

PAULA MENDONÇA MORAES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS
DE LEITE CRU E QUEIJO, E PESQUISA DE GENES DE BACTERIOCINAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

PAULA MENDONÇA MORAES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS
DE LEITE CRU E QUEIJO, E PESQUISA DE GENES DE BACTERIOCINAS**

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

APROVADA: 16 de fevereiro de 2011.

Profa. Bernadette Dora Gombossy
de Melo Franco

Prof. Abelardo Silva Jr.

Prof. Luís Augusto Nero
Orientador

Senda de Perfeição
“Quem move as mãos no serviço,
Foge à treva e à tentação.
Trabalho de cada dia
É senda de perfeição.”

Meimei

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a vida; pela sabedoria nas pequenas coisas, e por me proporcionar esta e tantas outras oportunidades enriquecedoras.

Aos meus pais; por toda a força que me deram, por terem acreditado nos meus sonhos, e se esforçado para entender e participar da minha pesquisa. Em especial ao meu pai, que sempre me ensinou o valor do trabalho, do dinheiro e principalmente da família. A todos os membros da caravana, que seguiu durante todos esses anos para Viçosa.

Ao Gustavo, meu companheiro; que apesar da distância esteve sempre presente me ajudando não só nessa, mas em tantas outras jornadas.

Agradeço ao meu mais que orientador, professor Nero; por ter sido sempre um exemplo de dedicação à pesquisa e profissionalismo, por ter estado sempre à disposição quando precisei, por todos os conselhos, idéias e longas conversas, e principalmente pela confiança que sempre depositou em mim desde a minha iniciação científica e durante todo o mestrado.

Ao professor Abelardo, meu co-orientador extraoficial; por todas as horas que passamos juntos discutindo o experimento, analisando sequências e montando árvores.

À professora Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, pela participação fundamental na minha banca, e pela contribuição com idéias e sugestões sempre pertinentes.

Aos meus co-orientadores, professora Cidinha e Paulinho; por deixarem sempre a porta das suas salas abertas, pela disposição para conversas e por me ajudarem com minhas dúvidas.

Aos professores que mesmo que indiretamente colaboraram muito com meu experimento: Às professoras Elza e Denise; por me ensinarem muito além da disciplina, e por terem me despertado para novas metodologias e horizontes na pesquisa.

À gentileza e solicitude de diversos professores como: Elaine de Martinis pela semana de treinamento na FCFRP-USP e por fornecer controles para ensaios de inibição e PCR; Philip Wescombe pelas trocas de e-mails, por fornecer seu artigo não publicado e controles para PCR de lantibióticos; e Charles Franz por fornecer os oligonucleotídeos e controles positivos para PCR de enterocinas.

Aos colegas do laboratório de inspeção: em especial, Luana, Michelle, Gabi, Japa, Rodrigo, Mococa, Newton e Carol; por todos os momentos de descontração, pela companhia durante os ciclos intermináveis do PCR e das extrações de DNA, por terem feito esses dois anos passarem muito mais rápido e, claro, deixando muitas saudades... Um agradecimento especial ao Japa e à Michelle, sem dúvida meus melhores amigos em Viçosa, e ao Japa por me ajudar com as finalizações da dissertação.

Aos funcionários da Preventiva: Marquinhos, Élcio, Batalha, Ademir e principalmente o Dagô e o Luiz; por estarem sempre dispostos a me ajudar, autoclavando, preparando meios e soluções, e principalmente pelo carinho e pelas conversas. E à Rosi, pela eficiência e preocupação com os alunos.

Aos meus amigos de longe; Marília, Vinicius, Filipe, Priscila, Dani e Júlia, pela troca de experiências e por todas as conversas que me auxiliaram muito nesse período.

À tantos outros não mencionados; pela ajuda e inspirações, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES; pelo financiamento do projeto e bolsa de mestrado.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1. Bacteriocinas	2
2. BAL e produção de bacteriocinas.....	5
2.1 <i>Bacteriocinas produzidas por Lactococcus spp.</i>	6
2.2 <i>Bacteriocinas produzidas por Enterococcus spp.</i>	9
2.3 <i>Bacteriocinas produzidas por Lactobacillus spp.</i>	11
2.4 <i>Bacteriocinas produzidas por outras BAL</i>	12
3. Metodologias para detecção de bacteriocinas.....	13
4. Aplicação de BAL e bacteriocinas em alimentos.....	16
OBJETIVOS	19
Objetivo geral.....	19
Objetivos específicos.....	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
1. Identificação de BAL.....	20
1.1 <i>Microrganismos utilizados no estudo</i>	20
1.2 <i>Identificação molecular</i>	20
1.2.1. Extração de material genético	20
1.2.2. Sequenciamento 16S rDNA.....	21
1.2.3. Reação em cadeia da polimerase	22
1.3 <i>Identificação da natureza bacteriocinogênica dos isolados de BAL</i>	23
2. Pesquisa de genes associados à produção lantibióticos e bacteriocinas	25
3. Sequenciamento parcial do gene da nisina	28
4. Pesquisa de fatores de virulência de <i>Enterococcus spp.</i>	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
1. Identificação molecular.....	30
2. Identificação da natureza bacteriocinogênica dos isolados de BAL	32

3. Pesquisa de genes associados à produção de bacteriocinas	34
4. Sequenciamento de gene estrutural de nisina	43
5. Fatores de patogenicidade de <i>Enterococcus</i> spp.....	45
6. Análise geral dos resultados	49
CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
RESULTADOS DETALHADOS	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura da nisina e suas variantes. Comparação de variantes de nisina, estrutura da nisina A, os aminoácidos incomuns estão em cinza, e os resíduos que diferem da nisina A nas outras variantes em preto (Piper et al., 2010).....8
- Figura 2: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para identificação de espécies específicas de bactérias ácido lácticas. As figuras A, B, C e D referem-se respectivamente a amplificação de genes específicos para detecção de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, e *Enterococcus faecalis*. Em cada figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, P corresponde ao controle positivo, e os números (1-8) correspondem a isolados testados. 31
- Figura 3: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para detecção de genes de lantibióticos, de acordo com Wirawan et al (2006) e Hyink et al (2005). As figuras A, B e C referem-se respectivamente a amplificação dos genes *lanB*, *lanC*, e *lanM*. Em cada figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, P corresponde ao controle positivo, e os números (1-6) correspondem a isolados testados. 36
- Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para detecção de gene de nisina. As figuras A, B e C referem-se respectivamente a amplificação de nisina de acordo com García-Almendárez et al (2008), Rodríguez et al (1995), e Espeche et al (2009). Em cada figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, P corresponde ao controle positivo, e os números (1-6) correspondem à isolados testados. 39
- Figura 5: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para detecção de gene de lactinas. As figuras A e B referem-se respectivamente a amplificação de lacticina 3147 e lacticina 481. Em cada figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, P corresponde ao controle positivo, e os números (1-4) correspondem a isolados testados. 40
- Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para detecção de gene de enterocinas, de acordo com protocolo descrito por DuToit et al (2001). As figuras A, B, C, D e E referem-se respectivamente a amplificação de enterocina A, enterocina B, enterocina L50A e B, enterocina AS48 e enterocina P. Em cada figura, M corresponde

ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, P corresponde ao controle positivo, e os números (1-9) correspondem a isolados testados.	42
Figura 7: Agrupamento de sequências de aminoácidos de nisina deduzidos a partir do sequenciamento da região codificadora de nisina de 10 isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite e queijo. Ref corresponde a sequência padrão depositada no GeneBank (número de acesso: L16226.1) utilizada para comparação; os aminoácidos marcados em cinza apresentaram variação em relação à sequência padrão e os aminoácidos sublinhados são essenciais para a formação dos anéis de lantionina.	44
Figura 8: Resultados obtidos de isolados identificados como <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de leite cru e queijo frescal em testes fenotípicos para detecção de expressão de fatores de patogenicidade. A) Atividade desoxiribonucleásica; B) Atividade lipolítica; C) Produção de gelatinase; D) Hemólise em ágar sangue de cavalo. Os números (1-14) correspondem a isolados testados, cujas culturas foram semeadas pontualmente nos meios de cultura específicos para cada teste.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e posterior sequenciamento completo do gene 16S rDNA (Sterr et al 2009) em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo frescoal.	22
Tabela 2: Pares de oligonucleotídeos e condições de reações de PCR para identificação de algumas espécies de bactérias ácido lácticas nos isolados obtidos de leite cru e queijo frescoal.....	24
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados em reações de PCR para detecção de genes associados à produção de lantibióticos em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite e queijo frescoal.....	25
Tabela 4: Oligonucleotídeos e condições de reação de PCR utilizadas para identificação de genes de bacteriocinas em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo frescoal.....	27
Tabela 5: Frequências de gêneros e espécies de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo frescoal identificadas por técnicas moleculares (sequenciamento 16S rDNA e PCR).	30
Tabela 6: Sensibilidade a proteases de substâncias antimicrobianas produzidas por isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo frescoal (adaptado de Perin, 2011).....	33
Tabela 7: Frequências de resultados positivos para os genes de lantibióticos <i>lanB</i> , <i>lanC</i> e <i>lanM</i> obtidas por PCR em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo frescoal.....	35
Tabela 8: Frequências de resultados positivos para de genes de nisina obtidos por reações de PCR baseadas em 3 protocolos distintos em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo frescoal.	38
Tabela 9: Frequências de resultados positivos para genes de enterocinas obtidos por PCR em isolados de bactérias ácido lácticas identificados como <i>Enterococcus</i> spp. e obtidos de leite cru e queijo frescoal.	42
Tabela 10: Frequências de resultados positivos em testes fenotípicos para identificação de expressão de fatores de virulência por isolados identificados como <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de leite cru e queijo frescoal.....	48

Tabela 12: Resultados de avaliação da sensibilidade enzimática das substâncias antimicrobianas produzidas pelos isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo fresco (adaptado de Perin, 2011).	68
Tabela 13: Apresentação de todos os resultados genotípicos obtidos com as 101 isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo fresco: identificação molecular e presença de genes de lantibióticos (lanB,C e M) e de nisina de acordo com 3 protocolos, nisina 1 (Rodriguez et al, 2000), nisina 2 (García-Almendárez et al, 2008), e nisina 3 (multiplex adaptado de Espeche et al, 2009).....	71
Tabela 14: Apresentação dos resultados genotípicos quanto à presença de genes de enterocinas nos 43 isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo fresco.....	74
Tabela 15: Resultados de avaliação da sensibilidade a proteases das substâncias antimicrobianas produzidas pelos 101 isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo fresco, presença de genes de bacteriocinas e produção de fatores de patogenicidade em <i>Enterococcus</i> spp.	75

RESUMO

MORAES, Paula Mendonça, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo, e pesquisa de genes de bacteriocinas.** Orientador: Luís Augusto Nero. Co-orientadores: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira e Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Considerando a importância das bactérias ácido lácticas (BAL) como bioconservantes, devido a seu potencial inibidor de patógenos e microrganismos deteriorantes, o objetivo deste trabalho foi identificar por metodologias moleculares isolados desse grupo obtidos de leite cru e queijo frescal, e realizar um estudo detalhado quanto a presença de diversos genes de bacteriocinas. Foram utilizados 101 isolados de BAL previamente caracterizados como antagonistas contra *Listeria monocytogenes*. Todas as BAL foram submetidas à sequenciamento do gene 16S rDNA para identificação. Considerando os resultados obtidos, genes de bacteriocinas produzidas pelos diferentes gêneros identificados foram pesquisados. Alguns isolados identificados como *Lactococcus* spp. (10) foram selecionados considerando os resultados de atividade antimicrobiana e presença de genes de nisina, e submetidos ao seqüenciamento e tradução desses genes para comparação as demais sequencias traduzidas. Os isolados do gênero *Enterococcus* spp. foram submetidos à análises fenotípicas de alguns fatores de patogenicidade. Considerando os resultados obtidos, os gêneros identificados foram principalmente *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*. Grande parte dos isolados (80%) apresentou genes para produção de ao menos uma bacteriocina, sendo mais comuns resultados positivos para lantibióticos, e especificamente para nisina e enterocina P. Na análise das seqüências traduzidas de nisina, foram observadas duas variações: substituição da histidina por asparagina (posição 27) em dois isolados (alteração típica da nisina Z), e substituição da histidina por uma treonina (posição 31) em três isolados (variação ainda não descrita). Quanto aos fatores de patogenicidade de *Enterococcus* spp., apenas hemólise incompleta em ágar sangue de cavalo e produção de gelatinase foram observadas em 23 e 11 isolados, respectivamente. Considerando os resultados obtidos, os isolados avaliados apresentam grande potencial como bioconservadores em alimentos, especialmente os isolados do gênero *Lactococcus* carreadores de genes responsáveis por produção de variantes da nisina não descritos na literatura.

ABSTRACT

MORAES, Paula Mendonça, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Molecular identification of lactic acid bacteria isolated from raw milk and cheese, and detection of bacteriocin genes.** Adviser: Luís Augusto Nero. Co-Advisers: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira and Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Considering the importance of the lactic acid bacteria (LAB) as biopreservatives, and their inhibitory potential against pathogens and spoilage microorganisms, the aim of this study was identify using molecular methodologies LAB isolates obtained from raw milk and soft cheese, and to conduct a detailed study about the presence of bacteriocin codifying genes. There were utilized 101 LAB isolates previously characterized as antagonist against *Listeria monocytogenes*. All LAB were submitted to 16S rDNA sequencing. Considering identified genera, specific bacteriocin codifying genes were analysed. Based on their antimicrobial activity and presence of nisin genes, 10 *Lactococcus* spp. isolates were selected and submitted to nisin codifying gene sequencing and translation, for further comparison of predicted proteins. *Enterococcus* spp. were submitted to phenotypic evaluation of pathogenicity factors. Considering the 16S rDNA sequencing, the most frequent genera obtained were *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*. Most of the analysed isolates (80%) presented at least one bacteriocin codifying gene, being the lantibiotics the most frequent, followed by nisin and enterocin P. Concerning the translated sequences of nisin codifying gene, two variations were observed: substitution of histidine for asparagine (position 27) in two cultures, typical of nisin Z variation, and the substitution of an histidine for threonine (position 31) in three cultures, a nisin variation not described until now. Concerning the *Enterococcus* spp. pathogenicity factors, only incomplete haemolysis in horse blood agar and gelatinase production were observed in 23 e 11 isolates, respectively. In conclusion, the evaluated cultures presented great potential to be used as biopreservatives in food, specially the genera *Lactococcus* wich carry the nisin variants codifying genes not described yet in the literature.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente existe uma necessidade de suprir uma demanda da indústria de alimentos por novas cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) para utilização como *starters* e bioconservantes em alimentos. Considerando esse crescente nicho de mercado e a importância das BAL, o projeto desenvolvido durante essa dissertação de mestrado teve como objetivo identificar por metodologias moleculares isolados desse grupo obtidos de leite cru e queijo frescal, e realizar um estudo detalhado quanto à presença de diversos genes de bacteriocinas. As BAL utilizadas neste estudo foram isoladas em experimentos previamente desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, e apresentaram atividade antagonista específica contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, além de confirmada natureza protéica da substância antimicrobiana produzida, evidenciando o potencial bacteriocinogênico. Considerando as limitações dos testes bioquímicos, foi proposta a utilização de técnicas moleculares para a identificação precisa de microrganismos do grupo das BAL, como sequenciamento de genes conservados e PCR espécie-específicos. Além da identificação, estudos de antagonismo microbiano demandam a pesquisa de genes de bacteriocinas conhecidas, como a nisina e algumas enterocinas, procurando identificar possíveis fatores de diferenciação com cepas já conhecidas e utilizadas pelas indústrias de alimentos. Para utilização em alimentos, as BAL ainda necessitam ser consideradas seguras, o que determina a necessidade de pesquisas fenotípicas e genotípicas de alguns fatores de patogenicidade, como hemolisinas e gelatinase, principalmente em isolados identificados como *Enterococcus*, um gênero de BAL comensal do trato gastrointestinal comumente associado a infecções oportunistas em humanos. Uma característica marcante das bacteriocinas aplicadas em alimentos é o diferente perfil de sensibilidade a proteases, que interfere com sua atividade no alimento e garante degradação ao ser ingerida pelo consumidor. Ao elucidar essas questões, esse trabalho impulsiona as pesquisas para o estudo da aplicação de algumas dessas BAL em alimentos. Ainda, verifica a possível presença de variações em genes codificadores de bacteriocinas conhecidas, e genes de nisina em gêneros incomuns de BAL, o que levanta questionamentos sobre os gatilhos que controlam a expressão e transferência desses genes, localizados em transposons conjugativos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Bacteriocinas

Os microrganismos são capazes de produzir diferentes substâncias como mecanismo de defesa, como antibióticos, ácidos, agentes líticos como a lisozima, diversas exotoxinas, e bacteriocinas. Bacteriocinas são definidas como compostos protéicos excretados para o meio extracelular, onde interferem na multiplicação de outras bactérias, geralmente filogeneticamente relacionadas e cuja célula produtora apresenta um mecanismo específico de resistência contra a bacteriocina produzida (Chen e Hoover 2003; Cotter et al., 2005; Riley e Wertz, 2002), o que as diferencia dos antibióticos. As bacteriocinas diferem dos antibióticos de uso clínico em várias características, como forma de síntese, atuação e espectro de ação. As bacteriocinas são proteínas sintetizadas ribossomalmente, apresentam um espectro de ação restrito a bactérias filogeneticamente relacionadas, resistência da célula produtora associada a mudanças na membrana celular e atuação na célula alvo através da formação de poros na membrana (Arauz et al., 2009; Cleveland et al., 2001). Já os antibióticos são metabolitos secundários do metabolismo de bactérias e fungos, possuem um espectro de ação amplo, a resistência de alguns organismos está relacionada à transferência de genes que promovem alterações em diferentes sítios dependendo do seu modo de ação, e podem atuar tanto na membrana celular quanto em alvos intracelulares, através da inibição da formação de DNA, RNA, síntese protéica, formação de membrana e parede bacteriana (Cleveland et al., 2001). As células produtoras de bacteriocinas são imunes às essas substâncias antimicrobianas produzidas por meio da produção de proteínas específicas para essa finalidade que estão presentes no mesmo operon da bacteriocina (McAuliffe et al., 2001; Arauz et al., 2009).

Os microrganismos Gram negativos produzem uma grande variedade de bacteriocinas, que são nomeadas de acordo com o gênero ou espécie do microrganismo produtor, como as klebsinas produzidas pela *Klebsiella pneumoniae*, colicinas produzidas por *Escherichia coli*, marcescinas produzidas por *Serratia marcescens*, alveicitina produzida por *Hafnia alvei* (Riley e Wertz, 2002). As colicinas são as bacteriocinas mais estudadas de Gram negativos, e as primeiras bacteriocinas descobertas (Cotter et al., 2005). Os genes de colicinas estão localizados em plasmídeos, sendo que existe uma grande variedade de colicinas que são detectadas

em alta frequência em populações de *E. coli* (Riley e Wertz, 2002). Os operons de colicinas são compostos do gene da própria colicina, do gene relacionado a uma proteína que confere imunidade à cepa produtora, e do gene responsável pela excreção da bacteriocina para o meio extracelular (Riley e Wertz, 2002). As colicinas atuam na célula alvo por meio da formação de poros na membrana plasmática, promovendo despolarização da membrana, e, além disso, algumas colicinas possuem em sua estrutura um domínio com atividade endonuclease, capaz de romper cadeias de DNA e RNA. As colicinas são bacteriocinas grandes, variando de 449-629 aminoácidos, no caso das formadoras de poros, e de 178-777 aminoácidos, naquelas com atividade de endonuclease (Riley e Wertz, 2002). Geralmente durante a liberação da colicina ocorre lise da célula produtora (indução SOS), o que pode ser explicado por duas teorias: 1) o plasmídeo funcionaria como um “parasita” da célula produtora, que é liberado para o meio com a lise da célula; 2) as células só produzem a colicina em condições extremas, e esta seria uma forma de “sacrifício” para proteger as bactérias da mesma linhagem (Riley e Wertz, 2002).

