

RODRIGO OTÁVIO MIRANDA

**EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A CONDIÇÕES DE ESTRESSE
POR *Listeria monocytogenes* EM INTERAÇÃO COM *Lactococcus lactis*
PRODUTOR DE NISINA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M672e
2017

Miranda, Rodrigo Otávio, 1987-
Expressão de genes associados a condições de estresse por
Listeria monocytogenes em interação com *Lactococcus lactis*
produtor de nisina / Rodrigo Otávio Miranda. – Viçosa, MG,
2017.

xi, 98f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luís Augusto Nero.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. *Lactococcus lactis*. 3. Nisina.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

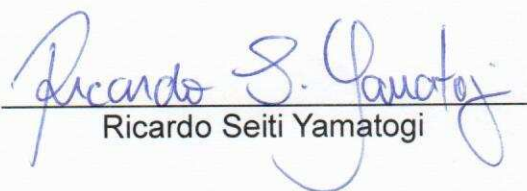
CDD 22 ed. 636.089

RODRIGO OTÁVIO MIRANDA

EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A CONDIÇÕES DE ESTRESSE POR *Listeria monocytogenes* EM INTERAÇÃO COM *Lactococcus lactis* PRODUTOR DE NISINA

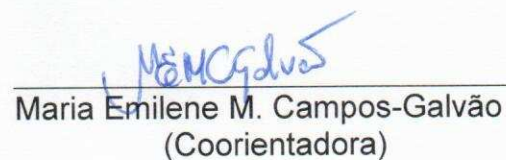
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

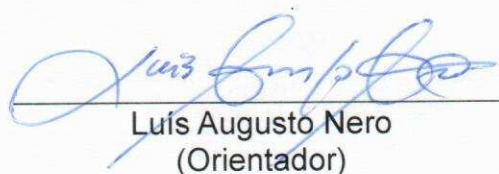
APROVADA: 26 de junho de 2017.


Ricardo Seiti Yamatogi


Luana Martins Perin


Luciano dos Santos Bersot


Maria Emilene M. Campos-Galvão
(Coorientadora)


Luis Augusto Nero
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço minha mãe, pelo amor e apoio incondicional, e por sempre ser minha fonte de inspiração. A toda minha família, em especial minha madrinha e minhas tias Ângela, Eliza e Lulu por serem o lar ao qual eu sempre posso voltar.

Agradeço ao meu orientador, Luís Augusto Nero, pelos ensinamentos e apoio em todas as etapas da minha vida acadêmica, desde a iniciação científica, o mestrado e agora o doutorado. A minha amiga e co-orientadora Emilene, que foi fundamental para que eu desenvolvesse meu trabalho, me ajudando dentro e fora do laboratório.

Às amigas da velha-guarda do laboratório Gabi, Luana e Michelle, que estiveram presentes desde o início dessa jornada. A todos os amigos e colegas do InsPOA, pela companhia e por fazer o trabalho mais divertido. Aos Beagles Val, Ísis, Louis e Carol, que estiveram desde os momentos mais divertidos até os mais difíceis. E a todos os amigos feitos em mais uma década de Viçosa, companheiros de aprendizado e de festas,

A todo pessoal do InsPOA e do Setor de Preventiva, colegas, estagiários e aos técnicos Luís e Dagoberto.

A todos os professores que compartilharam seus conhecimentos desde o ensino fundamental, a graduação, o mestrado e o doutorado.

Aos meus amigos de Barbacena, cuja amizade independe de tempo e distância.

À CAPES pela bolsa de Mestrado, e também ao CNPq e à FAPEMIG pelos financiamentos durante minha vida acadêmica.

E a todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram de alguma forma a esse trabalho.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Gênero <i>Listeria</i>	3
1.1. Listeriose humana e virulência	4
1.2. Determinantes genéticos da virulência de <i>L. monocytogenes</i>	7
1.3. Respostas de <i>L. monocytogenes</i> a condições de estresse	11
1.3.1. Estresse térmico	14
1.3.2. Estresse ácido	16
1.3.3. Estresse osmótico	19
1.3.4. Regulador geral de estresse - sigma B	20
1.4. Controle de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos	23
2. Gênero <i>Lactococcus</i> e <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	24
2.1. Características metabólicas importantes na fermentação láctea	26
2.2. Nisina	27
2.2.1. Estrutura molecular da nisina e variantes	28
2.2.2. Espectro e modo de ação	29
2.2.3. Genes e expressão gênica	30
3. Desenvolvimento de <i>Listeria</i> spp., <i>Lactococcus lactis</i> e interação em meio de cultura e alimentos	33
3.1. Desenvolvimento de <i>Listeria</i> spp. em meios de cultura e alimentos	33
3.2. Desenvolvimento de <i>L. lactis</i> em meios de cultura, leite e queijo	35

