leite integral UAT (Ultra-alta temperatura) utilizado neste estudo foi adquirido em estabelecimento comercial do Município de Viçosa. As amostras foram manipuladas sob condições assépticas. As culturas de *L. monocytogenes* Scott A, *L. innocua* LMA83 e *S. aureus* ATCC 6538 foram selecionadas em função da maior resistência apresentada após serem tratadas com as bacteriocinas em TSB. As culturas foram ativadas em 5 mL de TSB e incubadas a 37 °C por 18 h. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 *g* por 15 min, lavadas em solução salina peptonada 0,1 % e ressuspendidas em leite integral UAT.

Foram transferidos, aproximadamente, 10^7 UFC.mL⁻¹ para tubos plásticos de 1,5 mL (Eppendorf®) contendo 1 mL de leite e diferentes concentrações de bovicina HC5 e de nisina foram acrescentadas individualmente ou combinadas. Nos ensaios com bovicina HC5 e nisina isoladas foram avaliadas as concentrações de 400, 800 e 1200 UA.mL⁻¹ enquanto nos ensaios em que se utilizou as bacteriocinas combinadas, foram adicionadas concentrações de 400, 600 e 800 UA.mL⁻¹ de cada bacteriocina.

A incubação foi a 37 °C e, nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 h, amostras foram coletadas para determinar o número de células viáveis pela técnica de microgotas (MORTON, 2001) plaqueando-se alíquotas de 25 µL em ágar tripticaseína e soja - TSA (Oxoid, Inglaterra). As placas foram incubadas a 37 °C por 12 a 24 h. Tratamento controle sem a adição das bacteriocinas no leite também foi realizado.

3.7. Atividade de bovicina HC5 e nisina sobre a viabilidade de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em queijo Minas frescal

3.7.1. Produção de queijo Minas frescal e inoculação com as estirpes patogênicas

O queijo Minas frescal foi produzido na usina piloto do Laticínios da FUNARBE de acordo com os procedimentos padrões empregados pelos

laticínios brasileiros (BURITI *et al.*, 2005). O leite foi pasteurizado pelo processo lento, 65 °C por 30 min, e resfriado para 42 °C a 44 °C. Cloreto de cálcio, ácido láctico e coalho foram adicionados e a coagulação ocorreu em, aproximadamente, 40 min. Após o corte e repouso, o soro foi drenado. A massa foi salgada com 3,5 % de NaCl e acondicionada em embalagens esterilizadas de 1 kg, sendo transferida para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DMB para as etapas subsequentes. As bacteriocinas bovicina HC5 e nisina foram adicionadas combinadas à massa do queijo na concentração de 600 UA.g⁻¹.

As culturas de *L. monocytogenes* Scott A e *S. aureus* ATCC 6538 foram ativadas em 5 mL de caldo TSB e incubadas a 37 °C por 18 h. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 15 min, lavadas em solução salina peptonada 0,1 % e ressuspensas em soro de leite drenado durante a produção do queijo. Diluições seriadas foram realizadas em soro de leite e as bactérias foram adicionadas à massa do queijo para alcançar contagem inicial de, aproximadamente, 10⁴ UFC.g⁻¹. A massa foi homogeneizada manualmente por 2 min e enformada. Os queijos com 150 g foram estocados em incubadora B.O.D. (Modelo CT-705, Cientec) a 4 °C, em embalagens plásticas esterilizadas. Paralelamente, foi realizado tratamento controle, sem adição de bacteriocinas.

3.7.2. Análises microbiológicas

Amostras em duplicata dos queijos Minas frescal foram analisadas durante o período de validade do produto, que corresponde a 30 dias. Nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 30 dias, amostras de 11 g foram coletadas para determinar a contagem de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. As amostras foram homogeneizadas em 99 mL de solução salina peptonada 0,1 %, diluídas e plaqueadas por espalhamento com auxílio de alça de Drigalski sobre ágar seletivo.

A contagem de *L. monocytogenes* foi feita em duplicata em cada amostra de queijo Minas frescal pelo plaqueamento em ágar PALCAM (Oxoid, Inglaterra). Nos tempos de análise em que o resultado foi abaixo do limite de detecção da técnica (1,0 x 10² UFC.g⁻¹) foi verificada a presença do patógeno

pelo método de enriquecimento seletivo de 25 g de amostra (BRASIL, 2003). No tempo 30 dias, amostras de 25 g de queijos contendo as bacteriocinas foram analisadas pelo método de enriquecimento seletivo e pelo método *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA) utilizando-se o kit VIDAS® *Listeria monocytogenes* II - LMO 2 (Biomerieux®) (AOAC, 2004.02).

A contagem de *S. aureus* foi feita em duplicata em cada amostra de queijo Minas frescal em ágar Baird Parker - BP (Himedia, Índia).

3.8. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo Minas frescal mantidos sob temperatura abusiva de estocagem

Os queijos foram fabricados conforme metodologia descrita no item 3.7.1. As bacteriocinas bovicina HC5 e nisina foram adicionadas combinadas à massa do queijo na concentração de 600 UA.g⁻¹. Cultura de *S. aureus* EMBRAPA 4018 produtora de enterotoxina D (SED) foi ativada em 5 mL de caldo TSB e incubada a 37 °C por 18 h. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 15 min, lavadas em solução salina peptonada 0,1 % e ressuspensas em soro de leite drenado durante a produção do queijo. Diluições seriadas foram realizadas em soro de leite e a cultura foi adicionado à massa do queijo com contagem inicial de, aproximadamente, 10⁴ UFC.g⁻¹. A massa foi então enformada e estocada em incubadora B.O.D. (Modelo 411 D, Nova Ética) a 15 °C, em embalagens plásticas esterilizadas.

A contagem de *S. aureus* foi feita em duplicata em cada amostra de queijo Minas frescal em ágar BP nos tempos 0, 15 e 30 dias.

No tempo equivalente a 30 dias de estocagem, foi verificada presença de enterotoxinas nas amostras de queijo. As análises foram realizadas no Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da FUNED. A extração de toxinas estafilocócicas (SE e TSST-1) foi realizada pesando-se 25 g do queijo em saco plástico para homogeneização e acrescentados 25 mL de tampão fosfato de sódio (0,02 mol.L⁻¹, pH 7,4). A amostra foi homogeneizada por 3 min, seguida de centrifugação a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em gaze esterilizada e o pH foi ajustado para 4,5 com solução de HCl 1 ou 5 N. Uma nova centrifugação foi realizada a 10.000 g por 20 min seguida da filtração do sobrenadante em gaze e ajuste do pH para 7,5 com solução de NaOH 1 ou 5

N. A solução foi centrifugada novamente a 10.000 *g* por 20 min e, após filtrada, foram adicionadas três gotas do conservante timerosol. Em seguida, realizou-se o teste de identificação de enterotoxinas estafilocócicas pelo método de imuno-difusão em gel , *Optimum Sensitive Plate* (OSP) (ROBBINS *et al.*, 1974).

3.9. Delineamento experimental

O experimento foi realizado no esquema de parcelas subdivididas para os tipos de bactérias, com as concentrações de bacteriocinas isoladas ou combinadas nas parcelas e com os tempos de análise nas subparcelas em delineamento inteiramente casualizado. Foram realizadas três repetições e quatro réplicas na determinação da atividade das bacteriocinas sobre as bactérias *in vitro*, três repetições e três réplicas na verificação do efeito das bacteriocinas em leite UAT e em duas repetições e duas réplicas nos ensaios de determinação da atividade das bacteriocinas sobre patógenos em queijos Minas frescal.

3.10. Análises estatísticas

Foram realizadas análises estatísticas descritivas dos dados como média aritmética e desvio-padrão com o auxílio dos programas Microsoft Excel® 2007 e SigmaPlot® versão 11.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes bioquímicos realizados com as estirpes de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e Scott A, *L. innocua* LMA83 e isolado de queijo Minas e *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 6538 e EMBRAPA 4018 apresentaram resultados típicos para cada espécie. No teste de indução da produção de toxinas por *S. aureus* constatou-se a produção de toxina da síndrome do choque tóxico - 1 (TSST-1) pelas estirpes *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 6538 enquanto *S. aureus* EMBRAPA 4018 produziu a enterotoxina estafilocócica D (SED). A SED, juntamente com as enterotoxinas A, B e C está predominantemente, associada a surtos de intoxicação alimentar (DINGES et al., 2000). A TSST-1 é provavelmente susceptível à clivagem pela pepsina, podendo ser menos estável no intestino em comparação com SE (DINGES et al., 2000; SCHLIEVERT et al., 2000).

4.1. Efeito de bovicina HC5 e, ou nisina sobre *Listeria* e *S. aureus* em caldo TSB

L. monocytogenes ATCC 7644 e Scott A cresceram em caldo TSB, sem adição de bacteriocinas (Figura 3 A a D), com velocidade específica de crescimento médio entre 0,50 h⁻¹ e 0,61 h⁻¹. A adição de bovicina HC5 nas concentrações 10, 20 e 50 UA.mL⁻¹ reduziu ou inibiu o crescimento de *L. monocytogenes*, enquanto concentrações de 100 e 150 UA.mL⁻¹ inibiram a multiplicação de *L. monocytogenes* (Figura 3 A e B). Quando nisina foi

adicionada ao meio TSB a partir de 10 UA.mL^{-1} , nenhum crescimento foi observado durante o período de 11 h de incubação a 37°C (Figura 3 C e D). Há indicação de que, após este período, pode ter ocorrido crescimento da estirpe Scott A em razão da presença de células adaptadas ou resistentes ao efeito da bacteriocina (Figura 3 D). Bouttefroy e Millièrre (2000) verificaram que o efeito bactericida de 100 UA.mL^{-1} de nisina ou 320 UA.mL^{-1} de curvaticina 13, bacteriocina produzida por *Lactobacillus curvatus* SB13, contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi apenas transitório, sendo observada a retomada de crescimento após, aproximadamente, 9 h de incubação a 37°C .