As bactérias ácido lácticas (BAL) compõem o principal grupo de microrganismos Gram positivos produtores de bacteriocinas, sendo alvos de diversas pesquisas devido ao seu potencial de aplicação em alimentos, ao interesse comercial para identificação de novas culturas *starter* e à capacidade de auxiliar na segurança microbiológica por meio das diversas substâncias antimicrobianas produzidas, além das bacteriocinas. As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas são classicamente agrupadas de acordo com Klaenhammer (1993) em três classes: classe I, composta dos lantibióticos; classe II, composta de pequenos peptídeos termo-resistentes que não contém lantionina; e finalmente classe III, composta de proteínas grandes e termo-sensíveis. Os genes responsáveis pela produção de bacteriocinas estão organizados em operons, que podem estar localizados tanto no cromossomo bacteriano, quanto em plasmídeos e transposons (Chen e Hoover, 2003; Deegan et al., 2006; Gálvez et al., 2007).

A classe I, também denominada de lantibióticos, corresponde a bacteriocinas que contém o aminoácido incomum lantionina, o qual é formado após extensas mudanças pós traducionais nos pré-peptídeos. Estas transformações incluem formação de aminoácidos que não são usualmente encontrados na natureza, como os aminoácidos do grupo tioéter lantionina (Lan) e metil lantionina (MeLan), e ainda uma série de modificações na estrutura de outros aminoácidos, levando a formação de, por

exemplo, 2,3-dihidroalanina (Dha) e 2,3-dihidrobutirina (Dhb) (Jack et al., 1995). A lantionina é formada quando ligações duplas da Dha reagem com um grupo tiol de uma cisteína vizinha, enquanto a metil-lantionina é formada quando essa reação ocorre com uma Dhb. Como consequência destas ligações entre os aminoácidos, os lantibióticos são estruturas policíclicas, contendo vários anéis de lantionina, responsáveis pela estabilidade da molécula, resistência à degradação por proteases e ao tratamento térmico (McAuliffe et al 2001). Dentro da classe I ainda há outra subdivisão: Ia e Ib. A subclasse Ia inclui peptídeos longos, flexíveis e com carga positiva, e levam à destruição dos microrganismos sensíveis por meio de ligação e formação de poros na membrana citoplasmática. A subclasse Ib é composta por peptídeos globulares, mais rígidos, únicos ou em 2 componentes, que atuam nos microrganismos sensíveis interferindo em suas reações enzimáticas, como a inibição da fosfolipase A2 e síntese de peptídeoglicanos, além de formação de poros na membrana do microrganismo sensível (Deegan et al., 2006; McAuliffe et al 2001).

A produção de lantibióticos segue a seguinte sequência: formação do pré-peptídeo, alterações pós-traducionais que levam a formação dos aminoácidos incomuns, clivagem da sequência leader e secreção do peptídeo. Além disso, a cultura produtora deve ser imune à bacteriocina produzida, o que é obtido por meio da produção de uma proteína que confere resistência (McAuliffe et al 2001). A comparação entre os clusters de genes de vários lantibióticos revela semelhanças entre estes, que possuem os mesmos genes conservados relacionados às seguintes funções: formação do pré-peptídeo (*lanA*), enzimas responsáveis pelas mudanças pós-traducionais (*lanB,C* ou *lanM*), proteínas acessórias relacionadas à remoção do peptídeo leader (*lanP*), família de transportadores ABC envolvidas na translocação do peptídeo (*lanT*), proteínas regulatórias (*lanR,K*) e mecanismos de proteção (*lanI,FEG*). A proteína codificada pelo gene *lanB* possui aproximadamente 100 aminoácidos, e é responsável pela formação de lantionina em alguns sítios do pré-peptídeo, sendo necessária atuação conjunta com *lanC* para que todas as mudanças necessárias sejam conduzidas no pré-peptídeo. A proteína codificada pelo gene *lanC* tem tamanho que varia de 398-455 aminoácidos, e possui vários motivos conservados que se repetem em diversas bacteriocinas. Aparentemente, LanB, LanC e LanT formam um complexo associado a membrana plasmática responsável pela maturação e excreção da bacteriocina. Em algumas bacteriocinas os genes *lanB* e *lanC* não são observados, sendo substituídos pelo gene

lanM. A proteína codificada por este gene possui de 900 a 1000 aminoácidos e realiza todas as transformações promovidas por LanB e LanC (MacAuliffe et al 2001).

As bacteriocinas da classe II são pequenos peptídeos, peso molecular inferior a 10 kDa, termo-estáveis, que não contém lantionina, ou seja, não passam por mudanças pós-traducionais. Este grupo abriga a maior variedade de bacteriocinas já descritas na literatura, e é subdividido em IIa, IIb e IIc. Na subclasse IIa estão os peptídeos ativos principalmente contra *Listeria monocytogenes*, sendo denominados de “pediocin-like” (semelhantes a pediocina), que possuem um motivo conservado na extremidade amino-terminal denominada de “pediocin-box” (YGNGVXCXXXXVXV, onde X equivale a qualquer aminoácido), que parece estar associado à atividade anti-listeria (Cotter et al 2005). Primeiramente os pré-peptídeos são sintetizados com uma sequência *leader* na extremidade amino-terminal (do tipo dupla glicina), que é clivada durante a translocação da bacteriocina, a qual é secretada da célula por meio de transportadores específicos (Cintas et al., 1997). Na subclasse IIb estão agrupadas as bacteriocinas compostas de dois peptídeos que atuam em conjunto, de forma sinérgica ou potencializadora (Chen e Hoover, 2003). Por fim, a classe IIc agrupa pequenos peptídeos cujas extremidades carbóxi e aminoterminal estão ligadas covalentemente, formando estruturas circulares (Cotter et al., 2005).

A classe III é composta por grandes peptídeos termo estáveis com peso molecular superior a 30 kDa, também denominadas bacteriolisinas, que contém em sua estrutura molecular regiões específicas com diferentes funções, para translocação, receptores de ligação e atividade letal. Ao contrário das classes I e II, as bacteriocinas desta classe atuam por meio da hidrólise da parede celular bacteriana (Cotter et al., 2005).

A classe IV consiste de complexos protéicos associados a moléculas de carboidratos e lipídeos. Entretanto, essa classe ainda não foi bem caracterizada (Chen e Hoover, 2003).

2. BAL e produção de bacteriocinas

BAL possuem grande importância na indústria de alimentos devido a sua atividade fermentadora, probiótica e atuação como deteriorantes e bioconservadoras (de Martinis et al., 2003). Esses microrganismos são utilizados como culturas *starters*, promovendo transformações nas matérias-primas por meio da produção de ácidos e

outras substâncias, originando os produtos fermentados (Cotter et al., 2005; Ross et al., 2002). Entretanto, esse grupo também pode determinar a deterioração precoce dos alimentos, pela produção de ácidos e substâncias proteolíticas (Galia et al., 2009). Várias BAL ainda apresentam potencial de aplicação em alimentos por possuírem atividade antagonista contra diversos microrganismos deteriorantes e patógenos, por meio da produção de metabólitos ativos com propriedades antimicrobianas, como ácidos orgânicos (principalmente láctico e acético), peróxido de hidrogênio, CO₂, diacetil e bacteriocinas (Deegan et al., 2006). São observadas freqüências elevadas de BAL capazes de produzir bacteriocinas (chamadas bacteriocinogênicas) em leite e derivados (Rodríguez et al., 2000). Um grande número de bacteriocinas produzidas por BAL já foram identificadas, apesar do seu potencial de aplicação ainda não ter sido totalmente explorado (Sobrino-López e Martín-Belloso, 2008). O uso de bacteriocinas purificadas como aditivos em alimentos demanda estudos aprofundados sobre sua toxicidade antes de liberação para aplicação em processos industriais. A nisina e a pediocina PA-1 são as únicas bacteriocinas exploradas comercialmente até hoje (Sobrino-López e Martín-Belloso, 2008). Uma alternativa muito utilizada pela indústria de alimentos é a aplicação de culturas bacteriocinogênicas em seus produtos, visando obter os mesmos objetivos finais: controle de patógenos e deteriorantes (Deegan et al., 2006).

2.1 Bacteriocinas produzidas por Lactococcus spp.

Lactococcus é um dos principais gêneros de BAL presente na microbiota do leite e derivados, sendo que as duas espécies mais comumente associadas a estes produtos são *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Esses microrganismos atingem facilmente concentrações de até 10⁸ UFC/g ou mL, mantendo sua população elevada até o final da maturação em queijos produzidos com leite cru, como o Camembert, Serra, Venaco e Pecorino (Casalta e Montel, 2008). *Lc. raffinolactis* e *Lc. garviae* também são isolados de leite cru e diversos tipos de queijos produzidos com essa matéria prima, porém em menor freqüência (Casalta e Montel, 2008). O principal papel destas bactérias na fabricação de derivados lácteos é a fermentação, que ocorre principalmente pela produção de ácido láctico. Entretanto, esse gênero também contribui para desenvolvimento de textura, pela produção de exopolissacarídeos, e

sabor, pelos processos de fermentação, lipólise e proteólise (Smit et al., 2005). Essas BAL promovem a bioconservação dos alimentos por meio da produção de ácidos e bacteriocinas, sendo a nisina a melhor caracterizada e mais utilizada (Cotter et al., 2005; Chen e Hoover, 2003, Sobrino-López e Martín-Belloso, 2008).

A nisina é um peptídeo composto de 34 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de 3,5 kDa e classificada como uma bacteriocina pertencente a classe Ia, ou seja, um lantibiótico. Esta bacteriocina é produzida por cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, sendo que existem as variações de nisina A, F, Q, U, U₂ e Z (Pieper et al., 2010). Esta bacteriocina possui amplo espectro de ação principalmente contra Gram positivos, como *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp., e esporos de *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. (Sobrino-Lopez e Martín-Belloso, 2008). A nisina também pode exercer inibição contra Gram negativos quando combinada a outros tratamentos que alterem a permeabilidade de membrana plasmática, como EDTA, citrato, polifosfato de sódio e etanol (Galvez et al., 2007; Sobrino-Lopez e Martín-Belloso, 2008). Recentemente foram descobertas culturas de *Streptococcus uberis* e *Strep. agalactie* que produzem duas variantes de nisina denominadas de nisina U e U₂ (Wirawan et al 2006; Piper et al., 2010). Dentre as diversas bacteriocinas já isoladas e identificadas, somente a nisina é considerada segura (status GRAS - Generally Recognized as Safe) e utilizada comercialmente em indústrias de alimentos (Cotter et al., 2005; Chen e Hoover, 2003). Essa bacteriocina foi comercializada pela primeira vez na Inglaterra em 1953, e atualmente é aprovada como aditivo alimentar em mais de 50 países. Em 1983 foi adicionada na lista dos aditivos europeus e em 1988 foi aprovada pelo Food and Drug Administration nos Estados Unidos para o uso em queijos pasteurizados (Sobrino-Lopez e Martín-Belloso, 2008; Cotter et al., 2005; Chen e Hoover, 2003). No Brasil, foi aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para ser utilizada em todos os tipos de queijos, inclusive os processados, numa dose máxima de 12,5 mg/kg de produto (Brasil, 1996).

responsável pelas mudanças pós-traducionais nesta bacteriocina, ao contrário da maioria das outras que são processadas por LanB e C. O cluster de genes deste lantibiótico é um dos menores conhecidos, apenas 6 genes, *lctAEFGMT*, sendo que não há nenhum gene relacionado à regulação da expressão, indicando que esta é regulada em nível de transcrição (Hindré et al., 2004).

2.2 Bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* spp.

Enterococcus spp. são microrganismos comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais, sendo que algumas cepas possuem fatores de patogenicidade e resistência a antimicrobianos, sendo reconhecidas como patógenos oportunistas (de Vuyst et al., 2003). Microrganismos desse gênero podem atuar como deteriorantes, porém também estão associados à maturação de alguns queijos, e algumas cepas são inclusive probióticas (de Vuyst et al., 2003; Franz et al., 2007). Várias cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de alimentos produzem bacteriocinas, que são denominadas de enterocinas, com atividade inibitória principalmente contra *L. monocytogenes* (Sobrino-López e Martín-Belloso, 2008). As enterocinas produzidas por *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. mundtii* incluem as bem caracterizadas enterocinas A, P, CRL35, 1071A e B, mundticina, mundticina KS, bacteriocina 31, RC714, T8 e enterolisina A (Franz et al., 2007), sendo que a maioria destas bacteriocinas pertence a classe II (de Vuyst et al., 2003).

A única enterocina que pode ser classificada como lantibiótico é a citolisina, produzida por *E. faecalis*. A citolisina é uma bacteriocina composta por dois peptídeos, (classe Ib) ambos com lantionina, que atuam em conjunto, de forma sinérgica (Cotter et al., 2005; Booth et al., 1996). Essa bacteriocina tem ação contra bactérias Gram positivas e células eucarióticas. A citolisina promove hemólise, e por este motivo também é classificada como um fator de virulência (Booth et al., 1996). Os genes relacionados com a produção desta bacteriocina estão localizados em um plasmídeo de 58kb (Franz et al., 2007).

As enterocinas A, B, P, L50A e L50B pertencem a classe II. A enterocina A é um peptídeo de 47 aminoácidos, com peso molecular de 4,8 kDa que pertence a classe IIa, e contém o motivo “pediocin-box” na extremidade amino-terminal. Trata-se de uma bacteriocina produzida por diversas cepas de *E. faecium* (Aymerich et al., 2003), e

muito semelhante à pediocina PA-1 (Franz et al., 2007). Essa bacteriocina é ativa contra outros *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. e *L. monocytogenes*. Essa enterocina possui uma sequência leader típica de proteínas secretadas por transportadores ABC (Aymerich et al., 2003; Franz et al., 2007). O operon desta enterocina possui cinco genes, *entAFKRD* (O’Keeffe et al., 1999).

A enterocina P pertence a classe IIa, é produzida por algumas cepas de *E. faecium*, e tem um espectro de ação amplo, atuando contra *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., além de *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* e *C. perfringens*, *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Franz et al., 2007; Cintas et al., 1997). Os genes responsáveis pela produção desta bacteriocina estão localizados no cromossomo bacteriano e codificam uma bacteriocina de 44 aminoácidos e 4,5 kDa, que possui o motivo “pediocin-box” na extremidade amino-terminal (Cintas et al., 1997).

A enterocina L50 é codificada por genes localizados em um plasmídeo de 50kb, sendo produzida por algumas cepas de *E. faecium* (Franz et al., 2007). Esta bacteriocina pertence a classe IIb, sendo constituída por dois peptídeos, L50A e L50B, com 44 e 43 aminoácidos, respectivamente, e o mesmo peso molecular de 5,2 kDa, que atuam em conjunto (Cintas et al 1998). Os peptídeos L50A e L50B apresentam 31 aminoácidos em comum, 72% de identidade, e apresentam atividade antimicrobiana contra *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus pentosaceus*, além de *B. cereus*, e *L. monocytogenes* (Cintas et al, 1998). Assim como as enterocinas Q e EJ97, a L50A e L50B não possuem o motivo “pediocin-box” e são sintetizados sem uma sequência leader, requerendo mecanismos de transporte diferenciados, e por estas razões não se encaixam completamente na classe II proposta por Klaenhammer (1993).

A enterocina B pertence à classe IIa, porém não contém o motivo “pediocin-box”. Ao contrário das outras enterocinas, os genes relacionados à resistência a esta bacteriocina não se localizam no mesmo operon, e sim na fita oposta de DNA, sendo que sua expressão é desencadeada por outra região promotora (Franz et al., 2000, 2007). Esta enterocina possui 53 aminoácidos e peso molecular de 5,5 kDa. Pela presença de um peptídeo sinal e ausência de genes relacionados ao transporte no operon desta bacteriocina, supõe-se que a enterocina B seja excretada pelas mesmas proteínas transportadoras da enterocina A (Franz et al., 2007). Assim como as outras

enterocinas, a enterocina B possui um amplo espectro de ação, atuando contra *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., além de *S. aureus*, *C. perfringens* e *L. monocytogenes* (Franz et al., 2007).

A enterocina AS-48 é uma bacteriocina cíclica, pertencente à classe IIc, sendo produzida por *E. faecalis* e *E. faecium*, e seus genes estão organizados em operons, *as-48ABC₁C₂D₁D₂EFGH*, localizados em plasmídeos. O pré-peptídeo é formado por 105 aminoácidos, sendo que 35 constituem o peptídeo sinal e 70 o peptídeo maduro (Martínez-Bueno et al., 1994). Acredita-se que mais de uma etapa de clivagem seja necessária para a retirada da sequência leader e circularização da molécula, ligação das extremidades carbóxi e amino-terminal (Franz et al., 2007). Já foi observada uma variante de enterocina AS-48, que difere da enterocina primeiramente relatada pela troca de um aminoácido, e pela presença do gene no cromossomo e não em plasmídeo (Abriouel et al., 2005).

2.3 Bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus spp. são microrganismos fastidiosos, que requerem ambientes ricos em nutrientes para desenvolvimento, nos quais fermentam carboidratos de forma homo ou heterofermentativa. Os ácidos produzidos durante a fermentação, assim como a queda do pH do meio proporcionam inibição a outros microrganismos, uma vez que são resistentes a ambientes ácidos (Klaenhammer et al., 1993). Cepas de *Lb. acidophilus* vem sendo utilizadas em substituição ao *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* (que é a espécie tradicionalmente utilizada na fabricação de iogurte, associada a *Strep. thermophilus*) com a vantagem de produzir bacteriocinas durante a fermentação (Heller, 2001). Dentre as espécies de *Lactobacillus*, *Lb. acidophilus* e *Lb. casei* são frequentemente utilizadas em derivados lácteos como probióticos, pela sua adaptação ao hospedeiro humano e capacidade de produzir diferentes bacteriocinas, característica que contribui para a colonização e proteção contra patógenos gastrintestinais (Avonts et al., 2004). Existem relativamente poucas informações a respeito da produção de bacteriocinas por cepas de *Lactobacillus*, em geral porque estas as espécies desse gênero não se multiplicam muito bem em leite em comparação com outras BAL (Avonts et al 2004). *Lactobacillus* spp. são muito pesquisados para utilização como probióticos e culturas *starters*, sendo que a maioria dos probióticos

utilizados comercialmente pertence a este gênero de BAL, e são usados principalmente em produtos lácteos (Giraffa et al., 2010).

Um exemplo de bacteriocina produzida por *Lactobacillus* é a reuterina, produzida por *Lb. reuteri* e capaz de inibir *L. monocytogenes*, *E. coli* alguns fungos e leveduras (Leroy e de Vuyst, 2004). Uma vantagem da reuterina em relação à nisina é que a eficácia desta bacteriocina não depende do teor de gordura do alimento (Sobrino-López e Martín-Belloso, 2008).

A plantaricina, bacteriocina produzida por *Lb. plantarum*, pertence à classe IIb, e é composta por dois peptídeos, que são sintetizados como um único pré-peptídeo e posteriormente clivados. A ação desta bacteriocina ocorre através da formação de poros na membrana de células sensíveis (Diep et al., 1993), e muitas variações desta bacteriocina já foram identificadas, como A, E, F, J, K e S (Garneau et al., 2002). As plantaricinas têm ação contra *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Carnobacterium* spp. (Garneau et al., 2002).

2.4 Bacteriocinas produzidas por outras BAL

Além de *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*, espécies pertencentes a outros gêneros do grupo das BAL também são potenciais produtores de bacteriocinas, com potencial para aplicação em alimentos e controle de agentes infecciosos. Alguns gêneros de BAL vêm sendo muito estudados devido à sua capacidade de produzir bacteriocinas com potencial de aplicação industrial, como *Pediococcus* e *Streptococcus*. Algumas das bacteriocinas produzidas por estes gêneros que merecem destaque são a pediocina, salivarina e bovicina.