3.3. Produção de substâncias inibitórias não-bacteriocina	37
3.4. Interação de <i>Lactococcus lactis</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	38
4. Referências	44
OBJETIVOS.....	67
ARTIGO CIENTÍFICO: Expressão de genes associados a condições de estresse por <i>Listeria monocytogenes</i> em interação com <i>Lactococcus lactis</i> produtor de nisina	68
Resumo	69
Abstract	70
1. Introdução	71
2. Material e Métodos	72
2.1. Micro-organismos.....	72
2.2. Comportamento de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> em caldo BHI e leite desnatado reconstituído	73
2.2.1. Tratamentos e condições de incubação	73
2.2.2. Avaliação da população e da variação de pH dos meios	73
2.2.3. Produção de bacteriocina	74
2.3. Interação de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>L. monocytogenes</i>	74
2.3.1. Tratamentos e condições de incubação	74
2.3.2. Enumeração das populações	75
2.3.3. Produção de bacteriocina	75
2.4. Análises de expressão gênica	75
2.4.1. Amostragem e extração de RNA	75
2.4.2. Tratamento de DNase e síntese de cDNA.....	76
2.4.3. Primers utilizados	76

2.4.4. Expressão relativa de <i>nisk</i> por <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> em interação com <i>L. monocytogenes</i>	77
2.4.5. Expressão relativa dos genes de estresse de <i>L. monocytogenes</i> em interação com <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	77
2.4.6. Condições de qPCR e análise de $\Delta\Delta Ct$	79
3. Resultados e Discussão	80
Referências Bibliográficas	93
CONCLUSÕES.....	98

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Interações microbianas em queijo.39

ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1. Primers utilizados no estudo78

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1. Principais determinantes genéticos de virulência em *Listeria monocytogenes*. a. LIPI-1; b. ilhotas de internalinas. Adaptado de Vázquez-Boland e colaboradores (2001a).....7
- Figura 2. Esquema de entrada, multiplicação, movimento e propagação de *Listeria monocytogenes* em células hospedeiras. Fonte: Tilney & Portnoy (1989)9
- Figura 3. Estrutura de nisina. A e variação entre diferentes formas de nisina. A. Estrutura da molécula de nisina A. Aminoácidos não usuais: Dha: diidroalanina; Dhb: diidrobutirina; Ala-S-Ala: lantionina; Abu-S-Ala: β-metil-lantionina. B. Variação aminoacídica das diferentes formas de nisina. Adaptado de Breukink & Kruijff (1999) e Piper 2011.29
- Figura 4. Organização dos genes e operons de nisina. P: promotor independente da sinalização por nisina; P*: promotor dependente a sinalização por nisina. Lubelski et al. (2008)31

ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1. Desenvolvimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13 em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D), nas temperaturas de 20 (A, C) e 30 °C (B, D) por 24 h. linhas: população (medida de densidade óptica ou log₁₀ UFC/mL); barras: produção de nisina (UA/mL).80
- Figura 2. Desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* Scott A e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13 e produção de nisina em co-cultura em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D), a 20 (A, C) e 30 °C (B, D). Em cada gráfico, linha cinza tracejada (*L. monocytogenes* em co-cultura, log UFC/mL), linha cinza contínua (*L. monocytogenes* inoculada isolada - controle, log

UFC/mL), linha preta tracejada (*L. lactis* em co-cultura, log UFC/mL), barras cinzas (produção de nisina, UA/mL).....82

Figura 3. Expressão relativa do gene *nisK* de *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 produtor de nisina em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D) a 20 (A, C) e 30 °C (B, D) em co-cultura com *L. monocytogenes* Scott A em relação ao tempo de cultivo. O gene *tuf* foi utilizado como controle endógeno, e a expressão do gene *nisK* no tempo 0 h em cada meio foi utilizada como controle (linha vermelha) para realização da expressão relativa por RT-qPCR por análise de $\Delta\Delta Ct$85

Figura 4. Expressão relativa do gene *sigB* de *L. monocytogenes* Scott A em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D) a 20 (A, C) e 30 °C (B, D) em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 produtor de nisina. O gene *rplD* foi utilizado como controle endógeno e a expressão do gene *sigB* em cultura simples no mesmo meio e tempo de cultivo foi utilizada como controle para realização da expressão relativa por RT-qPCR por análise de $\Delta\Delta Ct$. Linha vermelha: valor referencial para variação da expressão de *sigB*.87

Figura 5. Expressão relativa do gene *gadD2* de *L. monocytogenes* Scott A em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D) a 20 (A, C) e 30 °C (B, D) em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 produtor de nisina. O gene *rplD* foi utilizado como controle endógeno e a expressão do gene *gadD2* em cultura simples no mesmo meio e tempo de cultivo foi utilizada como controle para realização da expressão relativa por RT-qPCR por análise de $\Delta\Delta Ct$. Linha vermelha: valor referencial para variação da expressão de *gadD2*. ...89

Figura 6. Expressão relativa do gene *groEL* de *L. monocytogenes* Scott A em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D) a 20 (A, C) e 30 °C (B, D) em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 produtor de nisina. O gene

rpID foi utilizado como controle endógeno e a expressão do gene *groEL* em cultura simples no mesmo meio e tempo de cultivo foi utilizada como controle para realização da expressão relativa por RT-qPCR por análise de $\Delta\Delta Ct$.
Linha vermelha: valor referencial para variação da expressão de *groEL*.90