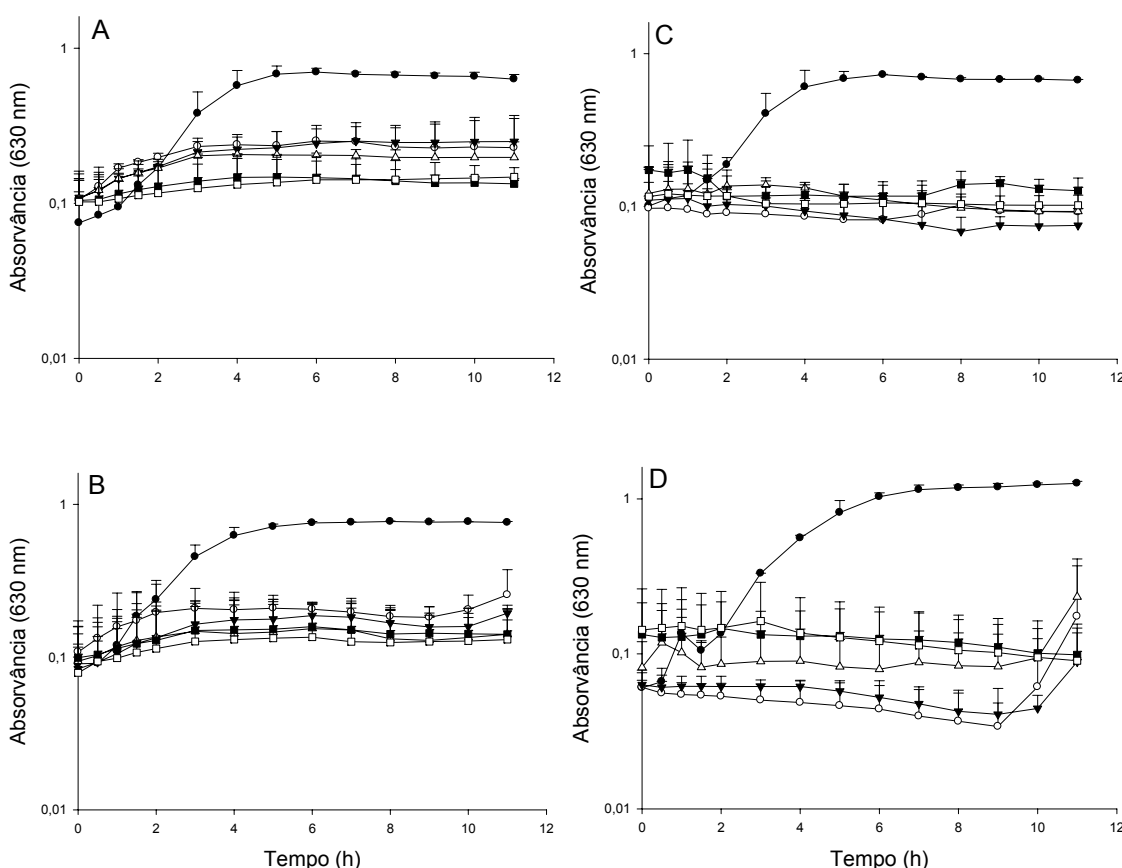


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de bovicina HC5 (A e B) e nisina (C e D) sobre o crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A e C) e *L. monocytogenes* Scott A (B e D). Aproximadamente 10^6 UFC.mL^{-1} de células de *L. monocytogenes* foram inoculadas em caldo TSB na presença das bacteriocinas nas concentrações 10 UA.mL^{-1} ($\circ$), 20 UA.mL^{-1} ($\blacktriangledown$), 50 UA.mL^{-1} ($\triangle$), 100 UA.mL^{-1} ($\blacksquare$) e 150 UA.mL^{-1} ($\square$). Controles sem adição de bacteriocinas ($\bullet$).

Estes resultados indicaram que, embora bovicina HC5 e nisina tenham exercido efeito inibidor semelhante sobre o patógeno, *L. monocytogenes* ATCC

7644 foi mais sensível à nisina enquanto *L. monocytogenes* Scott A apresentou-se mais sensível a bovicina HC5. O efeito inibidor verificado em concentrações acima de 100 UA.mL⁻¹ coincide com o observado por Mantovani e Russell (2003) que registraram crescimento de *L. monocytogenes* em caldo BHI por medidas de densidade óptica (DO) até a concentração de bovicina HC5 próxima a 100 UA.mL⁻¹, sendo que nessa concentração, o crescimento foi completamente inibido. Esse mesmo estudo demonstrou que o efeito bactericida da bovicina HC5 sobre *L. monocytogenes* foi em razão de induzir o efluxo de potássio extracelular, com redução acentuada do número de células viáveis em apenas 2 h de exposição à concentração de 640 UA.mL⁻¹ (MANTOVANI e RUSSELL, 2003). Resultados similares foram encontrados por Bozialis e Nychas (2006), quando a presença de 100 UI.mL⁻¹ de nisina inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* Scott A em caldo TSB.

A atividade antimicrobiana dos lantibióticos, como a nisina, está relacionada à capacidade dos mesmos ligarem-se especificamente ao lipídeo II, um dos precursores na biossíntese da parede celular e formar poros levando à morte da célula devido à perda de solutos intracelulares (BREUKINK et al., 2003; BREUKINK e KRUIJFF, 2006).

Bovicina HC5 e nisina combinadas nas concentrações 10 e 50 UA.mL⁻¹ inibiram completamente o crescimento das estirpes *L. monocytogenes* ATCC 7644 e Scott A (Figura 4). Estes resultados comprovaram a efetividade da combinação de duas bacteriocinas no controle desse patógeno.

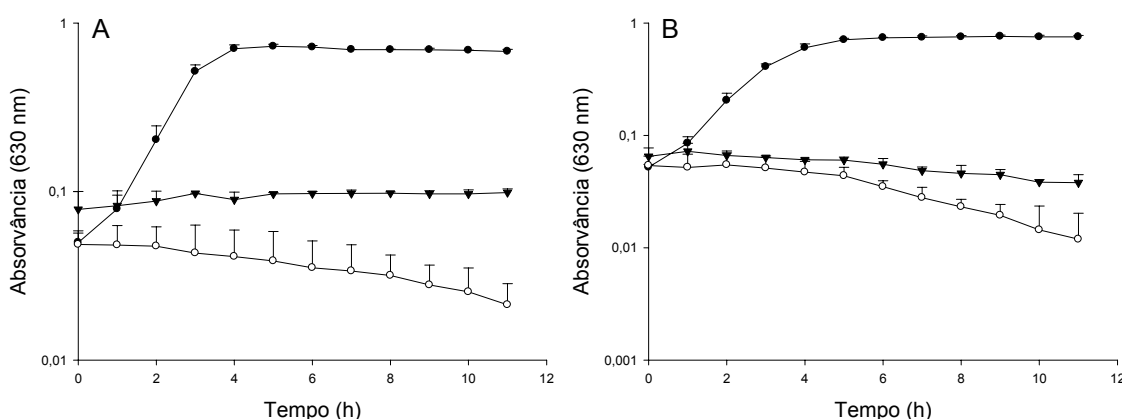


Figura 4. Efeito combinado de diferentes concentrações de bacteriocinas sobre o crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A) e *L. monocytogenes* Scott A (B). Aproximadamente, 10⁶ UFC.mL⁻¹ de células de *L. monocytogenes* foram inoculadas em caldo TSB na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina combinadas nas concentrações 10 UA.mL⁻¹ (○) e 50 UA.mL⁻¹ (▼). Controles sem adição de bacteriocinas (●).

Estirpes de *L. innocua* isolada de queijo Minas e LMA83 cresceram em caldo TSB (Figura 5 A a D), na ausência de bacteriocinas, com velocidade específica de crescimento média de $0,60 \text{ h}^{-1}$. O efeito das duas bacteriocinas foi diferente e, enquanto a bovicina HC5 inibiu completamente o crescimento de ambas as estirpes (Figura 5 A e B), nisina nas concentrações de 10 e 20 UA.mL^{-1} parece ter permitido a adaptação bacteriana que pode ter reiniciado a multiplicação após 10 h de fase lag (Figura 5 D). Estes resultados também indicaram diferença de sensibilidade às bacteriocinas pelas estirpes de *L. innocua*. Estudos conduzidos por Gallo et al. (2007) verificaram que a adição de concentrações maiores de nisina, como 100 e 300 UI.mL^{-1} , em soro de leite reduziu cinco e seis ciclos log no número de células viáveis de *L. innocua*, respectivamente.

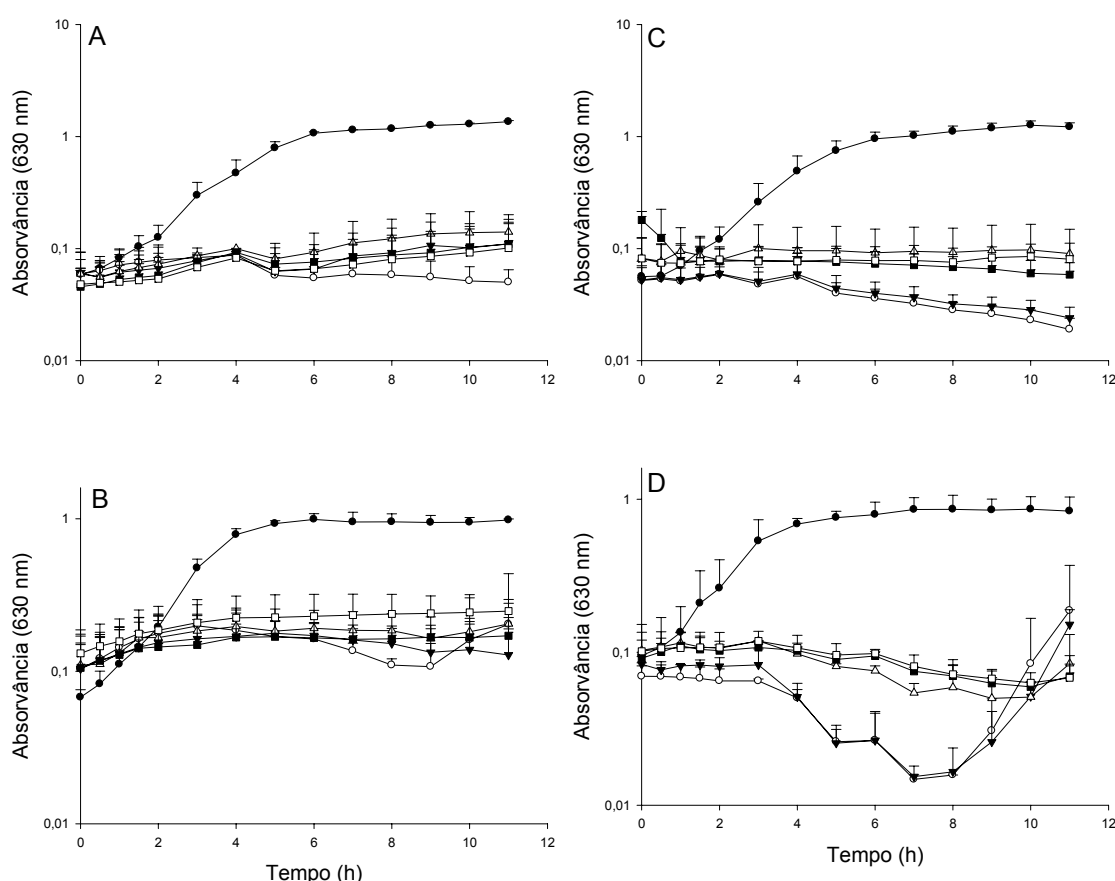


Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de bovicina HC5 (A e B) e nisina (C e D) sobre o crescimento de *L. innocua* isolado de queijo Minas (A e C) e *L. innocua* LMA83 (B e D). Aproximadamente, 10^6 UFC/mL^{-1} de células de *L. innocua* foram inoculadas em caldo TSB na presença das bacteriocinas nas concentrações 10 UA.mL^{-1} ($\circ$), 20 UA.mL^{-1} ($\blacktriangledown$), 50 UA.mL^{-1} ($\triangle$), 100 UA.mL^{-1} ($\blacksquare$) e 150 UA.mL^{-1} ($\square$). Controles sem adição de bacteriocinas ($\bullet$).