A pediocina PA-1 é uma bacteriocina bastante estudada e produzida por *P. acidilactici*. Essa bacteriocina é um peptídeo de 44 aminoácidos, 4,6 kDa, pertencente à classe IIa de acordo com a classificação de Klaenhammer (1993), e é codificada por um plasmídeo que contém o operon responsável pela codificação desta bacteriocina, *pedABCD* (Rodriguez et al., 2002). A pediocina PA-1 resiste a vários tipos de tratamentos térmicos e ao congelamento, mantendo sua atividade por até 12 semanas, com pH de atuação entre 4 e 6, sendo que em pH 7 perde sua atividade antimicrobiana rapidamente (Rodriguez et al., 2002). Apresenta atividade inibitória contra vários microrganismos Gram positivos deteriorantes e principalmente contra *L.*

monocytogenes, entretanto, assim como a nisina, pode atuar em Gram negativos (como *Salmonella Typhimurium*, *E. coli*, *Serratia liquefaciens* e *Pseudomonas fluorescens*) caso sejam submetidos anteriormente a injúrias como congelamento, aquecimento, exposição a ácidos ou EDTA (Rodriguez et al., 2002). Assim como a nisina, a pediocina PA-1 é utilizada em alimentos sendo comercializada sob o nome de ALTA™ 2431 (Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Ireland) (Deegan et al., 2006).

Outra bacteriocina produzida por BAL com potencial de aplicação é um lantibiótico chamado salivaricina. Essa bacteriocina e suas variantes são produzidas por culturas de *Strep. salivarius*. O operon desta bacteriocina, *salABCKRTXY*, já foi identificado em cromossomo e em plasmídeos que podem ser transferidos para outras cepas de *Strep. salivarius* (Wescombe et al., 2006). A importância desta bacteriocina é seu potencial de uso como probiótico, prevenindo a colonização e infecção da cavidade oral por *Strep. pyogenes*, causador de infecções de garganta (Wescombe et al., 2006; Dierksen et al., 2007).

A bovicina HC5 é uma bacteriocina pertencente à classe dos lantibióticos produzida pela cepa de *Strep. bovis* HC5, isolada de conteúdo rumenal de bovino (Mantovani et al., 2002; Mantovani e Russel, 2008). Essa bacteriocina apresenta espectro de ação contra diversas BAL, como: *Streptococcus* spp., *E. faecalis*, *Clostridium* spp., *L. monocytogenes*, *Lactococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., além de inibir o desenvolvimento e esporulação de culturas de *B. cereus*, *C. thuringiensis* e *C. tyrobutyricum*. Inicialmente as pesquisas com esta bacteriocina visaram à substituição do antibiótico monensina, um aditivo usado na alimentação de ruminantes para controlar a fermentação no rúmem (Mantovani et al., 2002). Entretanto, devido ao amplo espectro de ação, pesquisas vêm sendo conduzidas visando à aplicação desta bacteriocina em alimentos (Carvalho et al., 2007).

3. Metodologias para detecção de bacteriocinas

As metodologias mais utilizadas para triagem inicial de culturas de BAL foram descritas na década de 1970, e são variações dos protocolos *spot-on-the-lawn* de Fleming et al (1975) e *well-diffusion-assay* de Tagg e McGiven (1971). Já foi observado que a técnica *spot-on-the-lawn* possui uma sensibilidade maior, sendo capaz de

detectar uma proporção maior de isolados com potencial antagonista do que a técnica de *well-diffusion-assay*. Nessa técnica a atividade antimicrobiana de isolados é avaliada após semeadura em caldos, incubação em diferentes condições, centrifugação da cultura obtida e obtenção de um sobrenadante que é filtrado, neutralizado e avaliado quanto à atividade inibitória. Porém, essa metodologia apresenta menor sensibilidade que protocolos que utilizam meios de cultura sólidos. Pela técnica de *well-diffusion-assay*, resultados positivos são mais freqüentes apenas com culturas que possuam grande potencial antagonista, e que apresentem grandes halos de inibição pela metodologia *spot-on-the-lawn* (Moraes et al., 2010). A técnica *spot-on-the-lawn* é mais simples e rápida, pode ser realizada simultaneamente com um grande número de culturas, e também permite a variação de condições de incubação, e meios de cultura (Moraes et al, 2010; Fleming et al, 1975; Lewus et al, 1991). Além da detecção de atividade antagonista, é necessário excluir a possibilidade de inibição pela produção de ácidos e peróxido de hidrogênio. A produção de ácidos pode ser minimizada pela utilização de meios de cultura com baixo teor de açúcares, como o Brain-Hearth-Infusion (BHI) e deMan-Rogosa-Sharpe modificado (mMRS) (Moraes et al., 2010; de Martinis et al., 2001) e neutralização do sobrenadante das culturas com NaOH. Uma forma muito utilizada de inibir a produção de peróxidos, substância produzida na presença de oxigênio, é a incubação das culturas em anaerobiose (de Martinis et al., 2001; Lewus et al., 1991; Moraes et al., 2010), ou a adição de uma solução de catalase ao meio de cultura, uma enzima capaz de hidrolisar o peróxido de hidrogênio produzido pelas BAL (Moraes et al., 2010; Moreno et al., 1999). Além de confirmar o antagonismo, são necessários testes para verificação da natureza protéica da substância antimicrobiana produzida, através de sua sensibilidade a enzimas proteolíticas. Quando as substâncias antimicrobianas produzidas apresentam sensibilidade a alguma protease, a natureza protéica é confirmada e essas substâncias podem ser classificadas como bacteriocinas.

Os métodos convencionais para detecção de BAL bacteriocinogênicas subestimam o potencial dessas BAL devido aos diversos fatores que interferem na expressão e produção de bacteriocinas em condições experimentais, além de mutações e rearranjos genéticos que podem ocorrer levando à perda da atividade antagonista (Gálvez et al., 2007). Dessa forma, após a triagem das culturas por meio de testes fenotípicos devem ser aplicadas técnicas moleculares para análise do genoma dos

isolados, com objetivo de identificar genes de bacteriocinas conhecidas ou não, independente da capacidade de produção das mesmas (Nes e Johnsborg, 2004). A metodologia mais comumente empregada é a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR). Vários estudos são conduzidos para detecção de genes de bacteriocinas em BAL isoladas de alimentos (Alegría et al., 2010; de Vuyst et al., 2003; Connil et al., 2002; DuToit et al., 20; Espeche et al., 2009; Moschetti et al., 2001; Rodriguez et al., 2000). A técnica de PCR em tempo real vem sendo utilizada com várias finalidades, como acompanhar a produção de bacteriocinas, sobrevivência de patógenos na presença de bacteriocinas, e multiplicação de isolados produtores de bacteriocinas em determinado meio ou alimento (Gálvez et al., 2007). As metodologias moleculares podem avaliar a presença de genes e expressão de bacteriocinas em diversas condições experimentais e ensaios em alimentos, esclarecendo os fatores que influenciam a expressão de bacteriocinas (Gálvez et al., 2007; Urso et al., 2006). A técnica *de fluorescence-in-situ-hybridisation* (FISH) também pode ser aplicada para verificar a distribuição de uma cepa bacteriocinogênica numa matriz alimentar, ou a resposta de um patógeno à aplicação de bacteriocinas no alimento (Fernández de Palencia et al., 2004; Hornbæk et al., 2006). Por meio de análises do genoma bacteriano ainda é possível identificar a localização dos genes de bacteriocinas no cromossoma (Dodd et al., 1990), realizar experimentos de clonagem e expressão heteróloga de bacteriocinas (Rodriguez et al., 2003), desenvolver metodologias de microarranjo e eletroforese bidimensional para verificar a resposta global de determinado microrganismo às bacteriocinas (Galvez et al., 2007; Kok et al., 2005; Martínez et al., 1998).

Além da caracterização fenotípica e genética das BAL produtoras de bacteriocinas, a purificação dessas substâncias deve ser efetuada para uma avaliação isolada da sua atividade e fatores que interferem na mesma. Geralmente os isolados bacteriocinogênicos são cultivadas em caldo e o sobrenadante submetido à técnica de cromatografia de alta performance em fase reversa, para separação dos componentes do sobrenadante e identificação da bacteriocina (Chen e Hoover, 2003; D'Angelis et al., 2008; Ennahar et al., 2001; Moreno et al., 2003; Wescombe et al., 2006). Concomitantemente é realizada a espectrometria de massa MALDI-TOF MS, técnica que tem como objetivos a separação e a identificação dos componentes de uma molécula. Os aminoácidos da proteína ainda podem ser sequenciados em

equipamentos automáticos que utilizam o princípio de degradação de Edman (Angelis et al., 2008; Ennahar et al., 2001; Mantovani et al., 2002; Wescombe et al., 2006). Outras metodologias muito empregadas em estudos de proteômica são a *sodium-dodecil-sulfato polyacrylamide-gel-electrophoresis* (SDS-PAGE) e eletroforese em duas dimensões (2DE). O princípio do SDS-PAGE é a separação de proteínas presentes no sobrenadante de culturas de isolados bacteriocinogênicos de acordo com o peso, para análises posteriores. Outra ferramenta utilizada para estudos de proteômica é a 2DE, onde as proteínas são separadas de acordo com peso e ponto isoelétrico, permitindo a diferenciação da expressão gênica de diferentes isolados ou de uma mesma cepa bacteriocinogênica, cultivada em condições ambientais diferenciadas (Galvez et al., 2007).

O desenvolvimento e evolução das metodologias moleculares promoveram um avanço nos estudos de BAL bacteriocinogênicas e bacteriocinas. Essas metodologias têm permitido a verificação de fatores interferentes na produção de diversos tipos de bacteriocinas, além da identificação de novas variáveis dessas substâncias e estudos a respeito de sua aplicabilidade em diversos alimentos.

4. Aplicação de BAL e bacteriocinas em alimentos

A identificação da capacidade de produção de bacteriocinas por BAL pode ser considerada a etapa inicial em estudos nessa área. Em complementação, vários outros fatores e características devem ser detalhadamente estudados a fim de viabilizar a sua utilização pela indústria de alimentos. Além da produção de bacteriocinas, BAL com potencial de aplicação devem ser analisadas quanto a sua patogenicidade (Deegan et al., 2006; Chen e Hoover, 2003), sobrevivência no alimento alvo e capacidade de competir com a microbiota natural do alimento (Deegan et al., 2006). A princípio, o próprio alimento a partir do qual a cepa de BAL bacteriocinogênica foi isolada seria a melhor escolha para sua aplicação (Rodríguez et al., 2000), devido à maior facilidade de adaptação e de produção de bacteriocinas, capacidade de competição com a microbiota do alimento sem aumentar sua taxa de deterioração, adaptação às condições do alimento que podem interferir na produção de bacteriocinas, bem como sensibilidade aos diferentes tipos de processamento utilizados pela indústria (Smacchi

e Gobbetti, 2000). Alguns fatores podem comprometer a eficácia de bacteriocinas, como a emergência de microrganismos resistentes, enzimas proteolíticas não específicas, oxidação, metais pesados, agitação excessiva, congelamento-descongelamento, ligação com componentes do alimento, divisão entre componentes apolares e polares, e pH do alimento (Galvez et al., 2007; Hoover e Steenson, 1993). Finalmente, além desses fatores, a escolha da BAL bacteriocinogênica ideal a ser aplicada em determinado alimento depende de particularidades do próprio microrganismo e de suas bacteriocinas, além dos microrganismos patogênicos ou deteriorantes que se pretende controlar.

Enterococcus spp. são microrganismos comensais do trato gastrointestinal humano, sendo que algumas cepas são bacteriocinogênicas e capazes de inibir microrganismos deteriorantes e patogênicos em alimentos (Eaton e Gasson, 2001; Giraffa et al., 2002). Devido à sua alta tolerância a sais e ácidos, esse gênero representa uma boa opção para uso como culturas *starters* em alimentos (Giraffa et al., 2002). Entretanto, algumas cepas do gênero *Enterococcus* apresentam características negativas, como resistência a antibióticos, além de presença e expressão de genes de virulência (Gomes et al., 2008). A diferenciação entre cepas aparentemente seguras e patogênicas não é fácil, uma vez que os genes de virulência podem ser transferidos entre diferentes cepas através de mecanismos de conjugação (Eaton e Gasson, 2001). Os principais fatores de virulência conhecidos associados à *Enterococcus* spp. são: aderência a tecidos, invasão e formação de abscessos, modulação da resposta imune e secreção de toxinas. Vários dos genes responsáveis por esses fatores de virulência já foram identificados e seus efeitos comprovados em cultivos celulares e modelos animais (Eaton e Gasson, 2001). Alguns genes já foram identificados como fatores de virulência, como o *esp* (codifica proteínas de superfície), *egg* (codifica substâncias agregativas), *efaAfm* e *efaAfs* (codificam adesinas de superfície de *E. faecium* e *E. faecalis* respectivamente), *gelE* (codifica a enzima gelatinase) e *cyl* (codifica citolisinas) (Eaton e Gasson, 2001; Franz et al., 2001; Mannu et al., 2003; Semedo et al., 2003; Valenzuela et al., 2010). A presença de tais fatores de virulência e a aquisição de genes de resistência a antibióticos podem indicar a associação destes microrganismos com infecções em humanos (Giraffa, 2002). A classificação taxonômica desse gênero não permite distinção entre isolados patogênicos e não-patogênicos, pois as diferenças

entre ambos não são evidentes e o potencial para aquisição de genes de virulência não é bem elucidado (Eaton e Gasson, 2001).

Considerando fatores que podem interferir na produção de bacteriocinas nos alimentos, como falta de adaptação da cepa produtora e desenvolvimento de características organolépticas indesejáveis, além da possível patogenicidade de algumas cepas de BAL e a necessidade de estudos detalhados e demorados para utilização de bacteriocinas purificadas, uma alternativa que vem sendo explorada é a expressão heteróloga de bacteriocinas. Essa alternativa é empregada principalmente para facilitar o controle da transcrição e tradução das bacteriocinas e para atingir uma produção maior do que a obtida com o uso da cepa original (Makrides, 1996). A produção heteróloga também pode ser usada para construir cepas multi-bacteriocinogênicas, capazes de serem empregadas como culturas *starters* e bioconservantes (Rodriguez et al., 2003). *E. coli* é o hospedeiro clássico para clonagem e expressão heteróloga de genes, entretanto este microrganismo não é bem adaptado para expressão de bacteriocinas, uma vez que possui diferenças quando comparadas a BAL no uso de códons e no conteúdo GC, além de ser Gram negativo. Essas características determinam diferenças na composição da membrana e nos sistemas de secreção (Rodriguez et al., 2003), determinando que as proteínas sintetizadas de forma heteróloga fiquem sujeitas a serem degradadas pelas proteases celulares (Makrides, 1996). Além disso, *E. coli* não é considerada segura para aplicação em alimentos, sendo um patógeno alimentar em potencial (Rodriguez et al., 2003). A espécie de microrganismo que ofereceria vantagens em relação a *E. coli* seria outra BAL, como *Lc. lactis*. Esse microrganismo vem se mostrando um bom hospedeiro para clonagens, com vantagens na estabilização e manutenção do material genético adquirido e controle da expressão (Konings et al., 2000), além de não ser patogênico e estar historicamente associado aos alimentos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar por meio de técnicas moleculares BAL previamente isoladas de leite cru e queijo fresco com atividade bacteriocinogênica contra *L. monocytogenes* e detectar genes de bacteriocinas.

Objetivos específicos

1) Identificação molecular das BAL selecionadas através de sequenciamento da região 16S rDNA e PCR.

2) Pesquisa de genes das principais bacteriocinas relacionadas a cada gênero de BAL identificado.

3) Sequenciamento da região codificadora de nisina em algumas BAL positivas para PCR para detecção desta bacteriocina, e comparação das sequências traduzidas.

4) Pesquisa por testes fenotípicos de fatores de virulência associados à *Enterococcus* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Identificação de BAL

1.1 Microrganismos utilizados no estudo

Neste estudo foram utilizados 101 isolados de BAL obtidos de leite cru e queijo fresco, que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Ortolani et al., 2010). As seguintes cepas de BAL foram utilizadas como controles positivos nas reações moleculares: *Enterococcus faecalis* FAIR-E179, *E. faecalis* FAIR-E77, *E. faecium* FAIR-E178, *E. faecium* BFE1072, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY-13, *Lc. lactis* subsp. *lactis* DPC3147, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CNRZ481/45, *Lactobacillus plantarum* CNRZ73/465. Todos os isolados e cepas de BAL foram mantidas em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) suplementado como 25% de glicerol e conservadas a -80 °C.

Para utilização dos isolados e das cepas armazenados, após descongelamento em temperatura ambiente uma alíquota de 200µL de cada foi transferida para tubos contendo 5 mL de caldo MRS, e incubados a 35 °C por 24h. Em seguida, as culturas obtidas foram estriadas em ágar MRS (Oxoid Ltd.), incubadas a 35 °C por 24h para verificação de pureza, e então colônias isoladas foram transferidas para caldos MRS com incubação a 35 °C por 24h, para posterior utilização.

1.2 Identificação molecular

1.2.1. Extração de material genético

Após a etapa de recuperação, alíquotas de 1 mL das culturas de BAL obtidas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugados a 14000 x *g* por 2 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o DNA do pellet de células de cada cepa extraído de acordo com protocolo do kit de extração “DNA Purification Kit Wizard Genomic” (código A11125, Promega Corp., Madison, USA). Após extração, os DNAs totais foram misturados com corante GelRed 20 X (Biotium Inc., Hayward, USA) na proporção 5:1 e corante de LoadDye (Promega Corp.) na proporção de 5:1, em seguida submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris Borato EDTA (TBE)

0,5X, e visualizados sob luz UV em transiluminador. O material genético extraído foi utilizado em todos os estudos moleculares descritos posteriormente.

1.2.2. Sequenciamento 16S rDNA

Todas as amostras foram submetidas à reação de polimerase em cadeia (PCR) para amplificação total do gene 16S rDNA com os oligonucleotídeos 616V e 630R (Tabela 1) (Sterr et al 2009). Cada reação de 50 µL de PCR foi constituída de 25 µL de Kit para PCR “Go Taq Green Master Mix 2x” (Promega Corp.), 20 pMol de cada oligonucleotídeo, 2 µL de DNA (aproximadamente 200 ng) e água ultra-pura (Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA) até completar o volume final. A reação foi conduzida em termociclador (Maxygene - THERM-1000, Axygen, Union City, USA) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, e etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram misturados com corante GelRed 20 X (Biotium Inc.) na proporção 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X, e visualizados sob luz UV em transiluminador.

Alíquotas de 50 µL dos produtos de PCR foram enviadas para a empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea), onde foram purificados e submetidos ao sequenciamento automático utilizando a metodologia adaptada de Sanger et al. (1977) com os oligonucleotídeos listados na Tabela 1. As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados depositado no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) por meio do software “Basic Alignment Search Tool” (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e posterior sequenciamento completo do gene 16S rDNA (Sterr et al 2009) em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo fresco.

Oligonucleotídeos	Sequência	Posição de anelamento
616V	AGAGTTT GATYMTGGCTCA	11-26
630R	AAGGAGGTGATCCARCC	1525-1541
699V	AACGAGCDCAACCC	1095-1109
610V	GTGCCAGCAGYYGCGG	509-524
97K	CTGCTGCCTCCCGTA	336-351

1.2.3. Reação em cadeia da polimerase

Os isolados que não foram identificados adequadamente pelo sequenciamento do gene 16S rDNA foram submetidos a reações de PCR com oligonucleotídeos específicos para determinados gêneros e espécies de BAL (Tabela 2).