Figura 7. Expressão relativa do gene *gbu* de *L. monocytogenes* Scott A em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D) a 20 (A, C) e 30 °C (B, D) em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 produtor de nisina. O gene *rpID* foi utilizado como controle endógeno e a expressão do gene *gbu* em cultura simples no mesmo meio e tempo de cultivo foi utilizada como controle para realização da expressão relativa por RT-qPCR por análise de $\Delta\Delta Ct$. Linha vermelha: valor referencial para variação da expressão de *gbu*.92

RESUMO

MIRANDA, Rodrigo Otávio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2017. **Expressão de genes associados a condições de estresse por *Listeria monocytogenes* em interação com *Lactococcus lactis* produtor de nisina.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientadora: Maria Emilene Martino-Campos Galvão.

A utilização de cepas fermentadoras de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produtoras de nisina em alimentos fermentados tem vantagem para a indústria pois permite um controle adicional de contaminantes, como o patógeno de origem alimentar *Listeria monocytogenes*. No entanto, as interações microbianas devem ser avaliadas para garantir a produção da bacteriocina no alimento e o efeito na população do patógeno. *L. monocytogenes* tem a capacidade de resistir a diversas condições de estresse encontradas no alimento e durante o processamento, expressando diferentes genes como o fator sigma alternativo (*sigB*), a enzima glutamato descarboxilase (*gadD*), a chaperona GroEL e o transportador de glicina betaína (*gbu*). A exposição a uma condição de estresse em nível subletal é capaz de conferir uma maior resistência a *L. monocytogenes* de sobreviver a outras situações. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de genes de estresse de *L. monocytogenes* em interação com *L. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina em meio de cultura e leite. A produção de nisina em caldo BHI e leite foi avaliada por sua detecção no sobrenadante do meio de crescimento e pela expressão do gene *nisK*. A expressão dos genes de estresse de *L. monocytogenes* *sigB*, *gadD2*, *groEL* e *gbu* foi avaliada relativamente a cultura pura e na interação com *L. lactis* subsp. *lactis*. A expressão relativa dos genes de estresse de *L. monocytogenes* foi variável. No entanto, a expressão dos genes *sigB*, *groEL* e *gbu* foi inferior no tempo de 24 h durante a interação, em relação a cultura pura, o que pode indicar uma menor capacidade de sobrevivência aos estresses quando a bactéria se encontra em interação com *L. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina.

ABSTRACT

MIRANDA, Rodrigo Otávio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2017.
Expression of genes associated with stress conditions by *Listeria monocytogenes* in interaction with nisin producer *Lactococcus lactis*.
Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Maria Emilene Martino-Campos Galvão.

The use of nisin producing fermentative strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in fermented foods has an advantage for the industry because it allows an additional control of contaminants, such as the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. However, microbial interactions should be evaluated to ensure bacteriocin production in the food and the effect on the pathogen population. *L. monocytogenes* has the ability to withstand the various stress conditions encountered in food and during processing, expressing different genes such as the alternative sigma factor (*sigB*), the glutamate decarboxylase enzyme (*gadD*), the GroEL chaperone and the glycine betaine transporter (*gbu*). The exposure to a stress condition at the sublethal level is able to confer a greater resistance to *L. monocytogenes* to survive other situations. In this context, the aim of this work was to evaluate the expression of *L. monocytogenes* stress genes in interaction with nisin producing *L. lactis* subsp. *lactis* in culture medium and milk. The production of nisin in BHI broth and milk was evaluated by its detection in the supernatant of the growth medium and by the expression of the *nisK* gene. Expression of *sigB*, *gadD2*, *groEL* and *gbu* stress genes of *L. monocytogenes* was evaluated for pure culture and for the interaction with *L. lactis* subsp. *lactis*. The relative expression of the *L. monocytogenes* stress genes was variable. However, expression of the *sigB*, *groEL* and *gbu* genes was lower at 24 h during interaction than in pure culture, which may indicate a lower ability to survive stress when the bacterium is interacting with nisin producing *L. lactis* subsp. *lactis*.

INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é o agente etiológico da listeriose, doença de origem alimentar que, apesar de apresentar baixa morbidade, possui alta taxa de mortalidade para grupos de risco, como gestantes e imunocomprometidos. Diversos genes estão relacionados com a virulência de *L. monocytogenes*, que permitem a entrada do patógeno em células hospedeiras, a multiplicação no citoplasma e a movimentação intercelular.

Devido a sua veiculação por alimentos, *L. monocytogenes* é submetida a diversas condições estressantes durante o processamento e estocagem. A capacidade de sobreviver a essas condições está relacionada à expressão de diferentes genes, como o regulador geral de estresse *sigB*, e genes específicos envolvidos em estresses, como ácido (*gadD*), térmico (chaperonas) e osmótico (transportadores de solutos compatíveis).