A combinação das bacteriocinas nas concentrações de 10 e 50 UA.mL⁻¹ adicionadas ao caldo TSB inibiu o crescimento de *L. innocua* (Figura 6 A e B), o que comprovou a sensibilidade dessa bactéria às bacteriocinas. El-Ziney e Jakobsen (2009) reportaram que a combinação de nisina e reuterina exerceu efeito bactericida sobre células planctônicas e biofilmes de *L. innocua* após 5 min de exposição, o que indicou efeito sinérgico entre esses antimicrobianos.

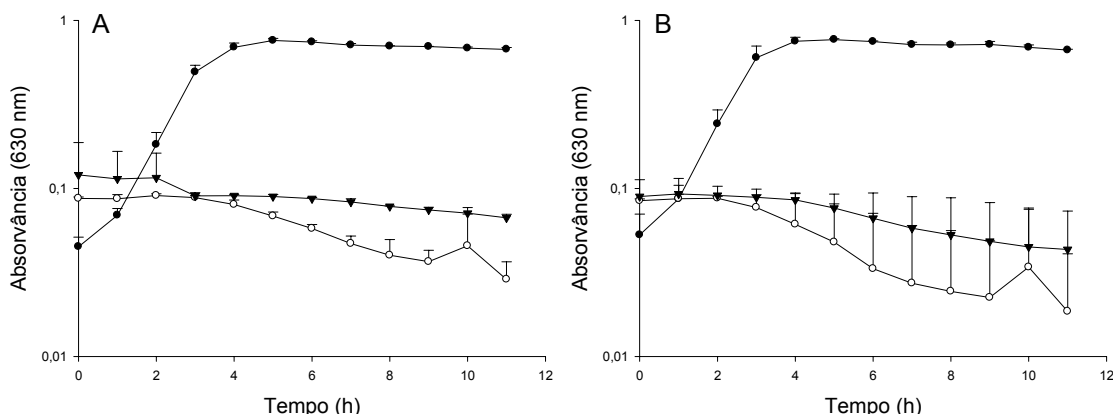


Figura 6. Efeito combinado de diferentes concentrações de bacteriocinas sobre o crescimento de *L. innocua* isolado de queijo Minas (A) e *L. innocua* LMA83 (B). Aproximadamente, 10⁶ UFC.mL⁻¹ de células de *L. innocua* foram inoculadas em caldo TSB na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina combinadas nas concentrações 10 UA.mL⁻¹ (○) e 50 UA.mL⁻¹ (▼). Controles sem adição de bacteriocinas (●).

L. monocytogenes e *L. innocua* apresentaram comportamento similar quando tratadas com as bacteriocinas em caldo TSB. *L. innocua*, espécie não patogênica, pode ser usada como um indicador biológico de *L. monocytogenes* em função de resposta similar aos tratamentos físico-químicos ou térmicos (KAMAT e NAIR, 1996).

S. aureus EMBRAPA 4018, ATCC 25923 e ATCC 6538 cresceram em caldo TSB, na ausência de bacteriocinas, com velocidade específica de crescimento entre 0,39 h⁻¹ e 0,83 h⁻¹ (Figura 7 A a F).

A presença de bovicina HC5 ou nisina nas concentrações de até 100 UA.mL⁻¹ aumentou a fase lag de *S. aureus* EMBRAPA 4018 (Figura 7 A). *S. aureus* ATCC 25923 apresentou velocidade específica de crescimento média de 0,28 h⁻¹ quando bovicina HC5 foi adicionada ao meio (Figura 7 B). Resultados mais variados foram observados quando a estirpe ATCC 6538 foi tratada com bacteriocinas. Concentrações de 10, 20 e 50 UA.mL⁻¹ de bovicina

HC5 em caldo TSB aumentou a fase lag em, aproximadamente, 1 h e a velocidade específica de crescimento foi de $0,20 \text{ h}^{-1}$. A presença de 100 UA.mL^{-1} de bovicina HC5 aumentou a fase lag de *S. aureus* ATCC 6538 em 8 h e levou a uma velocidade específica de crescimento de $0,41 \text{ h}^{-1}$ (Figura 7 C).

A multiplicação das estirpes EMBRAPA 4018 e ATCC 6538 foi completamente inibida quando bovicina HC5 foi adicionada ao caldo TSB na maior concentração (Figura 7 A e C).

S. aureus ATCC 25923 cresceu na presença de 10 UA.mL^{-1} de nisina, após fase lag de 7 h, com velocidade específica de crescimento de $0,26 \text{ h}^{-1}$. Todas as demais concentrações de nisina inibiram completamente o crescimento desta estirpe (Figura 7 E). Quando *S. aureus* ATCC 6538 foi tratado com as diferentes concentrações de nisina avaliadas, foi registrado um aumento de 7 h na fase lag (Figura 7 F), mas houve retomada de crescimento a uma velocidade específica média de $0,54 \text{ h}^{-1}$.

S. aureus EMBRAPA 4018 e ATCC 6538 foram mais sensíveis a bovicina HC5 enquanto a estirpe ATCC 25923 apresentou-se mais sensível ao efeito de nisina. Embora a adição de nisina tenha aumentado a fase lag de *S. aureus* ATCC 6538 mais do que bovicina HC5, 150 UA.mL^{-1} de bovicina HC5 inibiu completamente o crescimento do patógeno, fenômeno não observado quando foi utilizada a mesma concentração de nisina. A variação no perfil de sensibilidade de diferentes estirpes de *S. aureus* isolados da mastite bovina ao tratamento com bactericina nisina foi também constatada por Cruz (2009).

Micro-organismos tolerantes ou resistentes à nisina, incluindo *S. aureus*, são reportados na literatura. De acordo com Peschel et al. (1999), a resistência de algumas espécies de *Staphylococcus* está associada ao aumento da quantidade de D-alanina na estrutura dos ácidos teicóicos presentes na camada de peptídeoglicano dessas bactérias tornando as células mais positivamente carregadas. Essas alterações podem dificultar a interação da nisina, carregada positivamente, com a superfície das células. Mantovani e Russell (2003) verificaram que algumas bactérias resistentes à nisina não apresentaram resistência significativa à bovicina HC5, mesmo após sucessivos tratamentos com doses subletais da bacteriocina.