Isolados identificados como *Enterococcus*, ou possivelmente pertencentes a esse gênero, foram submetidos à reação de PCR para identificação de *E. faecalis* de acordo com protocolo descrito por Dutka-Malen et al (1995) com modificações, e a cepa *E. faecalis* FAIR-E179 foi utilizada como controle positivo na reação. Isolados identificados inicialmente como *Lactococcus* spp. ou *Lc. lactis* foram submetidos a reações de PCR para confirmação da espécie e determinação da subespécie (Beimhfor et al., 1997), e as cepas *Lc. lactis* subsp. *lactis* DY-13 e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CNRZ481/45 foram utilizadas como controles positivos nas reações. Finalmente, os isolados identificados inicialmente como *Lactobacillus*, ou possivelmente pertencentes a esse gênero, foram submetidos a reação de PCR para identificação de *Lb. plantarum* (Nishitani et al., 2004), utilizando-se a cepa *Lb. plantarum* CNRZ73/465 como controle positivo na reação. Os oligonucleotídeos utilizados para cada reação, assim como as condições de amplificação e os tamanhos dos fragmentos obtidos, são apresentados na Tabela 2.

Cada uma das reações foi composta por um total de 25 µL, constituída de 12,5 µL de Kit para PCR “Go Taq Green Master Mix 2x” (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 0,3 µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. Para identificação de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* a quantidade de oligonucleotídeos utilizadas em cada reação foi de 50 pMol. Todas as reações foram

conduzidas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, temperatura específica de anelamento (Tabela 2) por 45 segundos, e 72 °C por 45 segundos, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Todos os produtos de PCR foram misturados com corante GelRed 20 X (Biotium Inc.) na proporção 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X, e visualizados sob luz UV em transiluminador, onde foi verificada a presença dos fragmentos amplificados (Tabela 2).

1.3 Identificação da natureza bacteriocinogênica dos isolados de BAL

A verificação da capacidade de produzir bacteriocinas pelos 101 isolados de BAL avaliados no presente estudo foi realizada em estudo paralelo durante o mesmo período no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Departamento de Veterinária da UFV, sob orientação do professor Luís Augusto Nero (Perin, 2011). Nesse estudo, as substâncias antimicrobianas produzidas pelos 101 isolados de BAL foram avaliadas quanto à sensibilidade em relação a cinco enzimas proteolíticas, de acordo com protocolo *spot-on-the-lawn* (Fleming et al., 1975). As enzimas testadas foram α -quimotripsina (C4129), proteinase K (P8044), tripsina TPCK (T1426), papaína (76220), protease de *Streptomyces griseus* (P5147), papaína (76220) (todas Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Água milli-Q foi utilizada como controle negativo. A cepa *L. monocytogenes* ATCC7644 foi utilizada como indicadora de inibição. A capacidade de produzir bacteriocinas pelos isolados de BAL avaliados foi identificada pela presença de um halo em forma de meia lua, indicando a degradação enzimática das substâncias antimicrobianas produzidas.

Tabela 2: Pares de oligonucleotídeos e condições de reações de PCR para identificação de algumas espécies de bactérias ácido lácticas nos isolados obtidos de leite cru e queijo frescal.

Identificação	Gene alvo	Oligonucleotídeos	Temperatura anelamento	Tamanho fragmento	Controles	Referência
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ddl</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	54 °C	941 pb	<i>E. faecalis</i> FAIR-E179	Dutka-malen et al., 1995
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>LLhis</i>	AAAGAATTTTCAGAGAAA ATTTAGAATTGGTTCAAC	44 °C	343 pb	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DY-13	Beimhfor et al., 1997
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lchis</i>	GCGCTGAATTTACCTGAC TTCGCGCACCGCCGTC	54 °C	556 pb	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CNRZ481/45	Beimhfor et al., 1997
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>recA</i>	CCGTTTATGCGGAACACCTA TCGGGATTACCAAAC ATCAC	56 °C	318 pb	<i>Lb. plantarum</i> CNRZ73/465	Nishitani et al., 2004

2. Pesquisa de genes associados à produção lantibióticos e bacteriocinas

Todos os isolados de BAL foram submetidos à reações de PCR para detecção de genes relacionados à codificação de lantibióticos, de acordo com Wirawan et al. (2006) e Hyink et al. (2005). Para tanto, foram utilizados oligonucleotídeos com bases degeneradas cujas sequências alvo são os genes *lanB*, *lanC* e *lanM*. Cada reação de 25 µL foi constituída de 12,5 µL de Kit para PCR “Go Taq Green Master Mix 2x” (Promega Corp.), 100 pMol de cada oligonucleotídeo, 0,3 µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. Todas as reações foram conduzidas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 40 °C por 30 segundos e 65 °C por 30 segundos, e etapa de extensão final a 65 °C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram misturados com corante GelRed 20 X (Biotium Inc.) na proporção 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5 X, e visualizados sob luz UV em transiluminador. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados em reações de PCR para detecção de genes associados à produção de lantibióticos em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite e queijo fresco.

Gene alvo	Oligonucleotídeos	Tamanho fragmento
<i>lanM</i>	ATGCWAGWYWTGCWCATGG CCTAATGAACCRTRRYAYCA	200-300 pb
<i>lanB</i>	TATGATCGAGAARYAKAWAGATATGG TTATTAIRCAIATGIAYDAWACT	400-500 pb
<i>lanC</i>	TAATTTAGGATWISYIMAYGG ACCWKGIIICRTRRCACCA	200-300 pb

Para a detecção de genes relacionados à produção de nisina nos isolados identificados como *Lactococcus* spp. foram utilizados três protocolos diferentes, descritos por Rodriguez et al (1995), García-Almendarez et al (2008) e Espeche et al (2009), com modificações. Ainda, outros isolados não identificados como *Lactococcus* spp. foram submetidos à detecção do gene de nisina apenas pelo protocolo descrito por Rodriguez et al (1995). Cada reação de 25 µL foi constituída de 12,5 µL de Kit para PCR “Go Taq Green Master Mix 2x” (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeos, 0,3 µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. As condições das reações foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 2 minutos, temperatura de

anelamento por 2 minutos e 72 °C por 2 minutos, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Apenas para identificação do gene de nisina com o protocolo descrito por Espeche et al. (2009) os tempos de desnaturação, anelamento e extensão durante os ciclos foram de 30 segundos, e como a reação foi conduzida como PCR multiplex foram adicionados 10 pMol dos oligonucleotídeos nisAf2 e nisBr2 e 20 pMol dos oligonucleotídeos nisAf1 e nisBr3. Os produtos da amplificação foram misturados com corante GelRed 20 X (Biotium Inc.) na proporção 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5 X, e visualizados sob luz UV em transiluminador.

A pesquisa de genes de lacticina 481 e 3147 foi realizada em todos os isolados identificados como *Lactococcus* spp. A pesquisa de lacticina 481 foi conduzida conforme Rodríguez et al (2000) e os oligonucleotídeos para detecção de lacticina 3147 foram desenhados baseados na sequência depositada no GeneBank (número acesso: AE001271.1). Cada reação de 25 µL foi constituída de 12,5 µL de Kit para PCR “Go Taq Green Master Mix 2x” (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 0,3 µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. As condições das reações foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram misturados com corante GelRed 20 X (Biotium Inc.) na proporção 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5 X, e visualizados sob luz UV em transiluminador.

Todos os isolados identificados como *Enterococcus* spp. foram submetidos a reações de PCR para detecção dos genes das enterocinas A, P, B, AS48 e L50A e L50B. Cada reação de 25 µL foi constituída de 12,5 µL de Kit para PCR “Go Taq Green Master Mix 2x” (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 0,3 µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. As condições das reações foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram misturados com corante GelRed 20 X (Biotium Inc.) na proporção 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5 X, e visualizados sob luz UV em transiluminador. Todos os oligonucleotídeos utilizados, temperaturas de anelamento e tamanhos dos fragmentos obtidos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Oligonucleotídeos e condições de reação de PCR utilizadas para identificação de genes de bacteriocinas em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo frescal.

Identificação	Oligonucleotídeos	Temperatura anelamento	Tamanho fragmento	Controles positivos	Referências
Nisina	AAGAATCTCTCATGAGT CCATGTCTGAACTAACA	43 °C	900 pb	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DY13	Rodriguez et al., 1995
Nisina	ATGAGTACAAAAGATTTTAACTTGG TTATTTGCTTACGTGAATACTACAATG	50 °C	200 pb	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DY13	García-Almendarez et al., 2008
Nisina Af1Br3	AAAATGAGTACAAAAGATTTTYAAC TGCATAACATCATAGAGTTTAGG	49 °C	430 pb	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DY13	Espeche et al., 2009
Nisina Af2Br3	TTCACGTAAGCAAATAACCA TGCATAACATCATAGAGTTTAGG	49 °C	270 pb	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DY13	Espeche et al., 2009
Nisina Af1Ar2	AAAATGAGTACAAAAGATTTTYAAC TTCACGTAAGCAAATAACCA	49 °C	160 pb	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DY13	Espeche et al., 2009
Lacticina 481	TCTGCACTCACTTCATTAGTTA AAGGTAATTACACCTCTTTTAT	51 °C	360 pb	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CNRZ481/45	Rodriguez et al., 2000
Lacticina 3147	AAATTAATGAGACAGACTTTG CATCATCCATAACTATATTTG	55 °C	105 pb	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC3147	GeneBank AE001271.1
Enterocina A	CATCATCCATAACTATATTTG AAATATTATGGAAATGGAGTGTAT	56 °C	126pb	<i>Enterococcus faecium</i> FAIR-E178	Du Toit et al., 2000
Enterocina B	GAAAATGATCACAGAATGCCTA GTTGCATTTAGAGTATACATTTG	58 °C	162 pb	<i>E. faecium</i> FAIR-E178	Du Toit et al., 2000
Enterocina P	TATGGTAATGGTGTTTATTGTAAT ATGTCCCATACCTGCCAAAC	58 °C	120 pb	<i>E. faecium</i> FAIR-E178	Du Toit et al., 2000
Enterocina L50A e B	STGGGAGCAATCGCAAATTAG ATTGCCCATCCTTCTCCAAT	56 °C	98 pb	<i>E. faecium</i> BFE1072	Du Toit et al., 2000
Enterocina AS48	GAGGAGTITCATGATTTAAAGA CATATTGTTAAATTACCAAGCAA	56 °C	340 pb	<i>E. faecalis</i> FAIR-E77	Du Toit et al., 2000

3. Sequenciamento parcial do gene da nisina

Considerando a presença de genes de nisina em gêneros incomuns, 10 isolados (Lc05, Lc06, Lc08, Lc10, Lc11, Lc21, Lc22, Lb15, Lb17 e Lb24) que apresentaram resultados positivos para nisina com o protocolo de PCR descrito por Rodriguez et al. (1995) foram selecionados, e seus produtos de amplificação purificados seguindo protocolo descrito no kit “*Wizard SV Gel and PCR clean-up System*” (Promega 017753).

Os produtos purificados foram enviados para o Laboratório do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), onde foram sequenciados de acordo com o método descrito por Sanger et al. (1977), com modificações. As sequências obtidas foram analisadas e as porções correspondentes ao pré-peptídeo foram traduzidas no software DNAMAN 4.0 e comparadas com uma sequência de nisina previamente depositada no Genbank (número de acesso: L16226.1). As sequências foram agrupadas pelo método *neighbor-joining* (com correção de Poisson) de acordo com os perfis genéticos no software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* - MEGA 4.0 (www.megasoftware.net). Análises de associação das sequências de aminoácidos foram conduzidas com 2000 bootstraps. Os domínios estruturais presentes nessas sequências foram verificados utilizando o programa *InterPro Scan* (<http://ca.expasy.org/tools/#primary>).

4. Pesquisa de fatores de virulência de *Enterococcus* spp.

Todos os isolados identificados como *Enterococcus* foram submetidos à pesquisa fenotípica dos principais fatores de virulência associados a este gênero, conforme descrito por Barbosa et al. (2010). Para a realização das análises, os isolados foram cultivados conforme descrito previamente (item 1.1). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para verificação da atividade hemolítica, alíquotas de 1µL das culturas foram semeadas pontualmente em placas contendo TSA (Oxoid Ltd.) suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado, com incubação a 37 °C por 48h. Os resultados foram classificados em: hemólise total ou α (halos transparentes ao redor da colônia),

hemólise parcial ou β (halos esverdeados ao redor da colônia) e ausência de hemólise ou γ (ausência de halo ao redor da colônia).

A produção de gelatinase foi observada semeando-se pontualmente alíquotas de 1 μ L das culturas em placas contendo ágar Lúria-Bertani (LB - Becton, Dickinson and Company - BD, Franklin Lakes, NJ, USA) suplementado com 30 g/L de gelatina (BD), e incubadas a 37 °C por 48 h. Após incubação, as placas eram mantidas à 4 °C por 4 horas para verificação dos resultados. Hidrólise da gelatina foi identificada pela formação de halos opacos ao redor das colônias.

Para verificação da produção de lipases, alíquotas de 1 μ L das culturas foram semeadas pontualmente em placas contendo ágar LB (BD) suplementado com 2 g/L de CaCl_2 e 10 g/L de Tween 80, e incubadas a 37 °C por 48 horas. Atividade lipolítica foi identificada pela formação de halos opacos ao redor das colônias.

Finalmente, a atividade desoxiribonuclease foi verificada a partir de alíquotas de 1 μ L das culturas semeadas pontualmente em placas contendo ágar DNase suplementado com verde de metila (BD) e incubadas a 37 °C por 48 horas. Atividade desoxiribonuclease foi identificada pela formação de halos transparentes ao redor das colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Identificação molecular

Através do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA foi possível identificar três principais gêneros dentre as BAL analisadas: 43 *Enterococcus*, 27 *Lactococcus* e 27 *Lactobacillus*. Outros gêneros e espécies de BAL também foram identificados, porém em pequena proporção: 1 *Leuconostoc mesenteroides*, 1 *Pediococcus*, 1 *Weissella cibaria*, 1 *Streptococcus*. As frequências de cada gênero e espécie identificadas são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Frequências de gêneros e espécies de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo fresco identificadas por técnicas moleculares (sequenciamento 16S rDNA e PCR).

Gênero/espécie	n	%	Código das culturas
<i>Enterococcus</i>	43	42,6	En01-43
<i>Enterococcus</i> spp.	30	29,7	En01-20, En28, En31-39
<i>E. faecalis</i>	13	12,9	En21-27, En29-30, En40-43
<i>Lactococcus</i>	27	26,7	Lc01-27
<i>Lc. lactis</i>	1	0,9	Lc02
<i>Lc. garviae</i>	4	4,0	Lc16-19
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	22	21,8	Lc01, Lc03-15, Lc20-27
<i>Lactobacillus</i>	27	26,7	Lb01-27
<i>Lb. sakei</i>	1	0,9	Lb12
<i>Lb. fermentum</i>	2	1,9	Lb10-11
<i>Lb. plantarum</i>	24	23,76	Lb01-09, Lb13-27
Outros gêneros	4	4,0	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	0,9	Ot01
<i>Pediococcus</i> spp.	1	0,9	Ot02
<i>Streptococcus</i> spp.	1	0,9	Ot03
<i>Weissella cibaria</i>	1	0,9	Ot04

A identificação em nível de espécie foi possível em grande parte das BAL dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*, o que não foi possível com relação a *Enterococcus*. Considerando *Lactococcus* spp., um isolado foi identificado como *Lc. lactis* e quatro como *Lc. garviae*, sendo os demais 22 identificados como *Lc. lactis* subsp. *lactis* por meio de reações de PCR específicas (Figura 2). Em relação à *Lactobacillus* spp., dois isolados foram identificados como *Lb. fermentum* e um como *Lb. sakei*, e os demais 24 como *Lb. plantarum* por meio de reações de PCR específicas (Figura 2). Em relação à *Enterococcus* spp. foi possível a identificação por reações específicas de PCR (Figura 2) de 13 isolados, identificados como *E. faecalis*.

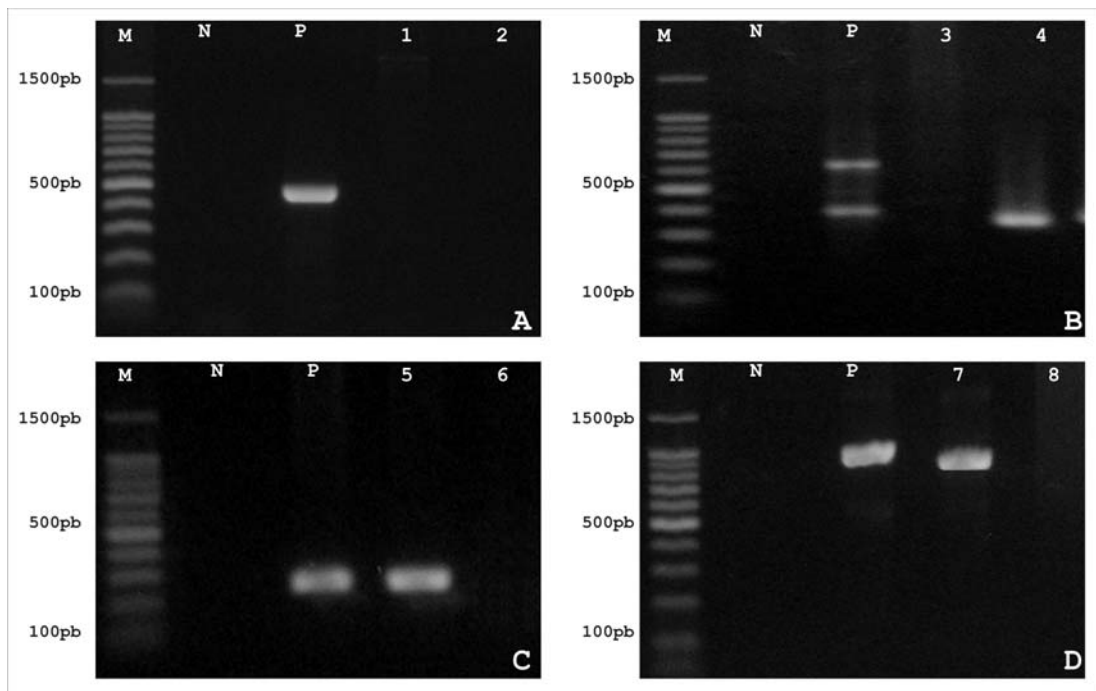


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para identificação de espécies específicas de bactérias ácido lácticas. As figuras A, B, C e D referem-se respectivamente a amplificação de genes específicos para detecção de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, e *Enterococcus faecalis*. Em cada figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, P corresponde ao controle positivo, e os números (1-8) correspondem a isolados testados.

De acordo com outros estudos, o sequenciamento dos genes 16S e 23S rDNA muitas vezes não permite a diferenciação de espécies, principalmente para isolados do gênero *Enterococcus* (Aymerich et al., 2003; Campos et al., 2006; Girafa and Neviani, 2001; Mohania et al., 2008). Considerando a dificuldade em identificar algumas espécies de *Enterococcus* spp. por meio de testes bioquímicos e seqüenciamento de DNA ribossomal (Cheng et al., 1997; Gomes et al., 2007, Mohania et al., 2008; Velasco et al., 2004), é necessária a aplicação de técnicas de identificação espécie específicas. A técnica mais utilizada para diferenciação entre espécies de *Enterococcus* spp. é a PCR baseada nos genes da enzima d-alanina-ligase (*ddl*), utilizada no presente estudo para identificação de *E. faecalis*, e enzimas relacionadas à resistência a antimicrobianos (*vanA*, *vanB* e *vanC*) (Dutka-Malen et al., 1995). Para identificação de *E. faecium* é

utilizada uma técnica de PCR baseada na amplificação e identificação de um fragmento obtido a partir da restrição enzimática com a enzima EcoRI (Cheng et al., 1997).