O controle de *L. monocytogenes* em alimentos é importante nas diversas etapas da produção, desde a obtenção da matéria prima, passando pelo processamento, e finalmente na estocagem e durante a manipulação direta pelos consumidores. Apesar deste patógeno ser susceptível à maioria dos tratamentos térmicos, a contaminação pode ocorrer após o processamento, devido a sua grande capacidade em permanecer no ambiente de processamento. Dessa maneira, a inclusão de um controle no produto aumenta a segurança em relação a esse micro-organismo nos alimentos. A utilização de bacteriocinas, em especial a nisina, tem como finalidade esse tipo de controle.

Nisina é uma bacteriocina da classe dos lantibióticos, produzida por alguns isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Diversos genes são importantes para sua síntese (desidratação de aminoácidos, ciclização de partes

da molécula), sua exportação e a auto-imunidade da bactéria produtora. Essa bacteriocina apresenta capacidade bactericida e bacteriostática para bactérias Gram positivas, como *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. Nisina apresenta a certificação GRAS para alimentos, podendo ser utilizada por ser reconhecidamente segura para consumo humano. A sua incorporação no alimento pode ser realizada pela adição do peptídeo pré-purificado, ou pela fermentação *in situ* no alimento por cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* produtoras de nisina.

A aplicação de *L. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina na fermentação de produtos deve ser corretamente avaliada para garantir a produção da bacteriocina no alimento. Além disso, essa bactéria é capaz de produzir outros compostos com atividade antimicrobiana, como ácidos orgânicos, auxiliando no controle microbiano. Nesse sentido, são necessários estudos para verificar a interação das bactérias fermentadoras com contaminantes como *L. monocytogenes*, para avaliar como a produção de bacteriocina e outros compostos microbianos pode modificar a fisiologia bacteriana e as respostas às diferentes condições de estresse encontradas nos alimentos. Diferentes condições de estresse subletais podem levar a resistência cruzada a outras condições, aumentando a capacidade da bactéria em permanecer no alimento e até mesmo se multiplicar.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de genes associados a condições de estresse de *L. monocytogenes* em interação com uma cepa fermentadora de *L. lactis* subsp. *lactis* produtora de nisina em meio de cultura e leite

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Gênero *Listeria*

O gênero *Listeria* compreende bacilos Gram positivos, medindo 0,5 µm de diâmetro e 1-2 µm de comprimento, não formadoras de cápsulas ou esporos. Apresentam flagelos peritríquios responsáveis pelo movimento dependente da temperatura. O conteúdo C + G de DNA está entre 36 e 42%, enquadrando o gênero no Filo Firmicutes, e tendo similaridade com os gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* (Rocourt & Buchrieser, 2007). A primeira descrição do gênero foi feita por Murray, Webb e Swann em 1926, quando observaram a morte de filhotes de coelhos em 1924 no Departamento de Patologia de Cambridge (Murray et al., 1926). Devido à característica de intensa leucocitose mononuclear, eles deram o nome genérico de *Bacterium monocytogenes* para o isolado. Em 1927, Pirie isolou o mesmo agente etiológico de ratos do deserto mortos na África do Sul, dando o nome de *Listerella hepatolytica* 1, em homenagem a Lord Lister, famoso pesquisador de nomenclatura bacteriológica (Pirie, 1927). Devido à atribuição prévia de outros gêneros com o mesmo nome, em 1940 Pirie propôs o nome *Listeria*, que se mantém até os dias de hoje (Pirie, 1940).

Ecologicamente, as espécies de *Listeria* podem ser consideradas ubiqüitárias. Características de desenvolvimento, como alta tolerância a sais, resistência a baixa atividade de água, faixas amplas de pH e multiplicação em baixas temperaturas fazem com que esses micro-organismos se adaptem a diversos habitats (Sauders & Wiedmann, 2007). Seu habitat mais comum é o solo e material vegetal em decomposição. No entanto, a capacidade de formar

biofilmes leva à colonização de diversos ambientes (Møretrø & Langsrud, 2004), incluindo equipamentos de produção agrícola e ambientes de produção de alimentos (Carpentier & Cerf, 2011).

As espécies mais reconhecidas desse gênero são *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*. Com a maior acessibilidade de técnicas moleculares de sequenciamento, um maior número de espécies de *Listeria* tem sido descrito, como *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis* (Graves et al., 2010; Leclercq et al., 2010; Bertsch et al., 2013; Halter et al. 2013; den Bakker et al., 2014; Weller et al., 2015). Dentre essas espécies, se destacam *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* que são patógenos oportunistas dos humanos e animais (Gouin et al., 1994).

1.1. Listeriose humana e virulência

L. monocytogenes é um patógeno oportunista dos humanos e de diversos animais, incluindo os domésticos. Diversos surtos de listeriose foram descritos desde 1929, porém apenas na década de 1980 determinou-se que a principal forma de transmissão do patógeno é a via alimentar (Schlech et al., 1983; Fleming et al., 1985).