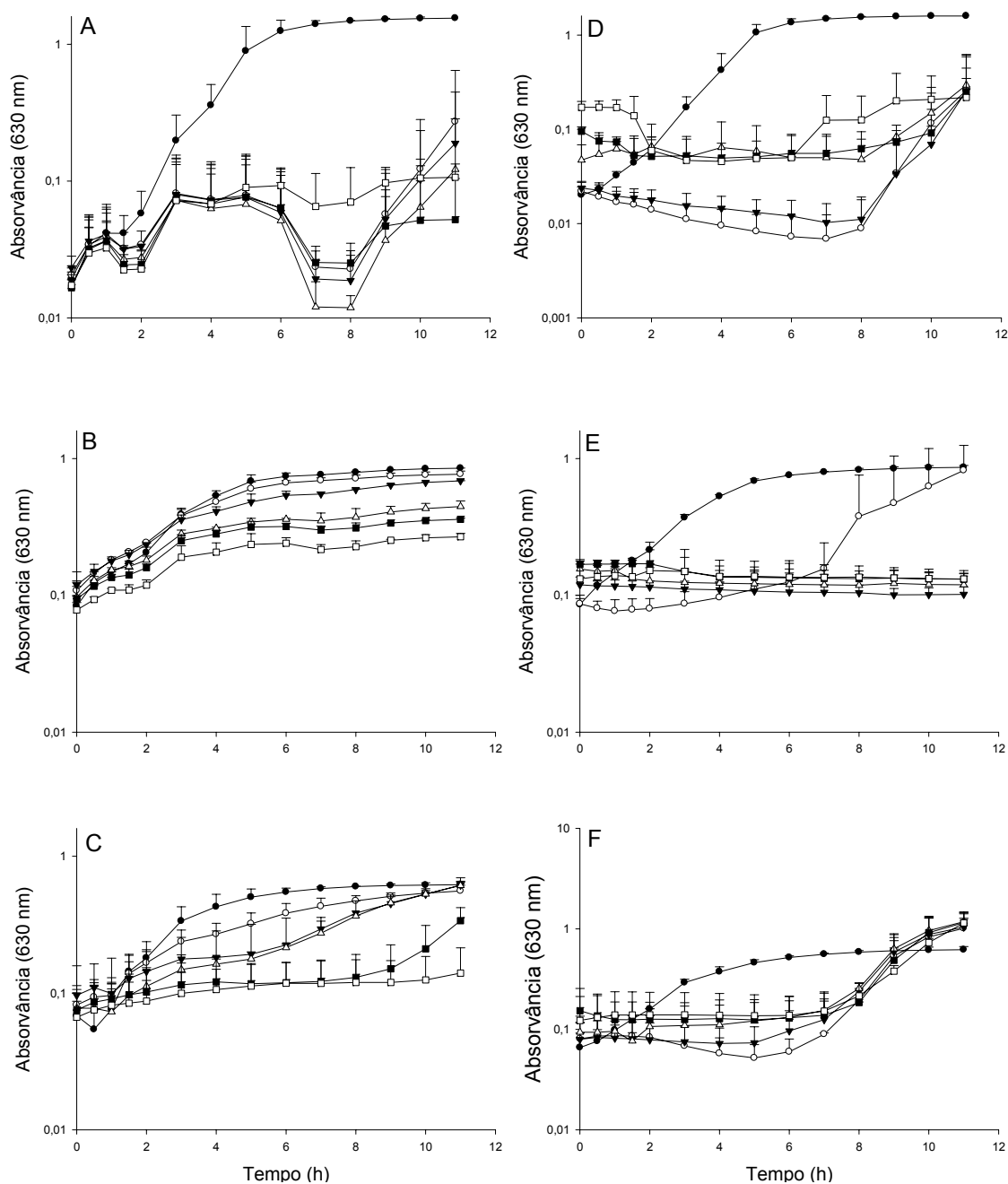


Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de bovicina HC5 (A, B e C) e nisina (D, E e F) sobre o crescimento de *S. aureus* EMBRAPA 4018 (A e D), *S. aureus* ATCC 25923 (B e E) e *S. aureus* ATCC 6538 (C e F) em caldo TSB. Aproximadamente, 10^6 UFC.mL⁻¹ de células de *S. aureus* foram inoculadas em caldo TSB na presença das bacteriocinas nas concentrações 10 UA.mL⁻¹ (○), 20 UA.mL⁻¹ (▼), 50 UA.mL⁻¹ (△), 100 UA.mL⁻¹ (■) e 150 UA.mL⁻¹ (□). Controles sem adição de bacteriocinas (●).

O crescimento de *S. aureus* EMBRAPA 4018 foi completamente inibido quando as bacteriocinas bovicina HC5 e nisina foram adicionadas combinadas ao caldo TSB (Figura 8 A). Entretanto, a estirpe ATCC 25923 cresceu no meio de cultivo contendo 10 UA.mL⁻¹ de bovicina HC5 e nisina combinadas, com velocidade específica de crescimento de 0,24 h⁻¹ e atingiu fase estacionária após 8 h de incubação (Figura 8 B). Embora a adição das bacteriocinas combinadas na concentração 10 UA.mL⁻¹ tenha reduzido a velocidade específica de crescimento, a inibição foi maior quando foram adicionados 50 UA.mL⁻¹ de cada uma das bacteriocinas. Estes resultados demonstram que a adição de bovicina HC5 e nisina combinadas, na concentração 50 UA.mL⁻¹, exerceu maior efeito sobre o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 do que a adição isolada de bovicina HC5 nas concentrações de até 100 UA.mL⁻¹ e nisina na concentração de 10 UA.mL⁻¹.

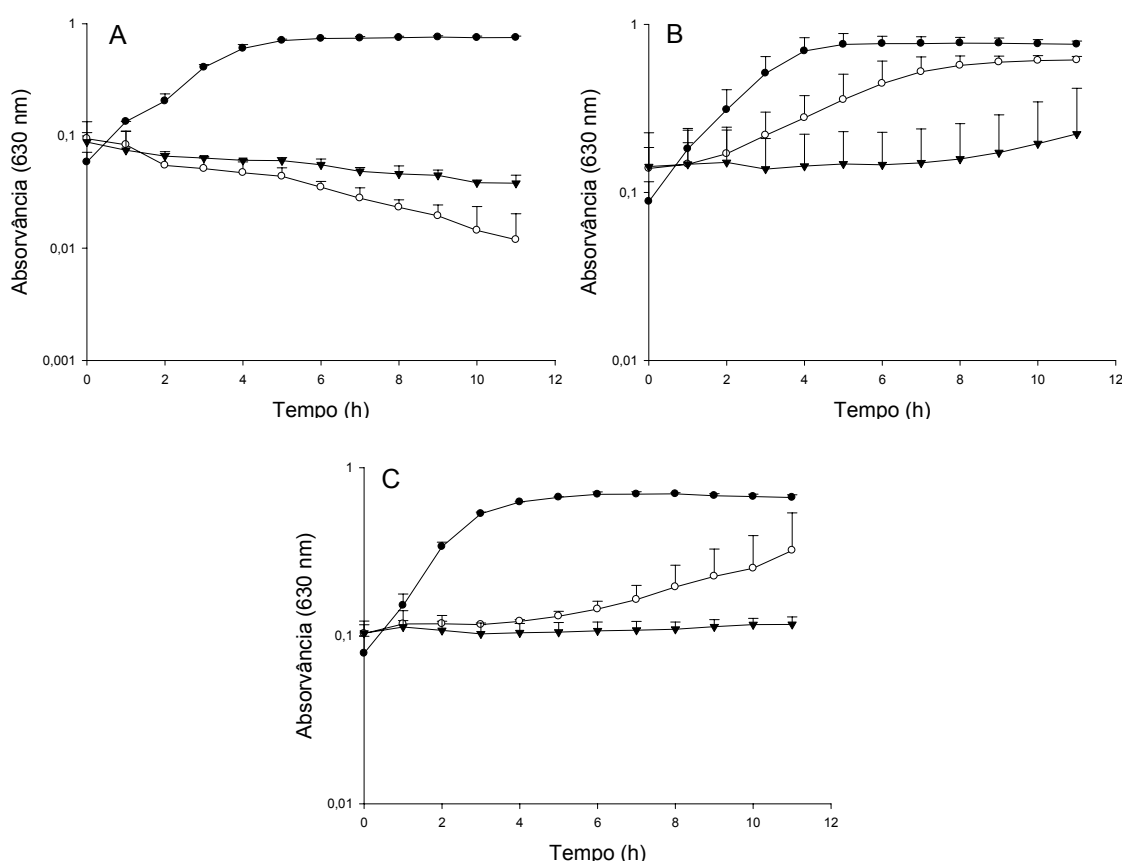


Figure 8. Efeito combinado de diferentes concentrações de bacteriocinas sobre o crescimento de *S. aureus* EMBRAPA 4018 (A), *S. aureus* ATCC 25923 (B) e *S. aureus* ATCC 6538 (C). Aproximadamente, 10⁶ UFC.mL⁻¹ de células de *S. aureus* foram inoculadas em caldo TSB na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina combinadas nas concentrações 10 UA.mL⁻¹ (○) e 50 UA.mL⁻¹ (▼). Controles sem adição de bacteriocinas (●).

A multiplicação da estirpe ATCC 6538 de *S. aureus* também foi constatada na presença 10 UA.mL^{-1} de ambas as bacteriocinas após fase lag de, aproximadamente, 5 h, sendo a velocidade específica de crescimento de $0,46 \text{ h}^{-1}$ (Figura 8 C). Nos ensaios em que se utilizaram as bacteriocinas isoladas, esse patógeno apresentou-se mais resistente do que naqueles em que as bacteriocinas foram adicionadas em combinação. O efeito combinado de bacteriocinas pode permitir o uso de dosagens menores comparadas à aplicação individual.

Segundo Gálvez et al. (2007), quando as células são expostas à combinação de fatores antimicrobianos, a intensidade dos danos pode ser aumentada uma vez que esses fatores podem agir no mesmo alvo. O reparo de múltiplos danos pode requerer um elevado gasto energético, resultando na exaustão de energia e morte celular (GÁLVEZ et al., 2007).

4.2. Efeito de bovicina HC5 e, ou nisina sobre *Listeria* e *S. aureus* em leite

As estirpes *L. monocytogenes* Scott A, *S. aureus* ATCC 6538 e *L. innocua* LMA83 foram selecionadas para avaliar o efeito das bacteriocinas em leite. O critério de seleção baseou-se na maior resistência à ação das bacteriocinas em caldo TSB.

O número de células viáveis de *L. monocytogenes* Scott A inoculado em leite integral UAT, na ausência de bacteriocinas aumentou, aproximadamente, um ciclo log após 12 h de incubação. Quando bovicina HC5 foi adicionada ao leite, verificou-se uma redução no número de células viáveis (Figura 9). A presença de nisina na concentração 1200 UA.mL^{-1} reduziu o número de células viáveis nas primeiras 3 h de incubação sendo o crescimento reassumido após esse período (Figura 9). Não foi observada inibição de crescimento nas demais concentrações de nisina (Figura 9).

Estes resultados comprovaram a maior sensibilidade de *L. monocytogenes* Scott A a bovicina HC5 do que a nisina, conforme observado nos resultados anteriores, em caldo TSB.

Embora a adição de bacteriocinas em leite para consumo não seja permitida, esse produto serve como um importante sistema para avaliar a influência da composição química do leite sobre a atividade das bacteriocinas.

O leite é uma mistura complexa de substâncias, como água, proteínas, lactose e gordura, que podem afetar a efetividade das bacteriocinas.

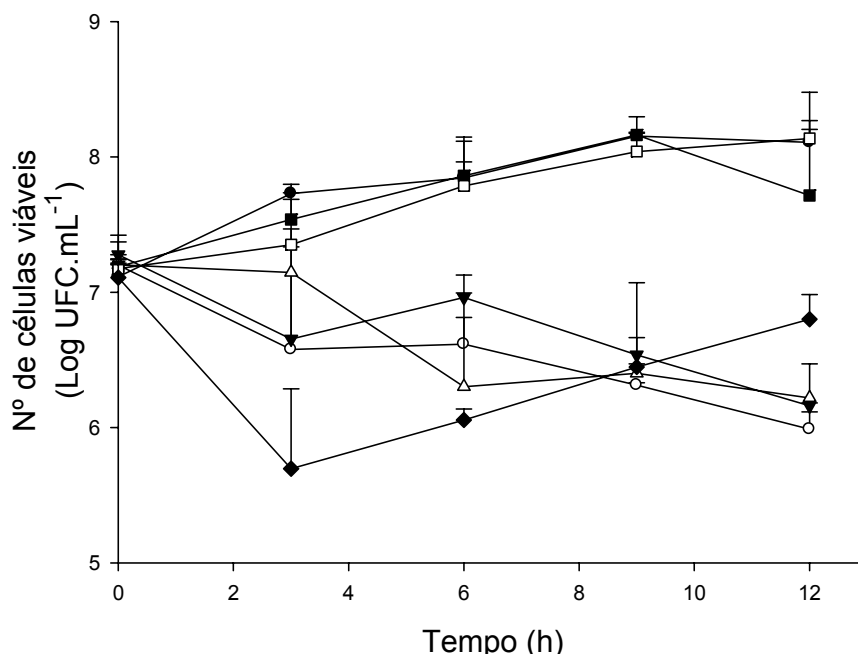


Figura 9. Efeito de diferentes concentrações de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de *L. monocytogenes* Scott A em leite integral UAT. Aproximadamente, 10^7 UFC.mL⁻¹ de células de *L. monocytogenes* foram inoculadas em leite na presença das bacteriocinas nas concentrações 400 UA.mL⁻¹ (○), 800 UA.mL⁻¹ (▼) ou 1200 UA.mL⁻¹ (△) de bovicina HC5 e 400 UA.mL⁻¹ (■), 800 UA.mL⁻¹ (□) ou 1200 UA.mL⁻¹ (◆) de nisina. Controles sem adição de bacteriocinas (●).