2. Identificação da natureza bacteriocinogênica dos isolados de BAL

Considerando resultados obtidos por Perin (2011) com os mesmos isolados avaliados no presente estudo, 80 (79,2%) BAL produziram substâncias antimicrobianas com sensibilidade a pelo menos uma das enzimas proteolíticas utilizadas, indicando que a(s) substância(s) antimicrobiana(s) produzida(s) é (são) de natureza protéica, e, portanto bacteriocinas. Vinte e um isolados não produziram substâncias com sensibilidade a nenhuma das enzimas utilizadas: 7 *Enterococcus* spp., 4 *Lactobacillus* spp., 8 *Lactococcus* spp. e 2 BAL de outros gêneros (*Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus*). Os padrões de sensibilidade enzimática apresentados pelos gêneros e espécies de BAL identificadas são apresentados na Tabela 6 (adaptado de Perin, 2011). As substâncias antimicrobianas produzidas foram sensíveis a várias enzimas, sendo mais freqüente a sensibilidade a proteinase K, tripsina e α -quimotripsina. A sensibilidade a diversas enzimas proteolíticas sugere a produção simultânea de diferentes bacteriocinas. Vinte e um isolados não produziram substâncias sensíveis às proteases testadas, o que sugere que estas não são produtoras de bacteriocinas ou não produziram bacteriocinas nas condições utilizadas durante o ensaio. Por meio do perfil de sensibilidade enzimática das substâncias não é possível determinar qual bacteriocina está sendo produzida, entretanto, a análise com um grande número de proteases é essencial para detectar a produção de bacteriocinas. A determinação do perfil de sensibilidade enzimática das bacteriocinas também é importante para determinar a sua sensibilidade a enzimas presentes nos alimentos em que será aplicada ou produzida, além de indicar a sua sensibilidade a enzimas digestivas. A caracterização do perfil de sensibilidade é interessante em preparados de sobrenadante de culturas ou de bacteriocinas purificadas, principalmente em estudos detalhados sobre fatores interferentes na produção e atividade da bacteriocina (Arauz et al., 2009; Chen e Hoover, 2003).

Tabela 6: Sensibilidade a proteases de substâncias antimicrobianas produzidas por isolados de bactérias ácido láticas obtidos de leite cru e queijo fresco (adaptado de Perin, 2011).

Gênero/espécie	n	Enzimas					Não sensível
		Proteinase-K	Tripsina	α -quimotripsina	Papaína	Protease	
<i>Enterococcus</i>	43	26	22	27	12	17	8
<i>Enterococcus</i> spp.	30	19	16	19	6	10	8
<i>E. faecalis</i>	13	7	6	8	6	7	0
<i>Lactococcus</i>	27	11	7	10	8	6	8
<i>Lc. lactis</i>	1	0	0	0	1	1	0
<i>Lc. garviae</i>	4	0	0	0	1	0	3
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	22	11	7	10	6	5	5
<i>Lactobacillus</i>	27	15	12	14	8	5	4
<i>Lb. sakei</i>	1	1	1	1	1	1	0
<i>Lb. fermentum</i>	2	0	0	0	0	0	2
<i>Lb. plantarum</i>	24	14	11	13	7	4	2
Outros gêneros	4	1	1	1	1	1	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	1	1	1	0	0	0
<i>Pediococcus</i> spp.	1	0	0	0	1	1	0
<i>Streptococcus</i> spp.	1	0	0	0	0	0	1
<i>Weissella cibaria</i>	1	0	0	0	0	0	1

3. Pesquisa de genes associados à produção de bacteriocinas

Dos 101 isolados de BAL avaliados, 80 (79,2%) apresentaram resultado positivo a pelo menos um dos genes de lantibióticos e bacteriocinas pesquisados. A alta frequência de isolados potencialmente bacteriocinogênicos confirmam a hipótese de que a maioria das bactérias, senão todas, são capazes de produzir algum tipo de bacteriocina como forma adaptativa de proteção em seu nicho ecológico (Riley e Wert, 2002). Entretanto, a produção destas bacteriocinas muitas vezes não pode ser detectada em ensaios laboratoriais, como observado no presente estudo, até porque os mecanismos que desencadeiam a produção destas substâncias antimicrobianas são muito variados e possivelmente só expressos em condições de *stress* (Chen e Hoover, 2003; Cotter et al., 2005; Konings et al., 2000; Riley e Wertz, 2002). As bacteriocinas seriam evolutivamente interessantes por três motivos: permitir a entrada de uma cepa em uma comunidade microbiana em equilíbrio, defender e inibir a invasão e avanço de outras bactérias a um determinado nicho ecológico, e por último, mediar de alguma forma a comunicação entre bactérias “quorum-sensing” (Riley e Wertz, 2002).

Todos os 101 isolados foram avaliados quanto à presença de genes relacionados à produção de lantibióticos, sendo que 65 (64,4%) apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos genes pesquisados. As frequências de resultados positivos para cada gênero e espécie identificados são apresentadas na Tabela 7, e a Figura 3 mostra resultados de amplificação para genes *lanB*, *lanC* e *lanM*. Os lantibióticos, ou bacteriocinas da classe I, são caracterizados pela presença de aminoácidos incomuns gerados por mudanças pós-traducionais. Estas mudanças são realizadas pelas proteínas codificadas pelos genes *lanB* e *lanC*, ou pelo gene *lanM* (McAuliffe et al., 2001), os quais foram pesquisados nesse estudo. Baseado nesse princípio, Wirawan et al. (2006) e Hyink et al. (2005) desenvolveram oligonucleotídeos com bases degeneradas, para identificação de genes relacionados a produção de lantibióticos em isolados de BAL. Um resultado esperado seria a presença simultânea dos genes *lanB* e *lanC* por estarem localizados no mesmo operon de cepas produtoras de lantibióticos (McAuliffe et al., 2001). Entretanto, verificou-se uma grande variação nos resultados positivos para os três genes pesquisados entre os isolados: somente *lanB* (20), somente *lanC* (10), somente *lanM* (11), *lanB* e *lanC* (8), *lanB* e *lanM* (4), *lanC* e *lanM* (6), e *lanB* e *lanC* e *lanM* (2). Wirawan et al. (2006) também observaram que a

amplificação de *lanB* e *lanC* não é simultânea em diversas cepas produtoras de lantibióticos, sendo mais comum a amplificação por apenas um dos oligonucleotídeos. Assim, ficou estabelecido que o resultado positivo para qualquer um dos genes *lanB*, *lanC* ou *lanM* pode ser considerado suficiente para detectar a capacidade de produção de lantibióticos pelo isolado bacteriano em análise. Por não apresentar reação cruzada com os demais genes, resultados positivos para *lanM* aparentemente são mais específicos para indicar a capacidade de produção de lantibióticos. As reações para *lanB*, *lanC* e *lanM* realizadas apresentaram como limitação a formação de algumas bandas inespecíficas, porém facilmente identificadas nos géis de corrida por apresentarem tamanhos bem diferentes das sequências alvo (Figura 3).

Tabela 7: Frequências de resultados positivos para os genes de lantibióticos *lanB*, *lanC* e *lanM* obtidas por PCR em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo fresco.

Gênero/espécie	N	<i>lanB</i>	<i>lanC</i>	<i>lanM</i>
<i>Enterococcus</i>	43	18	6	1
<i>Enterococcus</i> spp.	30	14	5	1
<i>E. faecalis</i>	13	4	1	0
<i>Lactococcus</i>	27	15	9	6
<i>Lc. lactis</i>	1	0	0	0
<i>Lc.garviae</i>	4	2	0	1
<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	22	13	9	5
<i>Lactobacillus</i>	27	4	11	12
<i>Lb. sakei</i>	1	0	0	0
<i>Lb. fermentum</i>	2	0	0	0
<i>Lb. plantarum</i>	24	4	11	12
Outros gêneros	4	1	0	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	0	0	0
<i>Pediococcus</i> spp.	1	0	0	1
<i>Streptococcus</i> spp.	1	1	0	1
<i>Weissella cibaria</i>	1	0	0	0

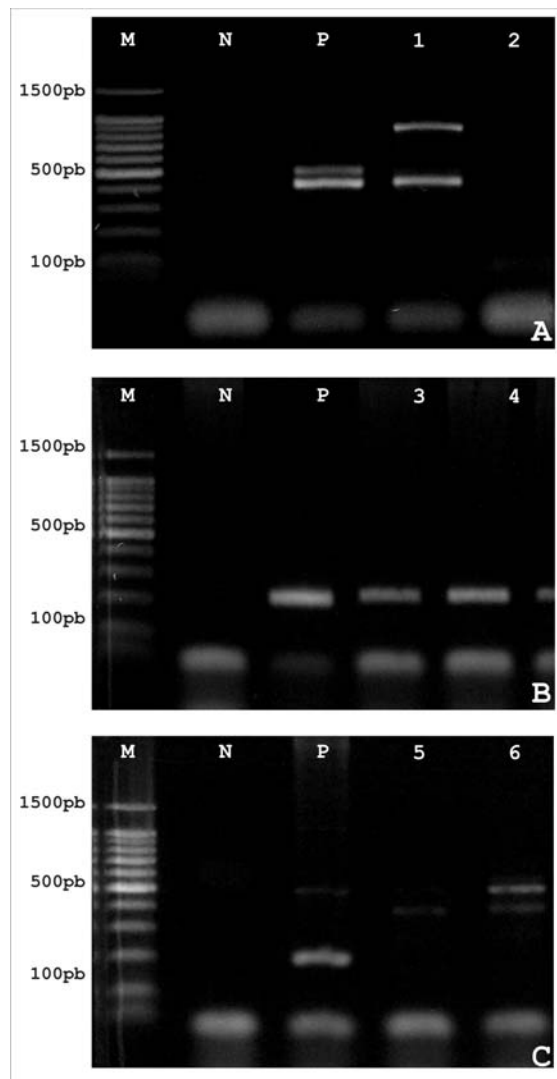


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para detecção de genes de lantibióticos, de acordo com Wirawan et al (2006) e Hyink et al (2005). As figuras A, B e C referem-se respectivamente a amplificação dos genes *lanB*, *lanC*, e *lanM*. Em cada figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, P corresponde ao controle positivo, e os números (1-6) correspondem a isolados testados.

Todos os isolados identificados como *Lactococcus* spp. foram submetidos à pesquisa de nisina utilizando os três protocolos descritos (Espeche et al., 2009; Rodriguez et al., 1995; García-Almendarez et al., 2008). As três metodologias possuem como alvo o mesmo gene responsável pela codificação de nisina, porém com anelamento em diferentes porções. De maneira geral, os resultados obtidos foram equivalentes, com pequenas variações de resultados observados apenas em dois isolados: Lc13 apresentou resultado positivo apenas com os oligonucleotídeos descritos por García-Almendarez et al. (2008), e Lc06 apresentou resultado negativo para oligonucleotídeos nisAf2-nisBr3 descritos por Espeche et al (2009).

As frequências de resultados positivos para cada gênero e espécies identificados são apresentadas na Tabela 8, e a Figura 4 mostra os aspectos dos géis de corrida com alguns resultados positivos para as três reações. Genes de nisina são identificados com frequência em cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, conforme descrito por diversos autores (Alegría et al., 2010; Bello et al., 2010; Rodriguez et al., 2000). Os oligonucleotídeos utilizados para detecção do gene de nisina foram desenhados com base na nisina A, porém anelam em regiões do gene que codificam variações dessa bacteriocina, como nisina Z, nisina Q e nisina U, conforme observado comparando-se essas sequências no BLAST. As variações de nisina diferem da nisina A (primeira nisina descrita) na organização dos genes no operon (Wirawan et al., 2006) e em alguns aminoácidos (Arauz et al., 2009; Chen e Hoover, 2003). Essas mudanças, apesar de pequenas, podem interferir em algumas características da nisina, como solubilidade, difusão e espectro de ação (Arauz et al., 2009).

Considerando a importância da nisina como inibidor de patógenos e deteriorantes, e que já foi descrita sendo produzida por outros gêneros e espécies de BAL além de *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Arauz et al., 2009), como *Streptococcus* spp. (Wirawan et al 2006), todos os isolados foram submetidos à detecção de gene dessa bacteriocina conforme o protocolo de Rodriguez et al (1995). Surpreendentemente, 18 dos 43 *Enterococcus* spp. (41,9%) e 4 dos 24 *Lb. plantarum* (16,7%) apresentaram fragmento do tamanho esperado para nisina (cerca de 900 pb). Os genes relacionados à produção da nisina estão organizados em operons, localizados em grandes transposons conjugativos (70 kb) (McAullife et al., 2001), que talvez possam ter sido transferidos para esses isolados de BAL. A presença do gene estrutural da nisina em isolados de BAL não identificados como *Lactococcus* spp. não está necessariamente relacionada com a produção desta bacteriocina, que depende de diversos fatores como a regulação da transcrição, mudanças pós traducionais, clivagem da sequência leader e excreção. Estudos avançados são necessários para verificar a presença e integridade do operon da nisina nesses isolados de BAL, e se os mesmos estão sendo expressos. Desta forma, mesmo possuindo o gene da nisina não é possível afirmar se os isolados identificados como *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. são capazes de produzir essa bacteriocina. Apesar de positivas pelo PCR para nisina, alguns isolados (En13, En20, En34 e Lb17) não apresentaram sensibilidade a proteases, o que indica que nenhuma bacteriocina foi produzida nas condições em que o teste foi conduzido.

Tabela 8: Frequências de resultados positivos para de genes de nisina obtidos por reações de PCR baseadas em 3 protocolos distintos em isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo frescal.

Gênero/espécie	n	Protocolos para detecção de genes codificadores de nisina		
		Rodriguez et al (1995)	García-Almendárez et al (2008)	Espeche et al (2009)
<i>Enterococcus</i>	43	18	nd	nd
<i>Enterococcus</i> spp.	30	14	nd	nd
<i>E. faecalis</i>	13	4	nd	nd
<i>Lactococcus</i>	27	18	16	15
<i>Lc. lactis</i>	1	0	nd	nd
<i>Lc. garviae</i>	4	3	nd	nd
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	22	15	16	15
<i>Lactobacillus</i>	27	4	nd	nd
<i>Lb. sakei</i>	1	0	nd	nd
<i>Lb. fermentum</i>	2	0	nd	nd
<i>Lb. plantarum</i>	24	4	nd	nd
Outros gêneros	4	1		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	0	nd	nd
<i>Pediococcus</i> spp.	1	0	nd	nd
<i>Streptococcus</i> spp.	1	1	nd	nd
<i>Weissella cibaria</i>	1	0	nd	nd

nd: não detectado

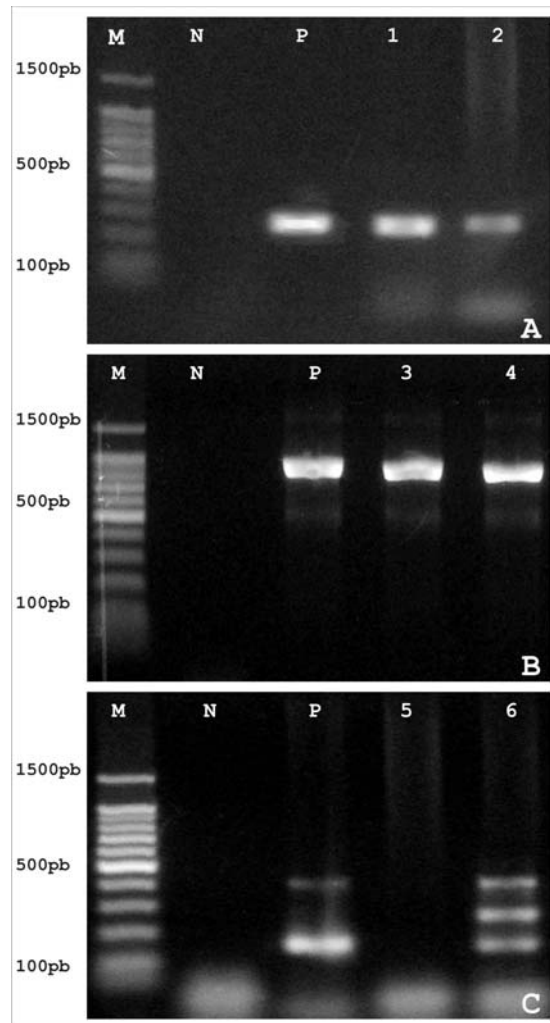


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para detecção de gene de nisina. As figuras A, B e C referem-se respectivamente a amplificação de nisina de acordo com García-Almendárez et al (2008), Rodríguez et al (1995), e Espeche et al (2009). Em cada figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, P corresponde ao controle positivo, e os números (1-6) correspondem à isolados testados.

Além de nisina, os isolados identificados como *Lactococcus* spp. foram submetidos ainda à pesquisa de genes de duas lacticinas: 481 e 3147. Entretanto, nenhum isolado apresentou resultado positivo para ambas as bacteriocinas (Figura 5). A ausência dos genes destas lacticinas confirma sua distribuição restrita quando comparado a outras bacteriocinas, como a nisina e algumas enterocinas, como previamente descrito por Alegria et al. (2010). A lacticina 481 foi primeiramente descoberta nas cepas *Lc. lactis* CNRZ 481 (Piard et al., 1993) e *Lc. lactis* ADRIA85LO30 (Hooven et al., 1996), e posteriormente identificada em cepas de *Lc. lactis* isoladas de diversos tipos de alimentos (Bello et al., 2010; Martínez et al, 1998; Rodriguez et al., 2000). Essa

bacteriocina possui importância por ser explorada como bioconservante em queijos maturados, uma vez que inibe o desenvolvimento de *C. tyrobutyricum*, importante deteriorante desses produtos. Em relação à lacticina 3147, até o momento somente foi verificada sua produção pela cepa *Lc. lactis* DPC3147, que foi isolada de grãos de Kefir e possui um plasmídeo de 63kb contendo o operon dessa bacteriocina. Lacticina 3147 é estável ao calor e pH baixo, e capaz de inibir uma grande variedade de microrganismos (Ryan et al., 1996). Pesquisas estão sendo conduzidas para verificar viabilidade de utilização desta bacteriocina como culturas *starters* através de expressão heteróloga (Ryan et al., 1996), aplicação em alimentos (Morgan et al., 1999), e controle de mastite em vacas (Ryan et al., 1998).

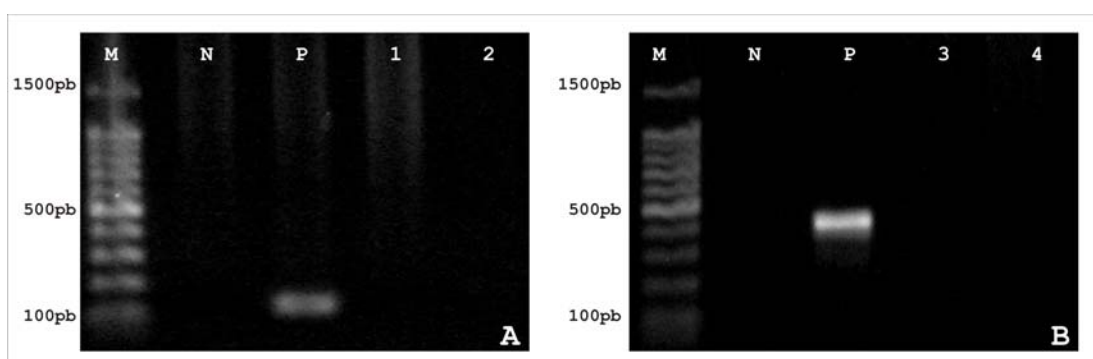


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para detecção de gene de lactinas. As figuras A e B referem-se respectivamente a amplificação de lacticina 3147 e lacticina 481. Em cada figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, P corresponde ao controle positivo, e os números (1-4) correspondem a isolados testados.