A listeriose se apresenta com mais frequência em populações de risco, como mulheres grávidas, idosos, recém-nascidos e pessoas com sistema imune fragilizado, como pacientes com câncer, transplantados e portadores de AIDS/HIV (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Dessa maneira, sua morbidade é baixa, estimada entre 0,36 e 5 casos por milhão de pessoas nos países

desenvolvidos (Ferreira, 2014). No entanto, devido a maior fragilidade da saúde dessa população, a taxa de mortalidade pode chegar a mais de 30%, diferentemente das outras doenças de origem alimentar mais comuns. Segundo dados recentes do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), no ano de 2016, ocorreram 127 casos de listeriose nos Estados Unidos, contabilizando 17 mortes e uma mortalidade de 13,4% (Marder et al., 2017).

Após a ingestão de alimento contaminado com *L. monocytogenes*, o micro-organismo é capaz de entrar pelo epitélio intestinal pelas células M das placas de Peyer (Siebers & Finlay, 1996) ou pelas células epiteliais (Karusanagar et al., 1994). Após essa entrada, *L. monocytogenes* pode infectar macrófagos, podendo ser levada a outros órgãos pela via sanguínea ou linfática (Uranue, 1997). Frequentemente, o patógeno segue para o fígado (Marco et al, 1997), onde hospedeiros saudáveis são capazes de eliminar o patógeno. Quando o sistema imune não responde eficientemente, *L. monocytogenes* pode atingir novamente a via sanguínea, levando a uma bacteremia, septicemia e infecção de outros órgãos (Conlan & North, 1994, Drevets & Bronze, 2008). Devido a essa rota específica de infecção, o período de incubação da listeriose pode passar de 30 dias, o que dificulta a notificação e o rastreamento de possíveis surtos (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

A listeriose pode se apresentar clinicamente em diferentes formas, dependente do grupo afetado e do grau de contaminação do alimento que deu origem à doença. Em mulheres grávidas, a listeriose pode se apresentar como perda fetal, natimorto, parto prematuro ou infecção neonatal (Poulsen & Czuprynski, 2013). No entanto, os sintomas na mulher grávida são pouco específicos, frequentemente descritos como resfriado, incluindo febre, dor de

cabeça, mialgia e distúrbios gastrointestinais (Lamont et al., 2011). A colonização do útero grávido por *L. monocytogenes* leva aos problemas de perda fetal e também à infecção do feto. A infecção do feto pode ser precoce ou tardia. Na forma precoce, a infecção ocorre no útero, e a doença se manifesta na primeira semana de vida, sendo mais comum a sepsise que a meningite, e tendo como sintomas, dificuldade respiratória, febre e anormalidades neurológicas. Na fase tardia, a infecção ocorre provavelmente pela passagem do recém-nascido pelo canal vaginal em mulheres sem histórico de problemas de gravidez. A infecção nosocomial também pode ocorrer. Nesses casos, a forma mais comum da doença é a meningite, com taxas de mortalidade entre 20 e 30% (Painter & Stutsker, 2007).

Casos de listeriose invasiva em adultos se apresentam como septicemia, meningite ou meningoencefalite, e a fatalidade é aproximadamente 30%. Os sintomas das fases nervosas da listeriose são: febre, indisposição, convulsão e estado mental alterado (Painter & Stutsker, 2007).

A doença não invasiva causada por *L. monocytogenes* se apresenta como uma doença gastrointestinal febril, observada principalmente em hospedeiros sem condições debilitantes. Essa forma de infecção é autolimitante, e possui um período de incubação médio de um dia (Ooi & Lorber, 2005). A primeira descrição dessa síndrome ocorreu por consumo de leite com chocolate em um piquenique nos Estados Unidos, em que o alimento estava altamente contaminado com *L. monocytogenes* (10^9 UFC/mL) (Dalton et al., 1997). Dessa maneira, a manifestação dessa doença depende de alta carga infectante do alimento.

1.2. Determinantes genéticos da virulência de *L. monocytogenes*

O genoma de *L. monocytogenes* EGD-e, utilizado como referência, apresenta um tamanho de 2,9 Mb, e 2.867 genes putativos para proteínas. Quando comparado com *L. innocua*, uma espécie próxima, geralmente considerada apatogênica, podem ser notadas pequenas diferenças genéticas (Glaser et al., 2001). Em especial, uma região do cromossomo das espécies patogênicas, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, se destaca (Gouin et al., 1994). Essa região é denominada LIPI-1 e constitui uma ilha de patogenicidade, porém aparenta ter perdido sua mobilidade na história evolutiva das espécies (Vázquez-Boland et al., 2001a). Além dos genes contidos nesta ilha genômica, outros genes distribuídos pelo cromossomo também são importantes na patogenia de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, em especial genes que codificam proteínas denominadas internalinas, que podem estar organizadas como ilhotas (Figura 1 (Dramsi et al., 1997).