Kim et al. (2008) constataram que a adição de nisina nas concentrações 62,5; 125; 250 e 500 UI.mL⁻¹ apresentou efeito significativo sobre *L. monocytogenes* em leite desnatado comparado ao controle. Em leite integral, nisina apresentou atividade moderada sendo observada rápida redução da população de *L. monocytogenes* durante dois dias de incubação e, o crescimento reassumido após esse período. A adição de nisina em leite desnatado, nas concentrações de 250 e 500 UI.mL⁻¹ reduziu drasticamente o número de células em dois dias, não sendo observado nenhum crescimento durante 10 dias (KIM et al., 2008). Esses resultados comprovam que a atividade da bacteriocina é dependente do conteúdo de gordura presente no leite, sendo que a interação entre os lipídeos do leite e a nisina pode limitar a

aplicação dessa bacteriocina em produtos lácteos gordurosos (SOBRINO-LÓPEZ e MARTÍN-BELLOSO, 2008).

Bovicina HC5 e nisina adicionadas combinadas ao leite integral UAT exerceram atividade bactericida sobre *L. monocytogenes*. Quando as bacteriocinas combinadas foram utilizadas nas concentrações 600 e 800 UA.mL⁻¹, houve redução acentuada do número de células até valores inferiores ao limite de detecção da técnica empregada (10¹ UFC.mL⁻¹) (Figura 10).

Nenhuma pesquisa que avalie o efeito sinérgico de bovicina HC5 com outro agente antimicrobiano em leite foi realizada até o momento. No entanto, resultados de efeito sinérgico de nisina e antimicrobianos podem ser exemplificados. Kim et al. (2008) verificaram que nisina associada ao extrato de alho apresentou atividade potencial antilisteria com efeito sinérgico para a redução do número de células viáveis de *L. monocytogenes* em leite integral e desnatado em 14 dias.

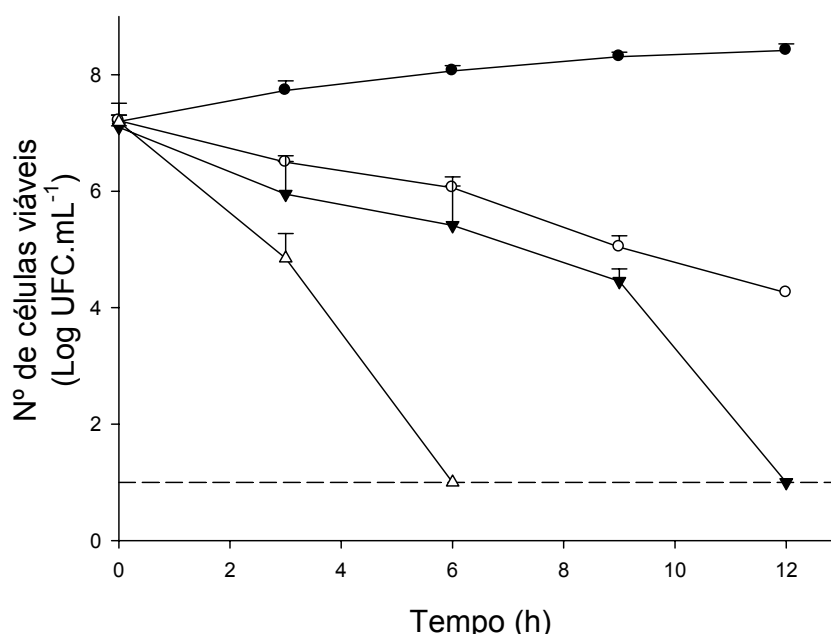


Figura 10. Efeito combinado de diferentes concentrações de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de *L. monocytogenes* Scott A em leite integral UAT. Aproximadamente, 10⁷ UFC.mL⁻¹ de células de *L. monocytogenes* foram inoculadas em leite na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina nas concentrações 400 UA.mL⁻¹ (○), 600 UA.mL⁻¹ (▼) ou 800 UA.mL⁻¹ (△). Controles sem adição de bacteriocinas (●). A linha tracejada indica o limite de detecção do método utilizado.

Na ausência de bacteriocinas foi observado um aumento de quase dois ciclos log no número de células viáveis de *L. innocua* inoculada em leite (Figura 11). A adição de bovicina HC5 ao leite, independente da concentração, reduziu o número de células viáveis em mais de 5 ciclos log. A redução de células de *L. innocua* a números abaixo do limite de detecção da técnica ocorreu após 6 h de incubação, na presença de bovicina HC5 nas concentrações 400 e 800 UA.mL⁻¹. Quando a concentração foi de 1200 UA.mL⁻¹ de bovicina HC5, em apenas 3 h de incubação observou-se redução de células viáveis a números abaixo do limite de detecção da técnica. Em leite contendo *L. innocua* acrescido de nisina, um aumento de 3 h na fase lag foi observado, sendo o crescimento reassumido após esse período (Figura 11). Estes resultados permitem concluir que *L. innocua* LMA83 foi mais sensível a bovicina HC5 do que à nisina.

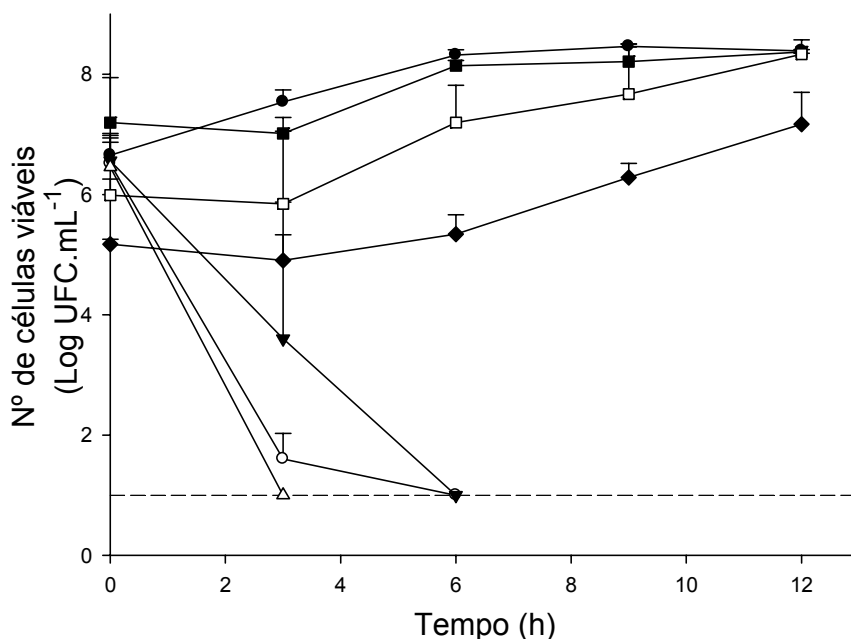


Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de *L. innocua* LMA83 em leite integral UAT. Aproximadamente, 10⁷ UFC.mL⁻¹ de células de *L. innocua* foram inoculadas em leite na presença das bacteriocinas nas concentrações 400 UA.mL⁻¹ (○), 800 UA.mL⁻¹ (▼) ou 1200 UA.mL⁻¹ (△) de bovicina HC5 e 400 UA.mL⁻¹ (■), 800 UA.mL⁻¹ (□) ou 1200 UA.mL⁻¹ (◆) de nisina. Controles sem adição de bacteriocinas (●). A linha tracejada indica o limite de detecção do método utilizado.

Quando o leite integral UAT, sem bacteriocinas, foi inoculado com *S. aureus* ATCC 6538, o número de células viáveis aumentou cerca de um ciclo log após 9 h de incubação e a adição de bovicina HC5 e nisina isoladamente nas concentrações 400 e 800 UA.mL⁻¹ não impediram o crescimento de *S. aureus* (Figura 12). Quando as bacteriocinas foram adicionadas no leite na concentração de 1200 UA.mL⁻¹, bovicina HC5 exerceu efeito bacteriostático enquanto nisina exerceu efeito bactericida (Figura 12). Nisina também foi bactericida após 4 h de incubação a 37 °C e promoveu a redução de 2,89 log UFC.mL⁻¹ na população de 10⁴ UFC.mL⁻¹ de *S. aureus* quando foi adicionada na concentração de 100 UI.mL⁻¹ em leite (ARQUÉS et al.,2004). Entretanto, o crescimento foi reassumido e atingiu 8,39 log UFC.mL⁻¹ e pode ser atribuído à presença de células resistentes.