A presença de genes estruturais de uma ou mais enterocinas foi observada em 27 das 43 cepas de *Enterococcus* spp. pesquisadas (62,8%). As frequências de resultados positivos para genes das diferentes enterocinas pesquisadas são apresentadas na Tabela 9, e alguns resultados apresentados na Figura 6. A presença do gene para enterocina P foi o mais frequente, seguida de enterocina A, AS48 e enterocina B. O gene para enterocina L50AB não foi detectado em nenhum isolado. A combinação de vários genes para diferentes enterocinas num mesmo isolado foi recorrente, sendo observada em 18 (66,7%) dos 27 isolados que apresentaram resultados positivos, enquanto 9 (33,3%) foram positivos para apenas uma das enterocinas pesquisadas. Foi

observada uma alta frequência (acima de 50%) de isolados positivos para alguma das enterocinas pesquisadas, o que corresponde ao observado por outros autores que analisaram a presença de genes de enterocinas em *Enterococcus* spp. de diversas fontes ambientais e de alimentos (Bello et al., 2010; De Vuyst et al., 2003; Herranz et al., 1999; Pangallo et al., 2004; Strompfová et al., 2008). Dentre os isolados que apresentaram simultaneamente mais de um gene para enterocinas, a combinação mais freqüente foi de enterocinas A e P, conforme descrito em estudos similares (Strompfová et al., 2008; deVuyst et al., 2003). A capacidade de produzir três ou mais enterocinas, identificada pelas reações moleculares, demonstra o potencial inibitório de vários dos isolados identificados como *Enterococcus* spp. Entretanto, já foi demonstrado que mesmo possuindo diversos genes de enterocinas, nem todas são expressas simultaneamente (Cintas et al., 1998). A eficiência dos mecanismos de transferência genética pode explicar a variedade de enterocinas e a produção de múltiplas bacteriocinas pela mesma cultura, assim como a alta frequência de *Enterococcus* spp. com diversos genes dessas bacteriocinas (Franz et al., 2007). *Enterococcus* spp. possuem mecanismos de intercâmbio genético conjugativos (transposons conjugativos e plasmídeos com alta frequência de transferência) e não conjugativos, como alguns plasmídeos (Franz et al 2007).

A produção de bacteriocinas é uma vantagem competitiva para *Enterococcus* spp. em diversos habitats. Em alimentos, lácteos e cárneos, a produção de bacteriocinas é vantajosa, permitindo que *Enterococcus* spp. seja um dos principais gêneros associados a esses produtos. A produção de bacteriocinas, associado à tolerância a diversas condições físico-químicas adversas (como concentração de sais e pH), explica a ampla distribuição de *Enterococcus* spp. Ainda, espécies de gênero *Enterococcus* são associadas à maturação de diversos queijos, onde promovem também o desenvolvimento de sabores característicos (Franz et al., 1999). Nesse sentido, o uso de cepas bacteriocinogênicas de *Enterococcus* spp. como *starters*, além de proporcionar a produção de características desejáveis, preveniria o desenvolvimento de patógenos, como *L. monocytogenes*, e deteriorantes, como *C. tyributyricum* (Giraffa et al.,1995; Giraffa et al., 2003).

Tabela 9: Frequências de resultados positivos para genes de enterocinas obtidos por PCR em isolados de bactérias ácido lácticas identificados como *Enterococcus* spp. e obtidos de leite cru e queijo fresco.

Gênero/espécie	n	Enterocinas				
		L50A/L50B	AS-48	P	A	B
<i>Enterococcus</i>	43	0	9	25	11	1
<i>Enterococcus</i> spp.	30	0	8	23	10	1
<i>E. faecalis</i>	13	0	1	2	1	0

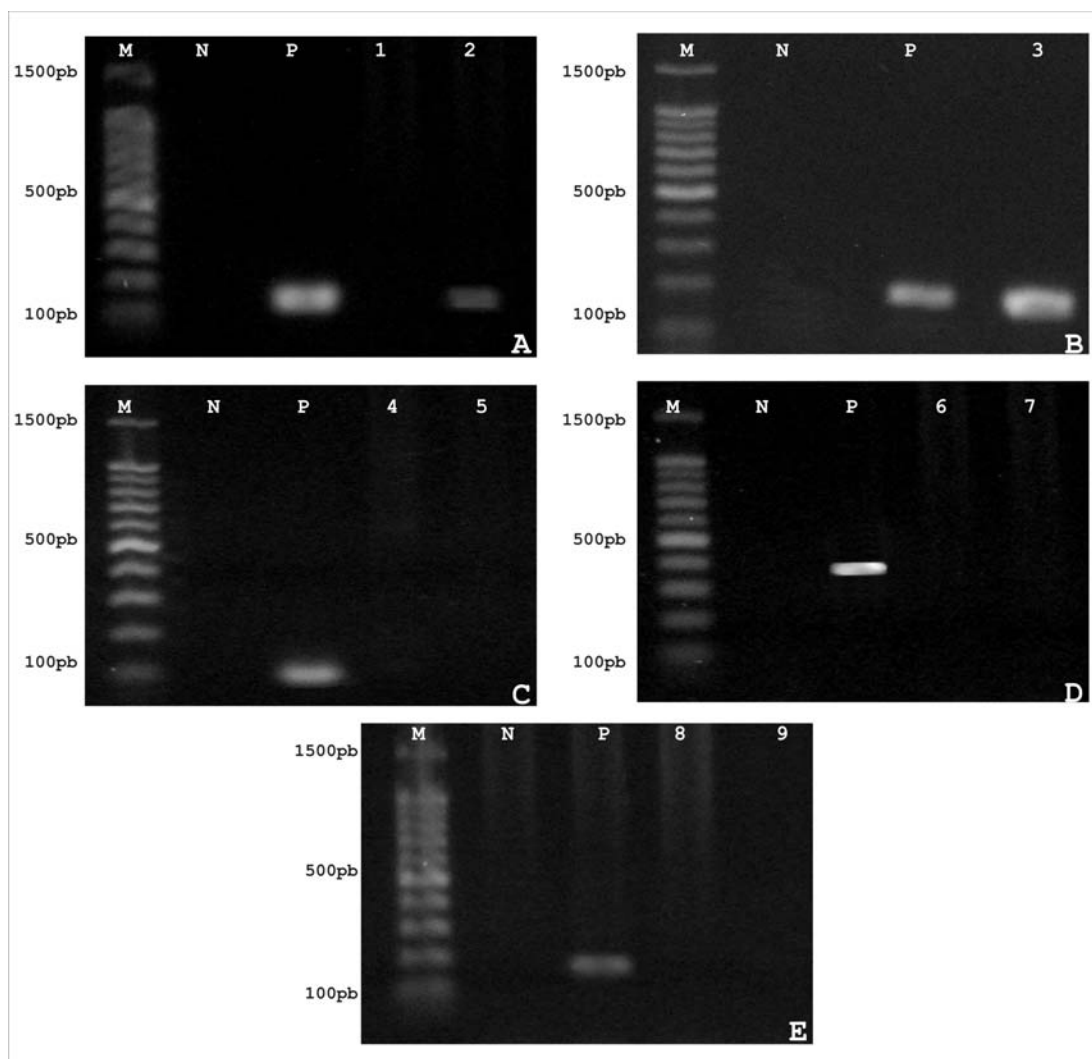


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para detecção de gene de enterocinas, de acordo com protocolo descrito por DuToit et al (2001). As figuras A, B, C, D e E referem-se respectivamente a amplificação de enterocina A, enterocina B, enterocina L50A e B, enterocina AS48 e enterocina P. Em cada figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, P corresponde ao controle positivo, e os números (1-9) correspondem a isolados testados.

4. Sequenciamento de gene estrutural de nisina

Considerando os resultados positivos para nisina pelo protocolo descrito por Rodriguez et al. (1995), os produtos de PCR obtidos de 10 isolados de BAL por meio deste protocolo foram submetidos a sequenciamento. As sequências foram traduzidas, e comparadas entre si e com uma sequência de aminoácidos padrão, correspondente ao precursor da nisina (Genbank, número de acesso L16226.1), composta de 54 aminoácidos, dos quais os primeiros 23 correspondem ao peptídeo sinal. O peptídeo sinal é clivado pela enzima LanP durante o transporte da proteína, e os aminoácidos seguintes correspondem ao precursor da nisina, que ainda passará por extensas mudanças pós-traducionais para inserção dos aminoácidos modificados característicos de lantibióticos (Dodd et al., 1990; McAuliffe et al., 2001). Em metade das sequências analisadas não foi observada variação ao padrão utilizado para comparação (Figura 7). Entretanto, no restante das culturas ocorreram diferenças em um aminoácido: em Lc05, Lc08 e Lc11, o último aminoácido, uma histidina, foi substituído por uma treonina; em Lc06 e Lb17, uma histidina foi substituída por uma asparagina. Todas as alterações foram observadas na extremidade carboxi-terminal das sequências deduzidas, que é a região que está mais relacionada ao domínio ativo da nisina (McAuliffe et al., 2001).

Algumas serinas, treoninas e cisteínas do pré-peptídeo passam por mudanças pós-traducionais para que a lantionina possa ser formada na nisina madura. Esses aminoácidos não sofreram alteração nas sequências deduzidas (Figura 7), indicando que manteriam sua estrutura nas bacteriocinas produzidas pelos isolados analisados.

A alteração da histidina da posição 31 por uma treonina não foi descrita previamente na literatura, e a princípio, essa alteração não afetaria os domínios da nisina, de acordo com a análise realizada no InterPro Scan. A treonina é um aminoácido polar sem cargas, e essa variação pode ser considerada semelhante à formação de nisina U e U₂, onde o aminoácido histidina, polar básico e carregado positivamente em pH neutro, é substituído por uma glicina (posição 31), um aminoácido apolar. Assim, essa variação também poderia determinar uma maior difusão da bacteriocina produzida no ágar em testes de inibição, o que foi confirmado pelos resultados obtidos com os isolados Lc05, Lc08 e Lc11 contra *L. monocytogenes*, que formaram halos bem evidentes nos ensaios de inibição (Perin, 2011).



Figura 7: Agrupamento de seqüências de aminoácidos de nisina deduzidos a partir do sequenciamento da região codificadora de nisina de 10 isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite e queijo. Ref corresponde a seqüência padrão depositada no GeneBank (número de acesso: L16226.1) utilizada para comparação; os aminoácidos marcados em cinza apresentaram variação em relação à seqüência padrão e os aminoácidos sublinhados são essenciais para a formação dos anéis de lantionina.

A substituição da histidina por uma asparagina (posição 27) caracteriza o peptídeo como uma conhecida variante da nisina A, denominada nisina Z (Mulders et al., 1991). Ao analisar os domínios das proteínas, todas as seqüências traduzidas apresentaram domínios característicos de nisina, galidermina e lantibióticos. A nisina Z apresenta diferenças sutis em solubilidade e espectro de ação em comparação com a nisina A (Dodd et al., 1990). Essas diferenças são decorrentes da alteração da distribuição das cargas elétricas na molécula, uma vez que houve troca de um aminoácido polar básico carregado positivamente, a histidina, por um aminoácido polar neutro, a asparagina (Dodd et al., 1990). De acordo com Piper et al. (2010), a variante nisina Z possui maior espectro de ação e capacidade de difusão em meio de cultura, formando halos de inibição maiores do que a nisina A em testes de antagonismo. As substâncias antimicrobianas produzidas pelos isolados que apresentaram essa variação apresentaram diferentes perfis de sensibilidade enzimática. As substâncias antimicrobianas produzidas por Lc06 apresentaram sensibilidade apenas à proteinase K, perfil compatível com nisina (Tabela 6), indicando que a mesma estava sendo produzida pelo isolado, além de formação de halo de inibição bastante evidente contra

L. monocytogenes. Por outro lado, as substâncias antimicrobianas produzidas pelo Lb17 não apresentaram sensibilidade por nenhuma das enzimas testadas, sugerindo não expressão de qualquer bacteriocina. Ainda, esse isolado foi identificado como *Lb. plantarum*, usualmente não associado à produção de nisina. A presença desse gene em Lb17 pode ter ocorrido por transferência genética, porém não o habilitou a produzir nisina, uma vez que a expressão depende de vários outros fatores genéticos, provavelmente não presentes na cepa. Há relatos na literatura de transferência genética horizontal entre espécies de *Lactobacillus* spp. (Nicolas et al., 2007) e deste gênero com outros (Liu et al., 2009). A incapacidade de produzir bacteriocinas por cepas que adquiriram genes já foi descrita previamente em culturas de *Streptococcus* spp. com genes de nisina (Piper et al., 2010).

5. Fatores de patogenicidade de *Enterococcus* spp.

A pesquisa de fatores de patogenicidade em isolados de BAL é importante para verificação da capacidade de causar efeitos adversos aos consumidores, uma vez que o objetivo do isolamento e estudo de culturas bacteriocinogênicas é a aplicação em alimentos. Assim, isolados identificados como *Enterococcus* spp. devem ser estudados com bastante cuidado, pois esses microrganismos possuem potencial patogênico por conterem diversos genes de virulência, que podem ser transferidos para isolados inicialmente não patogênicos. Espécies pertencentes a esse gênero são conhecidas pela facilidade em promover transferência horizontal de genes, tanto de virulência, como de resistência a antibióticos (Eaton e Gasson, 2001). Por essa razão, os isolados identificados como *Enterococcus* spp. foram submetidos a testes fenotípicos para verificação de alguns fatores de patogenicidade, e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11 e Figura 9.

Nenhum isolado apresentou resultado positivo para atividade lipolítica ou produção de DNase (Tabela 11). Esses fatores de patogenicidade são uma vantagem competitiva em cepas patogênicas, permitindo a infecção dos hospedeiros. Esses fatores são mais frequentemente pesquisados em isolados clínicos de *Enterococcus* spp., onde são usualmente identificados em altas frequências (Semedo et al., 2003). Em isolados provenientes de alimentos, as frequências desses fatores de patogenicidade tendem a ser menores das que as observadas em isolados de amostras clínicas (Barbosa et al., 2010; Franz et al., 2001).

A frequência de resultados positivos para gelatinase (Tabela 11) foi similar a resultados obtidos em outros estudos com *Enterococcus* spp. isolados de alimentos (Barbosa et al., 2010; Semedo et al., 2003), porém inferior às frequências observadas em estudos com isolados de amostras clínicas (Kuhnem et al., 1988; Singh et al., 1998; Franz et al., 2001). A enzima gelatinase é considerada um fator de virulência por indicar a capacidade de hidrolisar colágeno, o que sugere sua participação na fase inicial e na propagação do processo inflamatório (Waters et al., 2003). Mesmo tendo sido detectado por testes fenotípicos, o gene responsável pela produção da enzima gelatinase (*gelE*) pode estar presente em uma frequência muito maior de forma silenciosa, sem ser expresso (Eaton e Gasson, 2001). A frequência de culturas produtoras de gelatinase é maior em *E. faecalis* do que em *E. faecium* (Barbosa et al. 2010; Eaton e Gasson, 2001; Franz et al., 2001; Semedo et al., 2003).

Não foi observada hemólise completa (denominada de β -hemólise) em nenhum dos isolados analisados (Tabela 11). Nesse teste, apenas hemólise incompleta (denominada de α -hemólise), caracterizada por halos esverdeados ao redor das colônias, ou ausência de hemólise (denominado de γ -hemólise) foram observadas (Tabela 11). A produção de hemolisinas tem um papel importante nas infecções causadas por *Enterococcus* spp., sendo detectada em maior frequência em isolados provenientes de amostras clínicas do que de alimentos (Franz et al., 2001). A citolisina é uma bacteriocina produzida por *Enterococcus* spp. que é capaz de atuar em células eucarióticas, com atividade hemolítica. A frequência de isolados de alimentos com atividade β -hemolítica é baixa (Barbosa et al., 2010; Eaton e Gasson, 2001; Semedo et al., 2003), sendo observada com maior frequência em isolados de amostras clínicas (Eaton e Gasson, 2001; Semedo et al., 2003). Em culturas isoladas, a α -hemólise é usualmente mais observada (Barbosa et al., 2010). Entretanto, a ausência de atividade hemolítica não significa necessariamente que o isolado não possua potencial patogênico (Franz et al., 1999). Finalmente, a capacidade de produzir α -hemólise não é usualmente considerada como um fator de patogenicidade (Barbosa et al., 2010).

A virulência de *Enterococcus* spp. está mais relacionada às espécies *E. faecium* e *E. faecalis* (Franz et al., 2001). Apesar de serem encontrados em alimentos e usados como culturas *starters*, existem desvantagens em relação ao uso de *Enterococcus* spp., uma vez que estes não são considerados GRAS e são associados a infecções

nosocomiais em humanos (Franz et al., 1999). Apesar de serem mais freqüentes em isolados provenientes de amostras clínicas, fatores de patogenicidade podem ser também observados em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos. Independente de seu caráter patogênico, muitos desses fatores, como citolisina, adesinas e outras enzimas, desenvolvem um papel importante de adaptação desses microrganismos. Tanto em hospedeiros quanto em alimentos, esses fatores de patogenicidade podem determinar lise de eritrócitos ou de outras bactérias, adesão as células hospedeiras ou superfícies abióticas, formação de biofilmes, e hidrólise de componentes de tecidos ou de alimentos (Eaton e Gasson, 2001). Dessa forma, estudos para verificação de fatores de virulência e potencial patogênico desses microrganismos são necessários antes de utilizá-los como *starters* (Eaton e Gasson, 2001; Franz et al., 2001).

Vários isolados identificados como *Enterococcus* spp. apresentaram produção simultânea de fatores de patogenicidade e bacteriocinas, além de carregarem genes para várias enterocinas (Tabelas 9 e 10, e Figuras 6 e 8). Esses resultados indicam que mesmo apresentando uma boa capacidade inibitória, cuidados devem ser tomados na utilização dessas cepas como ferramentas biocontroladoras na indústria de alimentos. Apesar de serem bacteriocinogênicas, cepas que apresentam fatores de patogenicidade podem causar efeitos adversos aos consumidores, ou até mesmo transferir genes de virulência para microrganismos naturalmente presentes nos alimentos e inicialmente não-patogênicos. Ainda, cepas bacteriocinogênicas e inicialmente não-patogênicas de *Enterococcus* spp. podem receber genes de virulência e passarem a expressar fatores de patogenicidade (Eaton e Gasson, 2001). Assim, uma alternativa viável para aproveitar o potencial antimicrobiano de enterocinas seria a purificação dessas substâncias e aplicação nos alimentos, ou mesmo a expressão heteróloga desses genes em outras cepas não patogênicas, como usualmente feito em *Lactococcus* spp. (Konings et al., 2000). Entretanto, estudos detalhados devem ser conduzidos a fim de verificar a possibilidade dessa transferência e expressão, e possíveis variações que podem ocorrer nas enterocinas produzidas.

Tabela 10: Frequências de resultados positivos em testes fenotípicos para identificação de expressão de fatores de virulência por isolados identificados como *Enterococcus* spp. obtidos de leite cru e queijo fresco.