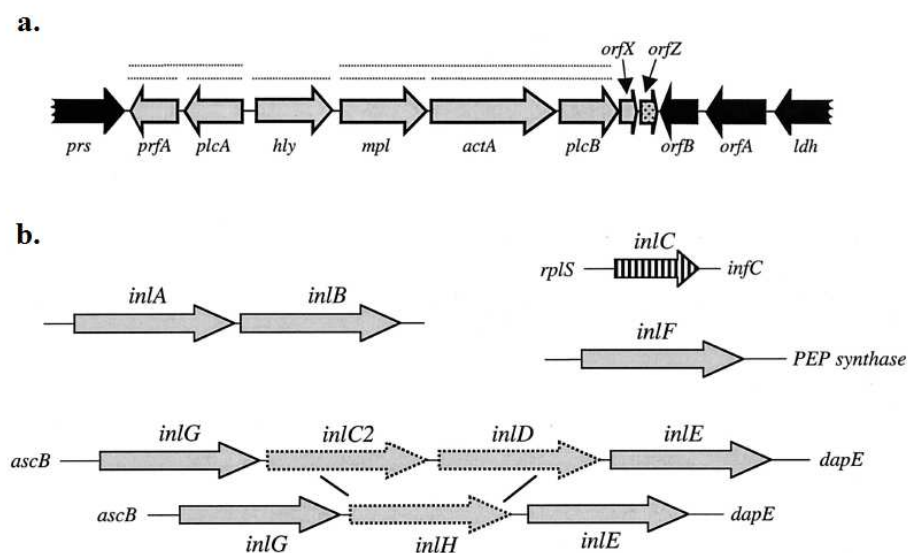


Figura 1. Principais determinantes genéticos de virulência em *Listeria monocytogenes*.
a. LIPI-1; b. ilhotas de internalinas. Adaptado de Vázquez-Boland e colaboradores (2001a).

A invasão, proliferação e dispersão de *L. monocytogenes* em células eucarióticas apresentam fases bem distintas e têm uma regulação complexa. Em especial, o produto do gene *prfA* da LIPI-1 tem papel importante na regulação da virulência de *L. monocytogenes*, em comparação com a vida saprófita (Kreft & Vázquez-Boland, 2001). O gene *prfA* codifica a proteína PrfA, que é um regulador transcricional dos principais genes de virulência descritos para *L. monocytogenes*, incluindo sua própria transcrição, participando, portanto, de um controle de retroalimentação positivo. No entanto, sua expressão é regulada pela temperatura: abaixo de 30 °C, temperatura condizente com um ambiente saprofítico para o patógeno, a região 5' não traduzível (5'-UTR) do mRNA de *prfA* é capaz de assumir uma estrutura secundária que impede a ligação do ribossomo, impossibilitando a sua tradução. A partir de uma elevação de temperatura, com ideal de 37 °C, temperatura encontrada no organismo hospedeiro, esse RNA termo-sensor perde a estrutura secundária e possibilita uma rápida tradução de PrfA (de las Heras et al., 2011).

Estudos com *prfA* mutante e com carvão ativado comprovam a necessidade de um cofator para a sua atividade reguladora transcricional; porém, esse cofator ainda é desconhecido (Vega et al., 2004). Ativado, o PrfA reconhece uma região palindrômica do promotor dos genes de virulência, com sequência consenso TTAACANNTGTTAA. Essa sequência não se apresenta idêntica para todos os promotores, e as diferenças influenciam a regulação da expressão dos mRNAs em relação ao tempo e a quantidade de proteínas a serem expressas (Milohanic et al., 2003).

A Figura 2 apresenta as fases da infecção das células epiteliais intestinais por *L. monocytogenes*. Ao entrar em contato com células não fagocitárias intestinais, moléculas do envelope celular denominadas internalinas

promovem a internalização da bactéria. InIA e InIB são as internalinas mais estudadas, porém outras moléculas homólogas podem ser encontradas no genoma (Vázquez-Boland et al., 2001a). O principal receptor reconhecido pelas internalinas é a E-caderina (Schubert et al., 2002), proteína de membrana da região basolateral dos enterócitos; porém, outras moléculas também são reconhecidas, especialmente pela InIB, como gC1q-R (Braun et al., 2000), receptor tirosina quinase Met e glucosaminoglicanos (GAGs) (Kuhn & Goebel, 2007). O reconhecimento acontece por meio de repetições ricas em leucina que são conservadas em todas as internalinas (Lecuit et al., 1997). Após a ligação, as internalinas acionam diversas moléculas de interação com o citoesqueleto, promovendo a internalização da bactéria no interior de um vacúolo (Pizarro-Cerdá et al., 2004).