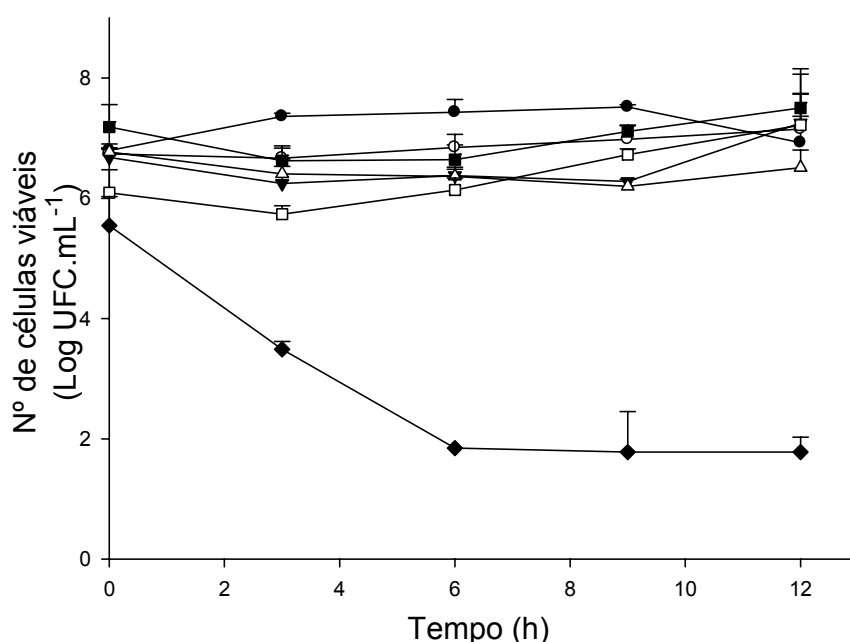


Figura 12. Efeito de diferentes concentrações de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de *S. aureus* ATCC 6538 em leite integral UAT. Aproximadamente, 10⁷ UFC.mL⁻¹ de células de *S. aureus* foram inoculadas em leite na presença das bacteriocinas nas concentrações 400 UA.mL⁻¹ (○), 800 UA.mL⁻¹ (▼) ou 1200 UA.mL⁻¹ (△) de bovicina HC5 e 400 UA.mL⁻¹ (■), 800 UA.mL⁻¹ (□) ou 1200 UA.mL⁻¹ (◆) de nisina. Controles sem adição de bacteriocinas (●).

A adição de bovicina HC5 e nisina combinadas reduziu o número de células viáveis de *S. aureus* ATCC 6538 em leite UAT para valores inferiores ao limite de detecção da técnica, após 9 h de incubação (Figura 13). Estes dados reforçaram as observações do efeito bactericida das bacteriocinas quando empregadas combinadas. Efeito sinérgico também foi encontrado por Arqués et al. (2004) ao avaliarem a combinação de nisina e reuterina, antimicrobiano produzido por *Lactobacillus reuteri*, em leite. Esses autores verificaram a redução de, aproximadamente, dois ciclos log de *S. aureus* tratados com os antimicrobianos combinados após 24 h de incubação.

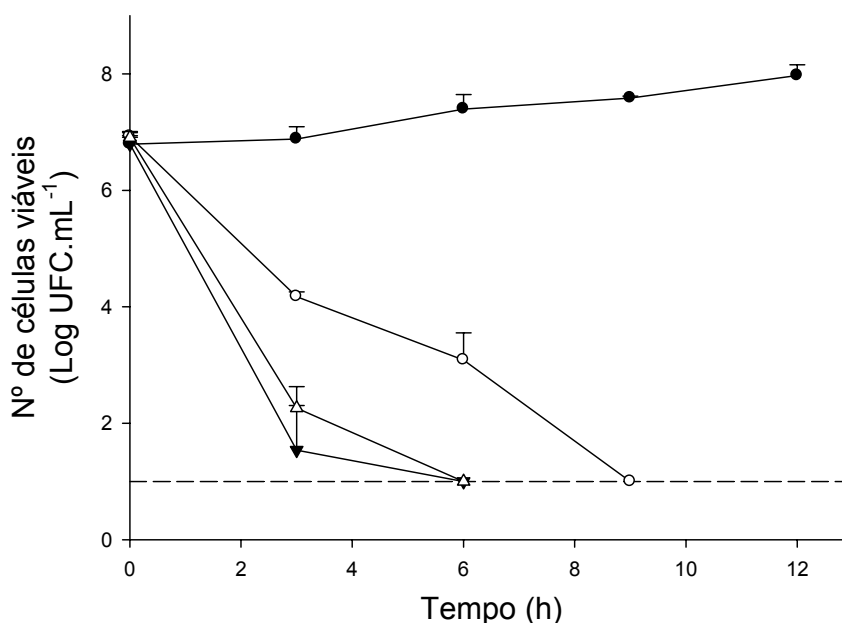


Figura 13. Efeito combinado de diferentes concentrações de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de *S. aureus* ATCC 6538 em leite integral UAT. Aproximadamente, 10^7 UFC.mL⁻¹ de células de *S. aureus* foram inoculadas em leite na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina nas concentrações 400 UA.mL⁻¹ (—○—), 600 UA.mL⁻¹ (—▼—) ou 800 UA.mL⁻¹ (—△—). Controles sem adição de bacteriocinas (—●—). A linha tracejada indica o limite de detecção do método utilizado.

4.3. Efeito de bovicina HC5 e nisina sobre a viabilidade de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em queijo Minas frescal

Nas amostras de queijo Minas frescal inoculadas com, aproximadamente, 10^4 UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* Scott A sem a presença

das bacteriocinas, o número de células viáveis aumentou cerca de três ciclos log durante 9 dias de estocagem a 4 °C (Figura 14). Quando bovicina HC5 e nisina foram adicionadas combinadas na concentração 600 UA.g⁻¹, foi observada uma acentuada redução na população deste patógeno. Nos tempos equivalentes a 9, 12 e 15 dias, não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* Scott A em amostras de 25 g de queijo Minas frescal, pela técnica de enriquecimento seletivo (Figura 14). No tempo equivalente a 30 dias de estocagem, a ausência de *L. monocytogenes* no queijo foi confirmada pela técnica de enriquecimento seletivo e pela técnica ELFA. Estes resultados indicaram o efeito bactericida da combinação de bovicina HC5 e nisina sobre *L. monocytogenes* em queijo Minas frescal e demonstraram o potencial destas bacteriocinas como bioconservantes em queijos.

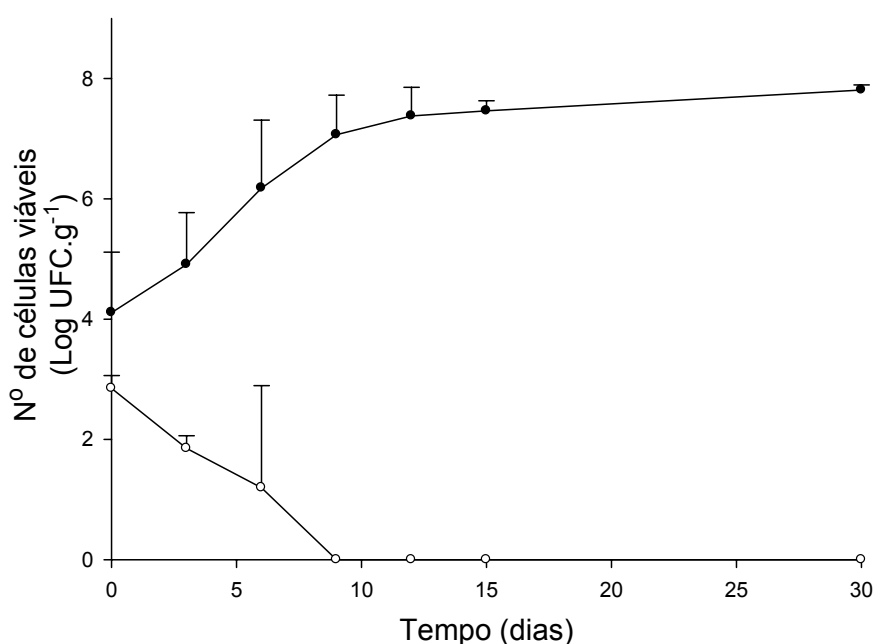


Figura 14. Efeito combinado de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de *L. monocytogenes* Scott A em queijo Minas frescal armazenados a 4 °C. Aproximadamente, 10⁴ UFC.g⁻¹ de células de *L. monocytogenes* foram inoculadas na massa do queijo na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina na concentração 600 UA.g⁻¹ (—○—). Controles sem adição de bacteriocinas (—●—).

O uso de bacteriocinas nas indústrias de queijos é reforçada por resultados apresentados por outros autores. Martínez et al. (2005) avaliaram a susceptibilidade de *Listeria* isoladas de queijo artesanal comercializado em

Astúrias (Espanha) à diversas bacteriocinas. Pediocina PA-1 foi a bacteriocina mais ativa seguida por enterocina AS-48, nisina e plantaricina C. Entretanto, esse estudo encontrou algumas estirpes de *L. monocytogenes* e *L. innocua* altamente resistentes a PA-1. Davis et al. (1996) reportaram que a parede celular foi crítica para o desenvolvimento da resistência de *L. monocytogenes* a nisina. A adaptação de micro-organismos resistentes a bovicina HC5 ainda não foi relatada.

A possibilidade de estirpes patogênicas tornarem-se resistentes a agentes antimicrobianos, como as bacteriocinas, preocupa a indústria de alimentos, incluindo as indústrias de fabricação de queijos, podendo dificultar o controle destes micro-organismos nos alimentos.

O crescimento de bactérias em alimentos tratados com bacteriocinas pode ocorrer pela adição de concentrações de bacteriocinas insuficientes para inativar todas as células ou em função de fatores físico-químicos como pH alcalino, concentração de NaCl ou gordura que diminuem a ação das bacteriocinas (BOUTTEFROY e MILLIÈRE, 2000). O leite apresenta enzimas proteolíticas naturais como a plasmina que torna-se concentrada no queijo e pode exercer alguma atividade sobre os peptídeos antimicrobianos. Mantovani et al. (2002) verificaram que bovicina HC5 não é degradada por proteinase K ou quimotripsina, mas segundo Houlihan e Russell (2006), alguma inativação foi observada quando pronase E ou tripsina foi adicionada ao meio contendo bovicina HC5. Estudos conduzidos por Chollet et al. (2008) em queijo Emmental, indicaram que nisina interagiu com a matriz do queijo, como os glóbulos de gordura mas não foi afetado por proteases.

Tratamentos combinados constituem alternativas úteis no controle de patógenos de origem alimentar em produtos lácteos. Nenhuma pesquisa envolvendo o uso combinado de bovicina HC5 e nisina para inibir o crescimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em queijo Minas frescal foi realizada, entretanto, a combinação de nisina e outras substâncias é descrita. Arqués et al. (2008) estudaram o uso de nisina combinada com outro agente antimicrobiano para controlar o crescimento de *L. monocytogenes* em queijo. Quando nisina e lactoperoxidase foram adicionadas individualmente, a contagem no terceiro dia de estocagem foi 2,54 e 4,12 log UFC.g⁻¹ menor que o controle, respectivamente. O crescimento foi reassumido após o terceiro dia, com contagem final semelhante ao controle. Ao adicionar os dois agentes

antimicrobianos combinados, esses autores observaram grande diferença ($7,66 \log \text{UFC.g}^{-1}$) comparada ao controle no terceiro dia e valores inferiores ao limite de detecção da técnica foram observados no décimo segundo dia de estocagem.