Gênero/espécie	n	Fatores de patogenicidade					
		gelatinase	β -hemólise	α -hemólise	γ -hemólise	DNase	lipase
<i>Enterococcus</i>	43	11	0	23	20	0	0
<i>Enterococcus</i> spp	30	3	0	13	17	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	13	8	0	10	3	0	0

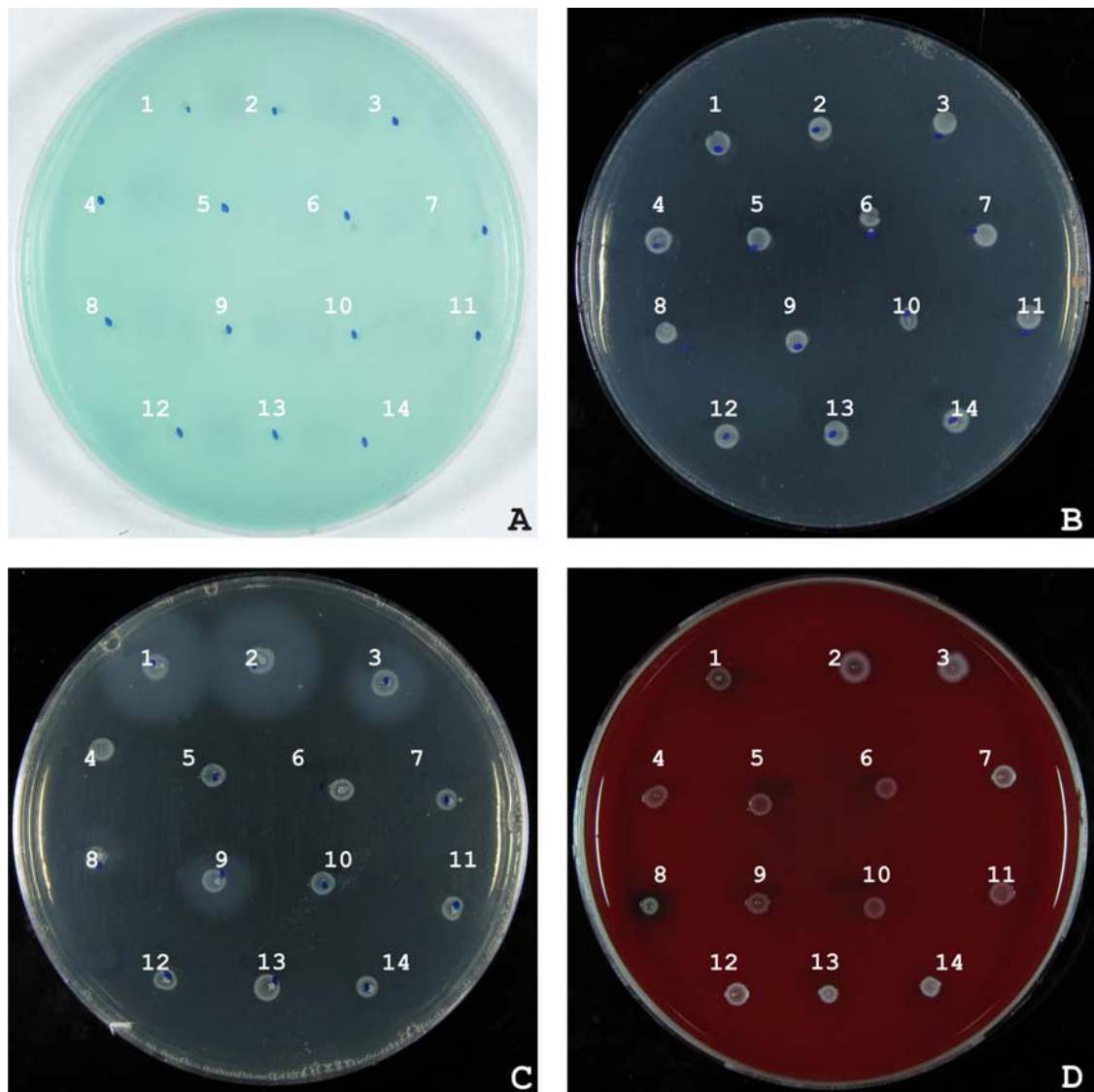


Figura 8: Resultados obtidos de isolados identificados como *Enterococcus* spp. obtidos de leite cru e queijo fresco em testes fenotípicos para detecção de expressão de fatores de patogenicidade. A) Atividade desoxiribonucleásica; B) Atividade lipolítica; C) Produção de gelatinase; D) Hemólise em ágar sangue de cavalo. Os números (1-14) correspondem a isolados testados, cujas culturas foram semeadas pontualmente nos meios de cultura específicos para cada teste.

6. Análise geral dos resultados

A associação do resultado das análises moleculares, sensibilidade de substâncias antimicrobianas a proteases e produção de fatores de patogenicidade indicou diferentes comportamentos e características dos isolados testados.

Em 15 dos 21 isolados que não produziram substâncias antimicrobianas sensíveis a proteases foi detectada a presença de pelo menos um dos genes de bacteriocinas pesquisados (lantibióticos, nisina ou enterocinas) (Tabelas 6, 7, 8 e 9). Esses resultados indicam que esses 15 isolados possuem genes de bacteriocinas que não foram expressos nas condições em que o teste de sensibilidade a proteases foi conduzido. Apenas a presença do gene pode não estar relacionada com a sua expressão, uma vez que vários fatores estão envolvidos com a expressão gênica de bacteriocinas, que variam desde fatores genéticos até ambientais (Chen e Hoover, 2003; McAuliffe et al, 2001; Cheigh et al, 2002). Sabe-se que as bacteriocinas são produzidas em condições muito variadas, que muitas vezes não são reproduzidas em testes fenotípicos para detecção das mesmas. Alguns componentes e características dos meios de cultura utilizados podem inibir a produção de algumas bacteriocinas, como agentes geleificantes e emulsionantes (Chen e Hoover, 2003), concentração de nutrientes, fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e agitação (Cheigh et al., 2002). A produção de bacteriocinas também está relacionada com a fase de multiplicação do microrganismo, uma vez que condições desfavoráveis podem estimular a sua produção (de Vuyst et al., 1996; Galvez et al., 2007). Considerando esses dados, talvez em outras condições estes genes pudessem ser expressos.

O contrário também foi observado, 15 dos 21 isolados que apresentaram resultados negativos nas reações de PCR para identificação de genes de bacteriocinas (lantibióticos, nisina ou enterocinas) produziram substâncias antimicrobianas de natureza protéica, ou seja, bacteriocinas (Tabelas 6, 7, 8 e 9). Esses resultados evidenciam a produção de outras bacteriocinas, diferentes das pesquisadas por PCR no presente estudo. Considerando que foram pesquisadas as bacteriocinas mais comumente produzidas por BAL (Rodriguez et al, 2000; DuToit et al, 2000; McAuliffe et al 2001; Chen e Hoover, 2003) há chances de que haja produção de bacteriocinas menos comuns ou até desconhecidas. Esse resultado evidencia a necessidade de pesquisas complementares para elucidar quais bacteriocinas são produzidas por esses isolados de BAL, e em quais circunstâncias essa produção pode ser otimizada.

Dos 43 *Enterococcus* spp. analisados, apenas 11 produziram fatores de patogenicidade, no caso a gelatinase (Tabela 10). Desses 11, 8 isolados produziram substâncias antimicrobianas de natureza protéica, ou seja, bacteriocinas. Ainda,

apenas 5 desses 11 isolados apresentaram genes de pelo menos uma das bacteriocinas pesquisadas. Esses dados revelam que em *Enterococcus* spp. ocorre a produção simultânea de fatores de patogenicidade e bacteriocinas (Eaton e Gasson, 2001). Dessa forma, cepas bacteriocinogênicas desse gênero de BAL devem ser muito bem caracterizadas, não apenas quanto à produção e diversidade de bacteriocinas produzidas, mas também quanto à patogenicidade e o potencial efeito adverso (Franz et al, 2007; Eaton e Gasson, 2001).

CONCLUSÕES

- ✓ Pode-se observar uma grande variedade de BAL antagonistas isoladas de leite cru e queijo frescal, sendo que houve predominância dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*.
- ✓ Foi verificada alta frequência de isolados produtores de substâncias antimicrobianas com sensibilidade a enzimas proteolíticas, típico de bacteriocinas, além do que, uma grande proporção dos isolados apresentou algum dos genes de bacteriocinas pesquisados.
- ✓ Também foram observados genes estruturais de nisina em outros gênero e espécies de BAL, que não *Lc. lactis*, evidenciando a necessidade de estudos futuros para verificação das características genéticas que envolvem a possível produção desta bacteriocina nesses microrganismos.
- ✓ Ao sequenciar o gene de nisina presente em alguns dos isolados, e comparar as sequências traduzidas, pôde-se observar a presença de variações nas sequências dos aminoácidos deduzidos, sendo que uma das variações observadas ainda não foi descrita pela literatura, destacando a necessidade de aprofundar as pesquisas em relação a essa alteração.
- ✓ Pelas análises fenotípicas, pôde-se observar poucos isolados identificados como *Enterococcus* spp. com características patogênicas, sendo que apenas a atividade gelatinase foi observada.
- ✓ Foi verificada produção simultânea bacteriocinas e fatores de patogenicidade, o que limitaria a aplicação de alguns isolados identificados como *Enterococcus* spp. como bioconservadores em alimentos, mas estimula o desenvolvimento de novos estudos visando o aproveitamento do potencial antimicrobiano das enterocinas produzidas.
- ✓ As BAL estudadas apresentam potencial de aplicação em alimentos, entretanto, mais pesquisas são necessárias para determinar se as bacteriocinas pesquisadas são expressas e em que condições essa expressão é favorecida, além de determinar a presença de genes de patogenicidade que poderiam inviabilizar a utilização de algumas cepas.

REFERÊNCIAS

- Abriouel, H.; Lucas, R.; Ben Omar, N.; Valdivia, E.; Maqueda, M.; Martínez-Canamero, M.; Gálvez, A. Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.383-397, 2005.
- Alegría, A.; Delgado, S.; Roces, C.; López, B.; Mayo, B. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p.61-66, 2010.
- Arauz, L. J.; Jozalaa, A. F.; Mazzola, P. G.; Penna, T. C. V. Nisin Biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.146-154, 2009.
- Avonts, L.; Uytven, E. V; De Vuyst, L. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. **International Dairy Journal**, v.14, p.947-955, 2004.
- Aymerich, T.; Martín, B.; Garriga, M.; Hugas, M. Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.4583-4594, 2003.
- Barbosa, J.; Gibbs, P. A.; Teixeira, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**, v.21, p.651-656, 2010.
- Beimfohr, C.; Ludwig, W.; Schleifer, K. H. Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and biovar. **Systematic and Applied Microbiology**, v.20, p.216-221, 1997.
- Bello, B. D.; Rantsioua, K.; Belliob, A.; Zeppaa, G.; Ambrosolia, R.; Civerab, T.; Cocolina, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.1151-1159, 2010.

- Booth, M. C.; Bogie, C. P.; Sahn, H. G.; Siezen, R. J.; Hatter, K. L.; Gilmore, M. S. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. **Molecular Microbiology**, v.21, p.1175-1184, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Revisão n.6 do compêndio da legislação de alimentos: atos do Ministério da Saúde: ABIA**, v.1, p.3-31, 1996.
- Campos, C. A.; Rodríguez, O.; Calo-Mata, P.; Prado, M.; Barros-Velázquez, J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Research International**, v.39, p.356-364, 2006.
- 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, 2007.
- Casalta, E.; Montel, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.271–273, 2008.
- Cheigh, C.; Choi, H.; Park, H.; Kim, S.; Kook, M.; Kim, T.; Hwang, J.; Pyun, Y. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. **Journal of Biotechnology**, v.95, p.225-235, 2002.
- Chen, H.; Hoover, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews Food Science**, v.2, p.82–100, 2003.
- Cheng, S.; McCleskey, F. K.; Michael, M. J.; Petroziello, J. M.; Liu, R.; Namdari, H.; Beninga, K.; Salmen, A.; Delvecchio, V. G. A PCR Assay for Identification of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1248-1250, 1997.
- 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.

- Cintas, L. M.; Casaus, P.; Håvarstein, L. S.; Hernández, P. E.; Nes, I. F. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel sec-Dependent Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4321-4330, 1997.
- Cintas, L. M.; Casaus, P.; Holo, H.; Hernandez, P. E.; Nes, I. F.; Håvarstein, L. S. Enterocins L50A and L50B, Two Novel Bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, Are Related to Staphylococcal Hemolysins. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1988-1994, 1998.
- Cleveland, J.; Montville, T. J.; Nes, I. F.; Chikindas, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001.
- Clewell, D. B. Movable genetic elements and antibiotic resistance in Enterococci. **European Journal of clinical microbiology and infectious diseases**, v.9, p.90-102, 1990.
- Coakley, M.; Fitzgerald, G.; Ros, R. P. Application and evaluation of the phage resistance- and bacteriocin encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.1434-1440, 1997.
- Connil, N.; Prévost, H.; Dousset, X. Production of biogenic amines and divercin V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.611-617, 2002.
- Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, P. R. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.777-788, 2005.
- D'angelis, C. E. M.; Polizello, A. C. M.; Nonato, M. C.; Spadaro, A. C. C.; De Martinis, E. C. P. Purification, characterization and N-terminal amino acid sequencing of sakacin 1, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* 1. **Journal of Food Safety**, v.29, p.636-649, 2009.

- De Martinis, E. C. P.; Públio, M. R. P.; Santarosa, P. R.; Freitas, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.32-37, 2001.
- De Martinis, E. C. P.; Alves, V. F.; Franco, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.114-119, 2003.
- Deegan, L. C.; Cotter, P. D.; Hill, C.; e Ross, P. R. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v.16, p.1058-1071, 2006.
- De Vuyst, L.; Foulquié M.R.; Revets, H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.299-318, 2003.
- Diep, D. B.; Håvarstein, L. S.; Nissen-Meyer J.; Nes I. F. The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, p.160-166, 1994.
- Dierksen, K. P.; Moore, C. J.; Inglis, M.; Wescombe; P. A.; Tagg, J. R. The effect of ingestion of milk supplemented with salivaricin A-producing *Streptococcus salivarius* on the bacteriocin-like inhibitory activity of streptococcal populations on the tongue. **FEMS Microbiology Ecology**, v.59, p.584-91, 2007.
- Dodd, H. M.; Horn, N.; Gason, M. J. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.555-566, 1990.
- Du Toit, M.; Franz, C. M. A. P.; Dicks, L. M. T.; Holzapfel, W. H. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.482-494, 2000.

- Dutka-Malen, S.; Evers, S.; Courvalin, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.24-27, 1995.
- Eaton, T. J.; Gasson, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.1628-1635, 2001.
- Ennahar, S.; Asou, Y.; Zendo, T.; Sonomoto, K.; Ishizaki, A. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.291-301, 2001.
- Espeche, M. C.; Otero, M. C.; Sesma, F.; Nader-Macias, M. E. F. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. **Veterinary Microbiology**, v.135, p.346–357, 2009.
- Fernández de Palencia, P.; de la Plaza, M.; Mohedano, M. L.; Martínez-Cuesta, M. C.; Requena, T.; López, P.; Peláez, C. Enhancement of 2-methylbutanal formation in cheese by using a fluorescently tagged Lacticin 3147 producing *Lactococcus lactis* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, p.335–347, 2004.
- Fleming, H. P.; Etchells, J. L.; Costilow, R. N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. **Applied Microbiology**, v.30, p.1040-1042, 1975.
- Franz, C. M. A. P.; Holzapfel, W. H.; Stiles, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.1-24, 1999.
- Franz, C. M. A. P.; Muscholl-Silberhorn, A. B.; Yousif, N. M. K.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Holzapfel, W. H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.4385-4389, 2001.
- Franz, C. M. A. P.; van Belkum, M. J.; Holzapfel, W. H.; Abriouel, H.; Gálvez, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, p.293-310, 2007.

- Galia, W.; Perrin, C.; Genay, M.; Dary, A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. **International Dairy Journal**, v.19, p.89-95, 2009.
- Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R. L.; Ben Omar, N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.51-70, 2007.
- García-Almendárez, B. E.; Cann, I. K. O.; Martin, S. E.; Guerrero-Legarreta, I.; Regalado, C. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v.19, p.670-680, 2008.
- Garneau, S.; Martin, N. I.; Vederas, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.84, p.577-592, 2002.
- Giraffa, G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-Listeria factors in dairy technology. **Food Microbiology**, v.12, p.291-299, 1995.
- Giraffa, G.; Neviani, E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.19-34, 2001.
- Giraffa, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.163-171, 2002.
- Giraffa, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.215-222, 2003.
- Giraffa, G.; Chanishvili, N.; Widyastuti, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v.161, p.480-487, 2010.
- Gomes, B. C.; Esteves, C. T.; Palazzo, I. C. V.; Darini, A. L. C.; Felis, G. E.; Sechi, L. A.; Franco, B. D. G. M.; De Martinis, E. C. P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v.25, p.668-675, 2008.

- Heller, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.374S-379S, 2001.
- Herranz, C.; Mukhopadhyay, S.; Casaus, P.; Martinez, J.; Rodriguez, J. M.; Nes, I. F.; Cintas, L. M.; Hern´andez, P. E. Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. **Current Microbiology**, v.39, p.282-290, 1999.
- Hindre, T.; Le Pennec, J.; Haras, D.; Dufour, A. Regulation of lantibiotic lactacin 481 production at the transcriptional level by acid pH. **FEMS Microbiology Letters**, v.231, p.291-298, 2004.
- Hooven, H. W.; Van den Lagerwerf, F. M.; Heerma, W.; Haverkamp, J.; Piard, J.C.; Hilbers, C. H.; Siezen, R. J.; Kuipers, O. P.; Rollema, H. S. The structure of the lantibiotic lactacin 481 produced by *Lactococcus lactis*: location of the thioether bridges. **FEBS Letters**, v.391, p.317-322, 1996.
- Hoover, D. G.; Steenson, L. R. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Academic Press, Inc. San Diego. p.274, 1993.
- Hornbæk, T.; Brockhoff, P. B.; Siegumfeldt, H.; Budde, B. B. Two subpopulations of *Listeria monocytogenes* occur at subinhibitory concentrations of leucocin 4010 and nisin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1631-1638, 2006.
- Hyink, O.; Balakrishnan, M.; Tagg, J. R. *Streptococcus rattus* strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. **FEMS Microbiology Letters**, v.252, p.235-241, 2005.
- Jack, R. W.; Sahl, H. G. Unique peptide modifications involved in the biosynthesis of lantibiotics. **Trends in Biotechnology**, v.13, p.269-278, 1995.
- Klaenhammer, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.39-86, 1993.
- Kok, J.; Buist, G.; Zomer, A. L.; Van Hijum, S. A. F. T.; Kuipers, O. P. Comparative and functional genomics of lactococci. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.411-433, 2005.

- Konings, W. N.; Kok, J.; Kuipers, O. P.; Poolman, B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p.276-282, 2000.
- Kuhnen, E.; Richter, F.; Richter, K.; Andries, L. Establishment of a typing system for group D streptococci. **Zentbl. Bakteriол. Hyg. A**, v.267, p.322-330, 1988.
- Leroy, F.; De Vuyst, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.67-78, 2004.
- Lewus, C. B.; Kaiser, A.; Montville, T. J. Inhibition of pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1683-1688, 1991.
- Liu, M.; Siezen, J. R.; Nauta, A. In silico prediction of horizontal gene transfer events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* reveals protocoooperation in yogurt manufacturing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.4120-4129, 2009.
- Makrides, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiology Reviews**, v.60, p.512-538, 1996.
- Mannu, L.; Pabaa, E. A.; Comuniana, D. R.; Zanettib, S.; Dupre, I.; Sechi, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.291-304, 2003.
- Mantovani, C. H.; Hu, H.; Worobo, R. W.; Russell, J. B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**, v.148, p.3347-3352, 2002.
- Mantovani, C. H.; 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, p.2247-2249, 2008.
- Martínez, B.; Suarez, J. E.; Rodríguez, A. Antimicrobials produced by wild lactococcal strains isolated from homemade cheeses. **Journal of Food Protection**, v.58, p.1118-1123, 1998.

- Martínez-Bueno, M.; Maqueda, M.; Gálvez, A.; Samyn, B.; Van Beeumen, J.; Coyette, J.; Valdivia, E. Determination of the gene sequence and molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.6334-6339, 1994.
- McAuliffe, O.; Ryan, M. P.; Ross, R. P.; Hill, C.; Breeuwer, P.; Abee, T. Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.439-445, 1998.
- Mohania, D.; Nagpal, R.; Kumar, M.; Bhardwaj, A.; Yadav, M.; Jain, S.; Marotta, F.; Singh, V.; Parkash, O.; Yadav, H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**, v.9, p.190-198, 2008.
- Moraes, P. M.; Perin, L. M.; Ortolani, M. B. T.; Yamazi, A. K.; Viçosa, G. N.; Nero, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT Food Science and Technology**, v.43, p.1320-1324, 2010.
- Moreno, I.; Lerayer, A. L. S.; Leitão, M. F. F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.130-136, 1999.
- Moreno, M. R. F.; Callewaert, R.; Devreese, B.; Van Beeumen, J.; De Vuyst, L. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.214-229, 2003.
- Morgan, S. M.; Galvin, M.; Kelly, J.; Ross, R. P.; Hill, C. Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1011-1016, 1999.
- Moschetti, G.; Blaiotta, G.; Villani, F.; Coppola, S. Nisin-producing organisms during traditional 'Fior di latte' cheese-making monitored by multiplex-PCR and PFGE analyses. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.109-116, 2001.