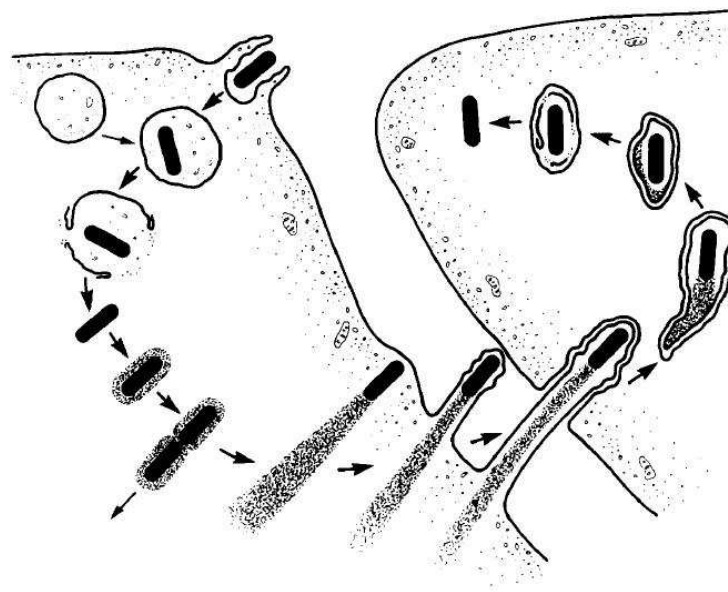


Figura 2. Esquema de entrada, multiplicação, movimento e propagação de *Listeria monocytogenes* em células hospedeiras. Fonte: Tilney & Portnoy (1989)

Esse vacúolo fagocítico pode se fundir com lisossomos celulares, levando a uma queda brusca do pH interno, o que levaria a destruição das

células bacterianas. No entanto, *L. monocytogenes* é capaz de escapar desse vacúolo a partir da destruição de sua membrana. Os produtos de quatro genes estão envolvidos com essa estratégia de virulência: *hly*, *plcA*, *plcB* e *mpl*. O gene *hly* dá origem a uma proteína denominada listeriolisina O (LLO), uma toxina formadora de poros, ativada por tiol e dependente de colesterol (CDTX) (Geoffroy et al., 1987). Essa proteína é capaz de formar poros em membranas celulares contendo colesterol, característica das membranas das células humanas, e tem atividade ótima em pH 5,5, pH encontrado no interior do fagossomo (Beauregard et al., 1997). Dessa maneira, a atividade da LLO é específica para o fagossomo, impedindo a danificação da membrana celular da célula hospedeira, e da própria *L. monocytogenes*. Os genes *plcA* e *plcB* dão origem a duas fosfolipases C, fosfatidilinositol e fosfatidilcolina específicas, respectivamente. Juntamente com a LLO, essas enzimas são responsáveis pelo escape do fagossomo e pelo ataque aos lipídeos da membrana (Smith et al., 1995). O gene *mpl* codifica uma metaloprotease, responsável pelo processamento extracelular da pró-enzima fosfolipase fosfatidilcolina específico (PlcB) (Bitar et al., 2008).

Com o escape do fagossomo, *L. monocytogenes* se encontra no compartimento citoplasmático da célula hospedeira, onde consegue se multiplicar (Marquis et al., 1993). A partir da expressão da proteína ActA, a bactéria consegue polimerizar actina e outros componentes do citoesqueleto da célula hospedeira de uma forma polarizada, adquirindo motilidade intra e intercelular, característica observada com técnicas de fluorescência e descritas como “cauda de cometa” (Dabiri et al., 1990; Kocks et al., 1992; Loisel et al., 1999). Ao atingir a extremidade de uma célula, *L. monocytogenes* consegue formar protrusões parecidas com microvilosidades, conseguindo invadir a

superfície de células vizinhas (Tilney & Portnoy, 1989). Esta invasão leva a fagocitose da bactéria em um vacúolo de dupla membrana, que é posteriormente lisado com a ação da LLO e das fosfolipases C (Smith et al., 1995). Dessa maneira, *L. monocytogenes* consegue se propagar entre células vizinhas, evitando a passagem pelo interstício celular, e escapando do sistema imune. A mesma capacidade de invadir células vizinhas permite a colonização de macrófagos, permitindo a bactéria atingir o sistema circulatório e linfático, e permitindo o acesso a outros tecidos do organismo hospedeiro.

Outros fatores são também importantes para a virulência de *L. monocytogenes*, porém não estão intimamente relacionados à invasão das células hospedeiras (Vázquez-Boland et al., 2001b). Entre eles podem ser citados: hidrolase de sais biliares, conferindo resistência à passagem do intestino delgado (Dussurget et al., 2002); p60, proteína envolvida na divisão celular e associada à fagocitose (Pilgrim et al., 2003); superóxido dismutase e catalase, envolvidas na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (Haas & Goebel, 1992); mediadores de resposta a estresse, como ClpC e ClpE; e sistemas de captação de ferro, elemento importante para a sobrevivência do patógeno e pouco disponível no organismo hospedeiro (Nair et al., 1999; Nair et al., 2000).

1.3. Respostas de *L. monocytogenes* a condições de estresse

L. monocytogenes possui uma grande quantidade de fatores de virulência que permitem a colonização de um hospedeiro (Vázquez-Boland et al., 2001a). Sua característica ubiqüitária é demonstrada pela sua presença em material vegetal, alimento animal, ambiente de produção e fabricação de alimentos e no próprio alimento. Durante sua presença nesses ambientes

diversos, as células de *L. monocytogenes* estão frequentemente sujeitas a situações não ideais para a multiplicação celular, enfrentando alterações de temperatura, pH, osmolaridade, além da presença de substâncias inibitórias ou letais para a célula (Freitag et al., 2009). Nesse contexto, *L. monocytogenes* depende de diferentes respostas fisiológicas para permitir a sobrevivência nessas condições de estresse. Uma grande variedade de genes é expressa nessas condições, tendo uma regulação dependente da capacidade das células detectarem as condições adversas de multiplicação (Hill et al., 2002).