No presente estudo, o efeito sinérgico também foi encontrado quando bovicina HC5 e nisina foram adicionadas, o que demonstrou que a combinação de agentes antimicrobianos pode resultar em um controle eficiente no crescimento de *L. monocytogenes*.

O efeito das bacteriocinas combinadas sobre *S. aureus* ATCC 6538 inoculado na massa do queijo foi observado com redução de um ciclo log nos primeiros 15 dias de estocagem a 4°C , sendo o crescimento reassumido após esse período (Figura 15).

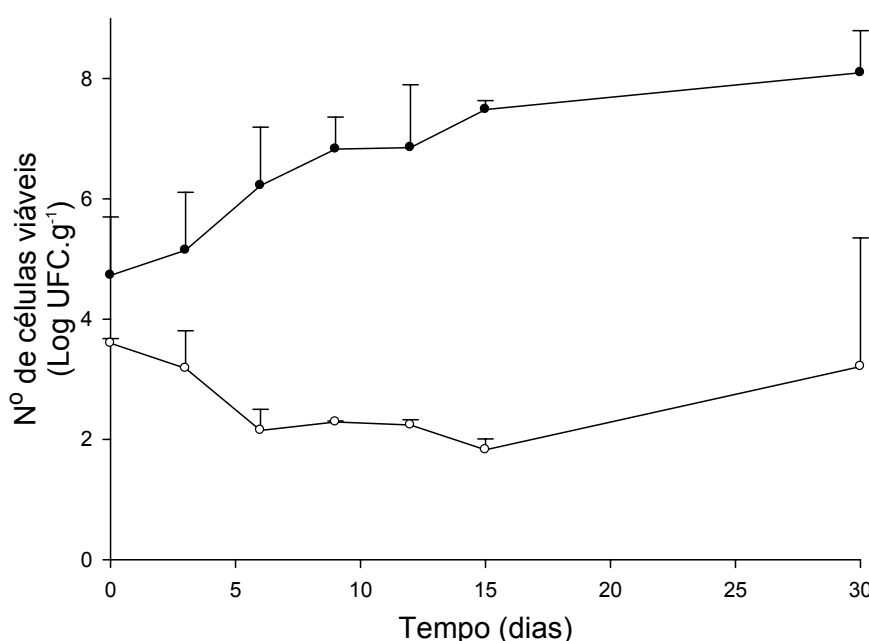


Figura 15. Efeito combinado de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de *S. aureus* ATCC 6538 em queijo Minas fresco armazenados a 4°C . Aproximadamente, 10^4UFC.g^{-1} de células de *S. aureus* foram inoculadas na massa do queijo na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina na concentração 600UA.g^{-1} ($\circ$). Controles sem adição de bacteriocinas ($\bullet$).

Arqués et al. (2008) também avaliaram o efeito de nisina combinada com outro agente antimicrobiano no controle de *S. aureus* em queijo. Quando nisina e lactoperoxidase foram adicionadas individualmente, a população do patógeno

no terceiro dia de estocagem foi 1,28 e 1,02 log UFC.g⁻¹ menor que o controle, respectivamente. Após 12 dias, as contagens finais foram semelhantes às do tratamento controle. A combinação dos dois agentes antimicrobianos levou a uma redução de 3,21 log UFC.g⁻¹ no tempo três dias, entretanto uma diferença de apenas 1,44 log UFC.g⁻¹ foi observada no décimo segundo dia, comparado ao controle. Esses resultados revelaram que a combinação de dois bioconservantes apresenta maior efeito inibitório sobre *S. aureus* do que quando aplicados individualmente. *S. aureus* foi mais resistente à adição combinada de nisina e lactoperoxidase do que *L. monocytogenes*, assim como o encontrado nos tratamentos onde foram adicionadas bovicina HC5 e nisina combinadas.

As características de estabilidade a altas temperaturas e a baixo pH apresentadas pela bovicina HC5 indicam que esta bacteriocina apresenta potencial para ser usada como conservante natural em queijos produzidos com leite pasteurizado.

4.4. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo Minas frescal mantidos sob temperatura abusiva de estocagem

O crescimento de *S. aureus* foi observado nos queijos, adicionados ou não de bovicina HC5 e nisina combinadas na concentração 600 UA.g⁻¹, mantidos sob temperatura abusiva de estocagem de 15 °C (Figura 16).

Embora a presença das bacteriocinas no queijo tenha diminuído a velocidade de crescimento de *S. aureus* EMBRAPA 4018, a concentração avaliada não impediu a produção de enterotoxina, após 30 dias de incubação sob temperatura abusiva de 15 °C. Os resultados indicaram que *S. aureus* EMBRAPA 4018 é produtor de SED e de SEC, entretanto, na análise de indução de produção de toxina, a estirpe produziu apenas SED em meio de cultura e no queijo, apenas a presença de SEC foi detectada.

Nenhuma referência sobre produção de SE em diferentes substratos de cultivo foi encontrada na literatura entretanto, estudos realizados por Derzelle et al. (2009) revelaram que a abundância relativa de cada transcrito dos genes SE varia diferencialmente, durante o crescimento de *S. aureus* uma vez que cada gene que codifica a SE tem um comportamento específico e modelo

próprio de expressão. Os ensaios de abundância relativa de mRNA indicaram produção máxima de SEB, SEC e SED durante o período de transição entre as fases exponencial e estacionária, enquanto SEA é produzido durante toda fase de crescimento exponencial (DERZELLE et al., 2009).

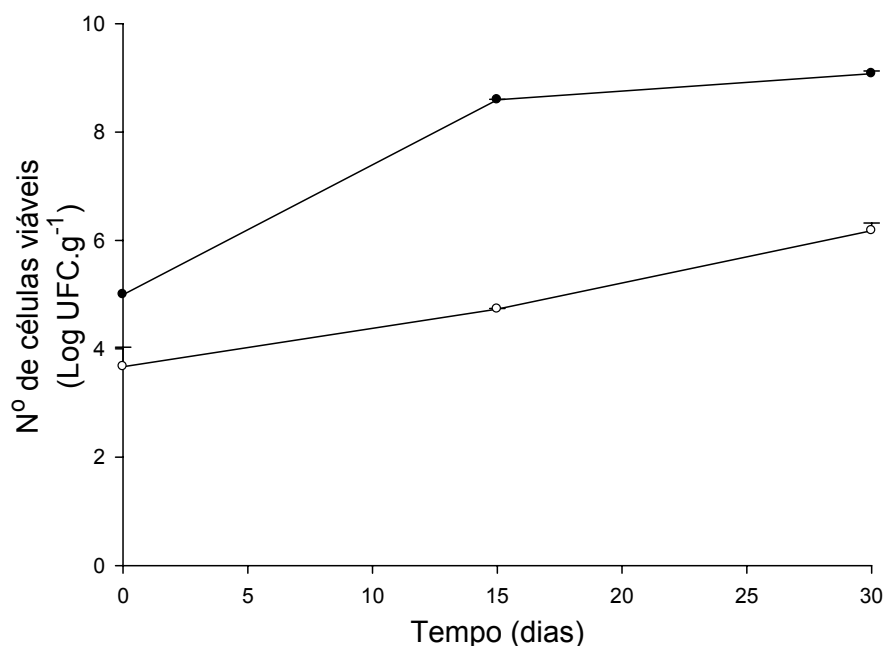


Figura 16. Efeito combinado de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de *S. aureus* EMBRAPA 4018 em queijo Minas fresco estocado sob temperatura abusiva de temperatura (15 °C). Aproximadamente, 10^4 UFC. g⁻¹ de células de *S. aureus* foram inoculadas na massa do queijo na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina na concentração 600 UA.g⁻¹ (—○—). Controles sem adição de bacteriocinas (—●—).

Considerando que uma estirpe de *S. aureus* é capaz de produzir diferentes tipos de SE de acordo com a fase de crescimento em que se encontra, estes resultados permitem sugerir que a composição do meio de crescimento pode influenciar na expressão dos genes que codificam as SE.

Embora o uso de nisina no processo de fabricação de queijos seja prática legal no Brasil, este estudo demonstrou que mesmo na presença de concentrações de nisina suficientes para inativar *S. aureus*, a temperatura de estocagem do produto é fundamental para a efetividade desse tratamento. Também devem ser consideradas as diversas medidas de controle na indústria de alimentos para impedir ou minimizar a contaminação bacteriana, incluindo as boas práticas de fabricação (BPF), sanitização efetiva, medidas de higiene

com relação à indústria, produtos alimentares e manipuladores de alimentos além, dos fundamentos de um efetivo programa de Análises de Perigos de Pontos Críticos de Controle (APPCC).

5. CONCLUSÕES

Bovicina HC5 e nisina apresentaram atividade inibitória similar sobre o crescimento de *Listeria*, com maior eficiência quando usadas combinadas.

A sensibilidade ao efeito das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina varia em função da estirpe de *S. aureus*.

Bovicina HC5 e nisina combinadas agiram sinergisticamente no controle de bactérias em meio de cultura e em leite integral.

Bovicina HC5 e nisina combinadas exerceram efeito bactericida sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus* em queijo Minas frescal. Entretanto, *S. aureus* resistentes foram recuperados após 15 dias de estocagem do queijo a 4 °C.

A combinação de bovicina HC5 e nisina reduziu o crescimento, mas não impediu a produção de enterotoxinas estafilocócicas por *S. aureus* em queijo Minas frescal mantidos sob temperatura abusiva de estocagem de 15 °C.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cheese made in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 578-580, 2000, Disponível em <http://www.scielo.br>.

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; SERAFINI, A. B. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. **Food Control**, v. 19, p. 200-207, 2008.

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

ARQUÉS, J. L.; FERNÁNDEZ, J.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; RODRÍGUEZ, E.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 225-229, 2004.

ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Cuajada, a semisolid dairy

product manufactured in Spain. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 70-75, 2008.

BAKER, J. S.; BORMANN, M. A.; BOUDREAU, D. H. Evaluation of various rapid agglutination methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 726–729, 1985.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 1-20, 2004.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB- 8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719-730, 2004.

BOUTTEFROY, A.; MILLIÈRE, J. Nisin-curvaticin 13 combination for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 65-75, 2000.

BOZIARIS, I. S.; NYCHAS, G. J. E. Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. **Food Microbiology**, v. 23, p. 779-784, 2006.

BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos**. DOU 11 de março de 1996.

BRASIL, 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 352 de 04 de setembro de 1997. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas frescal**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>.

BRASIL, 2001. Resolução RDC n.º 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>

BRASIL, 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 62 de 26 de agosto de 2003, Brasília/DF. **Diário Oficial da União**, n.º 181, seção 1, p. 14-51.

BREUKINK, E.; KRUIJFF, B. Lipid II as a target for antibiotics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 4, p. 321–323, 2006.

BREUKINK, E.; VAN HEUSDEN, H. E.; VOLLMERHAUS, P. J.; BRUNNER, S. E. L.; WALKER, S.; HECK, A. KRUIJFF, B. 2003. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 19898–19903, 2003.

BRITO, J. R. F.; SANTOS, E. M. P.; ARCURI, E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; CERQUEIRA, M. M. P. O; BELTRAN, J. M. S.; CALL, J. E.; LIU, Y.; PORTO-FETT, A. C. S.; LUCHANSKY, J. B. Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, 4954-4961, 2008.

BRUNO, M. E. C.; MONTVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 3003-3010, 1994.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*, **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, p. 173-180, 2005.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G.; Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9-14, 2002.

CARVALHO, A. A. T. **Atividade inibitória de bovicina HC5 sobre bactérias deterioradoras de polpa de manga**. 2006. 89p. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola]. Universidade Federal de Viçosa.

CARVALHO, A. A. T.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Bactericidal effect of bovicin HC5 and nisin against *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 68-74, 2007a.

CARVALHO, A. A. T.; VANETTI, M. C. D.; MANTOVANI, H. C. Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1685-1691, 2008.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, p. 262-267, 2007b.

CHOLLET, E.; SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; DEGRAEVE, P. 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**, v. 19, p. 982-989, 2008.

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

CRUZ, A. M. O. **Efeito da nisina sobre patógenos da mastite bovina**. 2009. 96p. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola]. Universidade Federal de Viçosa.

DAVIES, E. A.; BEVIS, H. E.; DELVES-BROUGHTON, J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 343-346, 1997.

DAVIES, E.A.; FALAHEE, M.B.; ADAMS, M.R. Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 139-146, 1996.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne disease in France and different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

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

DIAS, R. S.; SOARES, A. C.; PINHEIRO, C. S.; FAÚLA, L. L. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas e de linhagens enterotoxigênicas em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar. **Gestão, Ciência & Saúde**, v. 3, n. 2, p. 37-44, 2008.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Review**, v. 13, p. 16–34, 2000.

EL-ZINEY, M.; JAKOBSEN, M. Effectiveness of reuterin alone and in combination with nisin or other food contact surfaces sanitizers and cleaners for disinfection of stainless steel surfaces contaminated with *Escherichia coli* and *Listeria innocua*. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 7, n. 3-4, p. 145-149, 2009.

ENNAHAR, S. SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis. Structure and activity. **FEMS Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 85-106, 2000.

FLYTHE, M. D.; RUSSELL, J. B. The effect of pH and a bacteriocin (bovicin HC5) on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acid in ensiled plant material. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, p. 215-222, 2004.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MSCWEENEY, P. L. H. Fundamentals of cheese science. Massachusetts: Kluwer Academic, 2000.

GALLO, L. I.; PILOSOFF, A. M. R.; JAGUS, R. J. Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. **Food Control**, v. 18, p. 1086-1092, 2007.

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

GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; CANN, I. K. O.; MARTIN, S. E.; LEGARRETA, I. G.; REGALADO, C. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, p. 670-680, 2008.

HOOVER, D. G.; HARLANDER S. K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In: HOOVER, D. G.; STEENSON, L. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology**, p. 23-29, 1993.

HOULIHAN, A. J.; MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Effect of pH on the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p.27-32, 2004.

HOULIHAN, A. J.; RUSSELL, J. B. Factors affecting the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5: release, stability and binding to target bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 168-174, 2006.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WEIDMANN, M.; BOOR, K. J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, 2004.

KAISER, A. L.; MONTVILLE, T. J. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4529-4535, 1996.

KAMAT, A. S.; NAIR, P. M. Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation of *Listeria monocytogenes* by some meat processing treatment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 29, p. 714-720, 1996.

KIM, E. L.; CHOI, N. H.; VIVEK, K. B.; KANG, S. C. Synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Chemistry**, v. 110, p. 375-382, 2008.

KOZÁKOVÁ, D.; HOLUBOVÁ, J.; PLOCKOVÁ, M.; CHUMCHALOVÁ, J.; CRUDA, L. Impedance measurement of growth of lactic acid bacteria in presence of nisin and lysozyme. **European Food Research and Technology**, v. 221, p. 774-778, 2005.

LADO, B. H.; YOUSEF, A. E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 433-440, 2002.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1-3, p. 181-186, 2000.

MADUREIRA, A. R. A bioconservação na indústria dos laticínios. **Segurança e Qualidade Alimentar**, v. 4, p. 30-32, 2008.

MAGNUSSON, J.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1-5, 2001.

MANTOVANI, H. C. **Bacteriocin production and resistance in *Streptococcus bovis***. Ithaca, NY: Cornell University. Philosophy Doctor. 142 p., 2002.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HC5, catalyzes the efflux of intracellular potassium but not ATP. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2247-2249, 2008.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 77-83, 2003.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 808-813, 2001.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. The ability of bacteriocin of *Streptococcus bovis* HC5 (bovicin HC5) to inhibit *Clostridium aminophilum*, an obligate amino acid fermenting bacteria from the rumen. **Anaerobe**, v. 8, p. 247-252, 2002.

MANTOVANI, H.C.; HU, H.; WOROBO, R.W.; RUSSELL, J.B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**, v. 148, p. 3347–3352, 2002.

MÁRQUEZ, J. G.; ROJAS, C. E. G. Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 27, n. 2, p. 108-111, 2007. Disponível em <http://www.scielo.org.ve>

MARTÍNEZ, B.; BRAVO, D.; RODRÍGUEZ, A. Consequences of the development of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* in fermented dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 11, p. 2383–2388, 2005.

MAUBOIS, J. L.; MOCQUOT, G. Application of membrane ultrafiltration to preparation of various types of cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 7, p. 1001-1007, 1975.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P. A.; Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 213-216, 2004.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of food**. 4th, American Public Health Association, cap. 7, p.63-67, 2001.

NALDINI, M. C. M.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y.; Behaviour of *Listeria monocytogenes* inoculated into Minas Frescal cheese made by direct acidification or lactic culture during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p. 361-365, 2009.

NASCIMENTO, M. S.; FINATTI, D. P.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Atividade antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subs. *Lactis* ATCC 11454 produtor de nisina sobre patógenos gram-positivos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 4, p. 322-328, 2008a.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008b.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL, C. Potential bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvement in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, p. 593-604, 2002.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 465-499, 2003.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M. Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial. Qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 83, p.63-70, 2001.

PESCHEL, A.; OTTO, M.; JACK, R. W.; KALBACHER, H.; JUNG, G.; GOTZ, F. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins and other antimicrobial peptides, **Journal of Biological Chemistry** , v. 274, p. 8405–8410, 1999.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 340-352, 2005.

PLOCKOVA, M.; STEPANEK, M.; DEMNEROVA, K.; CURDA, L.; SVIRAKOVA, E. Effect of nisin for improvement in shelf life and quality of processed cheese. **Advances in Food Science**, v. 18, p. 78-83, 1996.

PORTOCARRERO, S. M.; NEWMAN, M.; MIKEL, B. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. **Meat Science**, v. 62, p. 267-273, 2002.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. **Biochimie**, v. 84, p. 357-364, 2002a.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin: evolution, ecology and application. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 117-137, 2002b.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M.S. Detecting the enterogenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Microbiology**., v.28, p.946-950, 1974.

ROBERTS, R. F.; ZOTTOLA, E. A. Shelf-life of pasteurized process cheese spreads made from cheddar cheese manufactured with a nisin producing starter culture. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1829-1836, 1993.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

RODRIGUEZ, E.; ARQUEZ, J. L.; GAYA, P.; TOMILO, J.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. **Milchwissenschaft**, v. 55, p. 633-635, 2000.

RODRIGUEZ, J. M.; MARTINEZ, M. I.; KOK, J. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bactericin from lactic acid bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 91-121, 2002.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C.; Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 3-16, 2002.

ROZAND, C. V.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y. *et al.* Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 271-280, 1996.

SCHLIEVERT, P. M.; JABLONSKI, M. R.; SADLER, I.; CALLANTINE, S.; MITCHELL, D. T.; OHLENDORF, D. H.; BOHACH, G. A. Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. **Infection Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3630–3634, 2000.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 241–248, 2003.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 329-343, 2008.

SOUZA, A. M. R. **Atividade das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento e a resistência térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em sucos de frutas**. 2008a. 64p. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola]. Universidade Federal de Viçosa.

SOUZA, T. B.; CRUZ, A. G.; MOURA, M. R. L.; VIEIRA, A. C. M.; SANT'ANA, A.S. Microscopic quality indicators of Minas frescal cheese. **Food Control**, v.19, p. 71-75, 2008b.

STEIN, T.; HEINZMANN, S.; DUSTERHAUS, S.; BORCHERT, S.; ENTIAN, K. D. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes *spaIFEG* in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1009. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 3, p. 822-828, 2005.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 1-29, 1997.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria, **Bacteriology Review**, v. 40, p. 722-756, 1976.

THOMAS, L. V.; CLARKSON, M. R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: Naidu, A. S. (Ed.), Natural food antimicrobial systems. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 463-524, 2000.

TRANter, H. S. Foodborne illness: Foodborne staphylococcal illness. **Lancet**, v. 336, p. 1044-1046, 1996.

U.S. Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service. Dairy: World Markets and Trade. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/currwmt.asp>. Acessado em 19/12/2009.

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.

VESSONI PENA, T. C.; JOZALA, A. F.; NOVAES, L. C. L., PESSOA JR., A.; CHOLEWA, O. Production of nisin by *Lactococcus lactis* in media with skimmed milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 619-637, 2005.

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 349–356, 2004.

XAVIER, B. M.; RUSSELL, J. B. The ability of non-bacteriocin producing *Streptococcus bovis* strain to bind and transfer bovicin HC% to other sensitive bacteria. **Anaerobe**, v. 15, p. 168-172, 2009.