- Mulders, J. W. M.; Boerrigter, I. J.; Rollema, H. S.; Siezen, R. J.; De Vos W. M. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **European Journal of Biochemistry**, v.201, p.581-584, 1991.
- Nes, I.F.; Johnsborg, O. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.100-104, 2004.
- Nicolas, P.; Bessières, P.; Ehrlich, S. D.; Maguin, E.; van de Guchte, M. Extensive horizontal transfer of core genome genes between two *Lactobacillus* species found in the gastrointestinal tract. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p.141, 2007.
- Nishitani, Y.; Sasaki, E.; Fujisawa, T.; Osawa, R. Genotypic Analyses of Lactobacilli with a Range of Tannase Activities Isolated from Human Feces and Fermented Foods. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.109–117, 2004.
- O’Keeffe, T.; Hill, C.; Ross, P. R. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin a production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1506-1515, 1999.
- Ortolani, M. B. T.; Yamazi, A. K.; Moraes, P. M.; Viçosa, G. N.; Nero, L. A. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, p.175-180, 2010.
- Pangallo, D.; Harichova, J.; Karellova, E.; Drahovska, H.; Chovanova, K.; Ferianc, P.; Turna, J.; Timko, J. Molecular investigation of enterococci isolated from different environmental sources. **Biologia**, v.59, p.829-837, 2004.
- Perin, L. M. Caracterização de fatores interferentes na produção de bacteriocinas por Bactérias Ácido Lácticas isoladas de leite cru e queijo. 2011. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

- Piper, C.; Colin Hill, C.; Cotter, P. D.; Ross, P. R. Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. **Microbial Biotechnology**, 2010. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00207.x
- Riley, M. A.; Wertz, J. E. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. **Annual Reviews Microbiology**, v.56, p.117-37, 2002.
- Rodríguez, J. M.; Cintas, L. M.; Casaus, P.; Horn, N.; Doodl, H. M.; Hernandez, P. E.; Gasson, M. J. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, p.109-115, 1995.
- Rodríguez, E.; González, B.; Gaya, P.; Nuñez, M.; Medina, M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v.10, p.7-15, 2000.
- Rodríguez, J. M.; Martínez, M. I.; Kok, J. Pediocin PA-1, a Wide Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, p.91-121, 2002.
- Rodríguez, J. M.; Martínez, M. I.; Horn, N.; Dodd, H. M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.101-116, 2003.
- Ross, P. R.; Morgan, S.; Hill, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, p.3-16, 2002.
- Ryan, M. P.; Rea, M. C.; Hill, C.; Ross, R. P. An Application in Cheddar Cheese Manufacture for a Strain of *Lactococcus lactis* Producing a Novel Broad-Spectrum Bacteriocin, Lacticin 3147. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.612-619, 1996.
- Ryan, M. P.; Meaney, W. J.; Ross, R. P.; Hill, C. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2287-2290, 1998.

- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, 5463-5467, 1977.
- Semedo, T.; Santos, M. A.; Lopes, M. F. S.; Marques, J. J. F.; Crespo, M. T. B.; Tenreiro, R. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: A common trait in the genus? **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p.13-22, 2003.
- Singh, K. V.; Qin, X.; Weinstock, G. M.; Murray, B. E. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. **Journal of Infectious Disease**, v.178, p.1416-1420, 1998.
- Smacchi, E.; Gobbetti, M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. **Food Microbiology**, v.17, p.129-141, 2000.
- Smit, G.; Smit, B. A.; Engels, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.591-610, 2005.
- 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.
- Sterr, Y.; Weiss, A.; Schmidt, H. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p.75-82, 2009.
- Strompfova', V.; Laukova', A.; Simonova', M.; Marcin'akova, M. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. **Veterinary Microbiology**, v.132, p.293-301, 2008.
- Tagg, J. R.; McGiven, A. R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, v.21, p.943-947, 1971.
- Urso, R.; Rantsiou, K.; Cantoni, C.; Comi, G.; Cocolin, L. Sequencing and expression analysis of the sakacin P bacteriocin produced by a *Lactobacillus sakei* strain isolated from naturally fermented sausages. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.71, p.480-485, 2006.

- Valenzuela, A.S., Ben-Omar, N., Abriouel, H., Cañamero, M.M., Gálvez, A. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology* (2010), doi:10.1016/j.fm.2010.05.033.
- Velasco, D.; Perez, S.; Penã, F.; Dominguez, M. A.; Cartelle, M.; Molina, F.; Moure, R.; Villanueva, R.; Bou, G. Lack of correlation between phenotypic techniques and PCR-based genotypic methods for identification of *Enterococcus* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.49, p.151-156, 2004.
- Waters, C. M.; Antiporta, M. H.; Murray, B. E.; Dunny, G. M. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.3613-3623, 2003.
- Wescombe, P. A.; Burton, J. P.; Cadieux, P. A.; Klesse, N. A.; Hyink, O.; Heng, N. C. K.; Chilcott, C. N.; Reid, G.; Tagg, J. R. Megaplasms encode differing combinations of lantibiotics in *Streptococcus salivarius*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.90, p.269-280, 2006.
- Wirawan, R. E.; Klesse, N. A.; Jack, R. W.; Tagg, J. R. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1148-1156, 2006.

RESULTADOS DETALHADOS

Tabela 11: Apresentação dos resultados de fatores de patogenicidade apresentados pelos isolados de *Enterococcus* obtidos de leite cru e queijo frescal.

Código	Identificação	Fatores de patogenicidade			
		gelatinase	lipase	DNase	hemólise
En 01	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 02	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 03	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 04	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 05	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 06	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 07	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 08	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 09	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 10	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 11	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 12	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 13	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 14	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	α
En 15	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 16	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 17	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 18	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 19	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 20	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	-
En 21	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-
En 22	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	α
En 23	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	α
En 24	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	α
En 25	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	α
En 26	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	α
En 27	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	α
En 28	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 29	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	-
En 30	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	α
En 31	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 32	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 33	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 34	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	-
En 35	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 36	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 37	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	α
En 38	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 39	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-
En 40	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	α
En 41	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-
En 42	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	α
En 43	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	α

Tabela 12: Resultados de avaliação da sensibilidade enzimática das substâncias antimicrobianas produzidas pelos isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo fresco (adaptado de Perin, 2011).

Código	Identificação	Enzimas				
		proteinase K	tripsina	α -quimotripsina	papaína	protease
En 01	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	-	-
En 02	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	-	-
En 03	<i>Enterococcus</i>	+	-	+	-	-
En 04	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	-	-
En 05	<i>Enterococcus</i>	+	-	+	-	-
En 06	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	-	-
En 07	<i>Enterococcus</i>	+	+	-	-	-
En 08	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	+	+
En 09	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	-	+
En 10	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	+
En 11	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	-	+
En 12	<i>Enterococcus</i>	+	-	+	-	-
En 13	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 14	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 15	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 16	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	-	-
En 17	<i>Enterococcus</i>	+	+	-	-	-
En 18	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 19	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	+	+
En 20	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 21	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	+	+
En 22	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	+	-	+
En 23	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+
En 24	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	+	+
En 25	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+
En 26	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	+	-
En 27	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-	+
En 28	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	-	-
En 29	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	+	+
En 30	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+	-	-
En 31	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	+	+
En 32	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	-	-
En 33	<i>Enterococcus</i>	+	-	+	-	-
En 34	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 35	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 36	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	+	+
En 37	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	-	+
En 38	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	+	+
En 39	<i>Enterococcus</i>	+	+	+	+	+
En 40	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	-	-
En 41	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	-	-
En 42	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-	-
En 43	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+	-	-
Lb 01	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	+	+

Continuação Tabela 12

Código	Identificação	Enzimas				
		proteinase K	tripsina	α -quimotripsina	papaína	protease
Lb 02	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	-	+	-
Lb 03	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	-	-
Lb 04	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	-
Lb 05	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	-
Lb 06	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	-	+	-
Lb 07	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+	-	-
Lb 08	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	-
Lb 09	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	-
Lb 10	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	-	-	-
Lb 11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	-	-	-
Lb 12	<i>Lactobacillus sakei</i>	+	+	+	+	+
Lb 13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	-
Lb 14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	+	-
Lb 15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	-
Lb 16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	+
Lb 17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-
Lb 18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+	+	+
Lb 19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-
Lb 20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	-	-
Lb 21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	-	-	-
Lb 22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	-
Lb 23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	+	-
Lb 24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	-	-
Lb 25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	-
Lb 26	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	-
Lb 27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	+
Lc 01	<i>L lactis lactis</i>	+	-	+	-	-
Lc 02	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-	+	+
Lc 03	<i>L lactis lactis</i>	-	-	-	+	-
Lc 04	<i>L lactis lactis</i>	-	-	-	+	-
Lc 05	<i>L lactis lactis</i>	-	-	-	-	-
Lc 06	<i>L lactis lactis</i>	+	-	-	-	-
Lc 07	<i>L. lactis lactis</i>	+	-	+	-	-
Lc 08	<i>L lactis lactis</i>	+	+	+	-	+
Lc 09	<i>L lactis lactis</i>	-	+	+	-	-
Lc 10	<i>L lactis lactis</i>	+	+	+	+	+
Lc 11	<i>L lactis lactis</i>	+	+	+	-	-
Lc 12	<i>L lactis lactis</i>	+	-	+	-	-
Lc 13	<i>L lactis lactis</i>	+	+	-	-	-
Lc 14	<i>L lactis lactis</i>	-	-	-	+	-
Lc 15	<i>L lactis lactis</i>	-	-	-	-	-
Lc 16	<i>Lactococcus garviae</i>	-	-	-	+	-
Lc 17	<i>Lactococcus garviae</i>	-	-	-	-	-
Lc 18	<i>Lactococcus garviae</i>	-	-	-	-	-
Lc 19	<i>Lactococcus garviae</i>	-	-	-	-	-
Lc 20	<i>L lactis lactis</i>	+	+	+	-	-

Continuação Tabela 12

Código	Identificação	Enzimas				
		proteínase K	tripsina	α -quimotripsina	papaína	protease
Lc 21	<i>L. lactis lactis</i>	+	-	+	-	+
Lc 22	<i>L. lactis lactis</i>	+	+	+	-	-
Lc 23	<i>L. lactis lactis</i>	-	-	-	+	+
Lc 24	<i>L. lactis lactis</i>	-	-	-	-	-
Lc 25	<i>L. lactis lactis</i>	-	-	-	-	-
Lc 26	<i>L. lactis lactis</i>	-	-	-	+	+
Lc 27	<i>L. lactis lactis</i>	-	-	-	-	-
Ot 01	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	+	-	-
Ot 02	<i>Pediococcus</i>	-	-	-	+	+
Ot 03	<i>Streptococcus sp</i>	-	-	-	-	-
Ot 04	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	-

Tabela 13: Apresentação de todos os resultados genotípicos obtidos com as 101 isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo frescal: identificação molecular e presença de genes de lantibióticos (lanB,C e M) e de nisina de acordo com 3 protocolos, nisina 1 (Rodriguez et al, 2000), nisina 2 (García-Almendárez et al, 2008), e nisina 3 (multiplex adaptado de Espeche et al, 2009)

Código	Identificação	Lantibióticos			Variantes de nisina		
		lanB	lanC	lanM	Nisina 1	Nisina 2	Nisina 3
En 01	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 02	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	+		
En 03	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 04	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 05	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 06	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 07	<i>Enterococcus</i>	+	-	+	+		
En 08	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		
En 09	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		
En 10	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		-
En 11	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		
En 12	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 13	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 14	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		
En 15	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		
En 16	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 17	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		
En 18	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		
En 19	<i>Enterococcus</i>	-	+	-	-		
En 20	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 21	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-		
En 22	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-		-
En 23	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-		
En 24	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	+		
En 25	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-		
En 26	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-		
En 27	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-		
En 28	<i>Enterococcus</i>	-	+	-	-		
En 29	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	+	+	+
En 30	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-		-
En 31	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		-
En 32	<i>Enterococcus</i>	+	+	-	+		
En 33	<i>Enterococcus</i>	+	+	-	-		

Continuação Tabela 13

Código	Identificação	Lantibióticos			Variantes de nisina		
		lanB	lanC	lanM	Nisina 1	Nisina 2	Nisina 3
En 34	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 35	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		-
En 36	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		-
En 37	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-		
En 38	<i>Enterococcus</i>	-	+	-	-		-
En 39	<i>Enterococcus</i>	+	-	-	+		
En 40	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-		+
En 41	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-		-
En 42	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	-	+		
En 43	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	+	+	+
Lb 01	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	-	-		-
Lb 02	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+	-		
Lb 03	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	-	-		+
Lb 04	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+	-		
Lb 05	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-		-
Lb 06	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	-		
Lb 07	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	-
Lb 08	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+	-		
Lb 09	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	-	-		
Lb 10	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	-	-		
Lb 11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	-	-		
Lb 12	<i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	-	-		
Lb 13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	-	-		
Lb 14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	+		
Lb 15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	+		
Lb 16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	-		
Lb 17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	+		
Lb 18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb 19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	-		
Lb 20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	-		
Lb 21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	-		
Lb 22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	-		
Lb 23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	-	-		
Lb 24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-		-
Lb 25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	-	-		
Lb 26	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-		
Lb 27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	-		

Continuação Tabela 13

Código	Identificação	Lantibióticos			Variantes de nisina		
		lanB	lanC	lanM	Nisina 1	Nisina 2	Nisina 3
Lc 01	<i>L lactis lactis</i>	+	-	-	+	+	+
Lc 02	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-	-	-	-
Lc 03	<i>L lactis lactis</i>	-	-	-	-	-	-
Lc 04	<i>L lactis lactis</i>	+	+	-	+	+	+
Lc 05	<i>L lactis lactis</i>	-	+	-	+	+	+
Lc 06	<i>L lactis lactis</i>	+	-	+	+	+	+
Lc 07	<i>L. lactis lactis</i>	+	+	-	+	+	+
Lc 08	<i>L lactis lactis</i>	+	-	-	+	+	+
Lc 09	<i>L lactis lactis</i>	-	+	+	+	+	+
Lc 10	<i>L lactis lactis</i>	+	+	+	+	+	+
Lc 11	<i>L lactis lactis</i>	+	-	-	+	+	+
Lc 12	<i>L lactis lactis</i>	-	-	-	-	-	-
Lc 13	<i>L lactis lactis</i>	-	-	+	-	+	-
Lc 14	<i>L lactis lactis</i>	+	+	-	+	+	+
Lc 15	<i>L lactis lactis</i>	-	-	+	-	-	-
Lc 16	<i>Lactococcus garviae</i>	+	-	-	-	-	-
Lc 17	<i>Lactococcus garviae</i>	-	-	-	+	-	-
Lc 18	<i>Lactococcus garviae</i>	+	-	+	+	-	-
Lc 19	<i>Lactococcus garviae</i>	-	-	-	+	-	-
Lc 20	<i>L lactis lactis</i>	+	+	-	+	+	+
Lc 21	<i>L lactis lactis</i>	+	-	-	+	+	+
Lc 22	<i>L lactis lactis</i>	+	-	-	+	+	+
Lc 23	<i>L. lactis lactis</i>	+	-	-	+	+	+
Lc 24	<i>L lactis lactis</i>	+	-	-	+	+	+
Lc 25	<i>L lactis lactis</i>	-	-	-	-	-	-
Lc 26	<i>L lactis lactis</i>	-	+	-	-	-	-
Lc 27	<i>L lactis lactis</i>	-	+	-	-	-	-
Ot 01	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-
Ot 02	<i>Pediococcus</i>	-	-	+	-	-	-
Ot 03	<i>Streptococcus sp</i>	+	-	+	+	-	-
Ot 04	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	-	-

Tabela 14: Apresentação dos resultados genotípicos quanto à presença de genes de enterocinas nos 43 isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo fresco.

Código	Identificação	Enterocinas				
		L50AB	As48	P	A	B
En 01	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	-
En 02	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	+
En 03	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	-	-
En 04	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	-
En 05	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	-
En 06	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	-
En 07	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 08	<i>Enterococcus</i>	-	+	+	-	-
En 09	<i>Enterococcus</i>	-	+	+	-	-
En 10	<i>Enterococcus</i>	-	+	+	-	-
En 11	<i>Enterococcus</i>	-	+	+	-	-
En 12	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	-
En 13	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	-
En 14	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 15	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 16	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	-
En 17	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	-
En 18	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	-	-
En 19	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	-	-
En 20	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 21	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	-	-
En 22	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
En 23	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
En 24	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
En 25	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
En 26	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
En 27	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
En 28	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 29	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
En 30	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	+	-
En 31	<i>Enterococcus</i>	-	+	+	-	-
En 32	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	-	-
En 33	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 34	<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-
En 35	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	-
En 36	<i>Enterococcus</i>	-	+	+	-	-
En 37	<i>Enterococcus</i>	-	+	+	-	-
En 38	<i>Enterococcus</i>	-	+	+	-	-
En 39	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	-	-
En 40	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
En 41	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
En 42	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	-	-
En 43	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	-	-

Tabela 15: Resultados de avaliação da sensibilidade a proteases das substâncias antimicrobianas produzidas pelos 101 isolados de bactérias ácido lácticas obtidos de leite cru e queijo fresco, presença de genes de bacteriocinas e produção de fatores de patogenicidade em *Enterococcus* spp.

Código	Identificação	Sensibilidade a proteases	Genes bacteriocinas	patogenicidade
En 01	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 02	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 03	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 04	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 05	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 06	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 07	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 08	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 09	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 10	<i>Enterococcus</i>	-	+	-
En 11	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 12	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 13	<i>Enterococcus</i>	-	+	-
En 14	<i>Enterococcus</i>	-	-	+
En 15	<i>Enterococcus</i>	-	-	-
En 16	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 17	<i>Enterococcus</i>	-	+	-
En 18	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 19	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 20	<i>Enterococcus</i>	-	+	+
En 21	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	-
En 22	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+
En 23	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+
En 24	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+
En 25	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+
En 26	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-
En 27	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+
En 28	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 29	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+
En 30	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	-
En 31	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 32	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 33	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 34	<i>Enterococcus</i>	-	+	+
En 35	<i>Enterococcus</i>	-	+	-
En 36	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 37	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 38	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 39	<i>Enterococcus</i>	+	+	-
En 40	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+
En 41	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-
En 42	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+
En 43	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	-
Lb 01	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 02	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 03	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 04	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 05	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 06	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 07	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	nd
Lb 08	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd

Continuação Tabela 15

Código	Identificação	Sensibilidade a proteases	Genes bacteriocinas	patogenicidade
Lb 09	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 10	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	nd
Lb 11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	nd
Lb 12	<i>Lactobacillus sakei</i>	+	-	nd
Lb 13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	nd
Lb 18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	nd
Lb 20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	nd
Lb 25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lb 26	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	nd
Lb 27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	nd
Lc 01	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 02	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	nd
Lc 03	<i>L lactis lactis</i>	+	-	nd
Lc 04	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 05	<i>L lactis lactis</i>	-	+	nd
Lc 06	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 07	<i>L. lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 08	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 09	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 10	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 11	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 12	<i>L lactis lactis</i>	+	-	nd
Lc 13	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 14	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 15	<i>L lactis lactis</i>	-	+	nd
Lc 16	<i>Lactococcus garviae</i>	+	+	nd
Lc 17	<i>Lactococcus garviae</i>	-	+	nd
Lc 18	<i>Lactococcus garviae</i>	-	+	nd
Lc 19	<i>Lactococcus garviae</i>	-	+	nd
Lc 20	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 21	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 22	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 23	<i>L. lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 24	<i>L lactis lactis</i>	-	+	nd
Lc 25	<i>L lactis lactis</i>	-	-	nd
Lc 26	<i>L lactis lactis</i>	+	+	nd
Lc 27	<i>L lactis lactis</i>	-	+	nd
Ot 01	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-	nd
Ot 02	<i>Pediococcus</i>	+	+	nd
Ot 03	<i>Streptococcus sp</i>	-	+	nd
Ot 04	<i>Weissella cibaria</i>	+	+	nd