A capacidade de *L. monocytogenes* em sobreviver nessas condições adversas é tão importante para que ocorra a listeriose quanto os genes de virulência, já que a presença de células viáveis no momento do consumo do alimento pelo hospedeiro é a etapa inicial para a transmissão do patógeno e desenvolvimento da listeriose (Vázquez-Boland et al., 2001a). As condições de estresse são encontradas durante o processamento e nos alimentos, como processos térmicos e refrigeração, fermentação, adição de sais, açúcares e conservantes (Lado & Yousef, 2007). A tecnologia de barreiras é uma prática adotada pela indústria alimentícia, consistindo na utilização de diversos fatores de redução da contaminação ou do desenvolvimento microbiano, evitando-se assim uma exposição desproporcional de apenas um fator, por exemplo, uma temperatura muito elevada, que diminuiria o valor nutricional do alimento (Leistner, 2000). As condições de processamento definidas como barreiras devem ser adequadas para inibir o desenvolvimento ou eliminar os micro-organismos. Falhas nessas condições podem levar a resposta da bactéria contra esse estresse, que frequentemente possibilita uma resposta cruzada a estresses relacionados (Casey et al., 2014). Dessa maneira, as barreiras subsequentes

podem não ser suficientes para garantir o controle de *L. monocytogenes* e outros micro-organismos.

A resposta cruzada a condições de estresse é característica de diversos micro-organismos, incluindo *L. monocytogenes*. Essa resposta é observada após a exposição a uma condição de estresse não letal, levando a uma adaptação da célula e capacidade de sobrevivência a mesma condição em intensidade maior e a outros tipos de estresse (Lou & Yousef, 1997). Apesar da atenção voltada à resposta a condições de estresse por *L. monocytogenes* no alimento e no ambiente de processamento, essas respostas também são encontradas durante a fase patogênica da bactéria dentro do hospedeiro. Após a ingestão do alimento, as células de *L. monocytogenes* devem sobreviver à acidez estomacal, a uma mudança drástica da temperatura ambiental, à presença de sais biliares e ácidos de cadeia curta, às variações de osmolaridade do trato gastro-intestinal, à competição de nutrientes no lúmen intestinal, à presença de substâncias inibitórias do hospedeiro e da microbiota residente e ao ambiente hostil do fagolisossomo após a internalização das células intestinais (Flint et al., 2016). Dessa maneira, diversos genes associados ao estresse estão envolvidos na patogenicidade de *L. monocytogenes*, e a pré-adaptação a essas condições no alimento pode levar a uma elevada capacidade desse micro-organismo de sobreviver no hospedeiro após a ingestão desse alimento contaminado (Gahan & Hill, 2014).

Dentre as condições de estresse enfrentadas por *L. monocytogenes*, alterações na temperatura (estresse térmico), acidez (estresse ácido) e pressão osmótica (estresse osmótico) são as mais frequentemente encontradas no processamento dos alimentos e no hospedeiro.

1.3.1. Estresse térmico

A faixa ótima de multiplicação de *L. monocytogenes* se encontra entre 30-37 °C (McLauchlin & Rees, 2009). As macromoléculas presentes na célula, tanto no envelope celular como no citoplasma, são evolutivamente adaptadas para seu melhor funcionamento nessa faixa de temperatura (Somero, 1995). No entanto, uma alteração do ambiente para uma temperatura mais elevada, porém não letal, acarretará em diversos processos nocivos para a célula. A principal alteração ocorre a nível estrutural das proteínas, que perdem sua conformação nativa (Elias et al., 2014). Essa perda de conformação é prejudicial para a célula devido à redução na sua capacidade metabólica ou estrutural, e também devido à exposição de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes no núcleo da proteína. Essa exposição de resíduos hidrofóbicos pode levar a interações proteicas e precipitação citoplasmática, o que é extremamente tóxico para a célula (Bednarska et al., 2013).

A resposta celular a esse tipo de estresse é denominada resposta ao choque térmico, e é altamente conservada em diversos organismos (Feder & Hofmann, 1999). Ela consiste no aumento da expressão de diversas proteínas envolvidas no correto dobramento proteico, denominadas chaperonas (Saibil, 2013), ou na degradação de proteínas incorretamente dobradas, as proteases (Olivares et al., 2015). As chaperonas e proteases são constitutivamente expressas na célula, mesmo em condições normais de desenvolvimento, devido a sua necessidade no processamento proteico. No entanto, ao entrar em choque térmico há um aumento da necessidade dessas proteínas no citoplasma (Schumann, 2016).

As principais chaperonas expressas no choque térmico são GroEL/S, DnaK e DnaJ. O complexo proteico de GroES/GroEL é um heptâmero que tem a aparência de um “barril”. No interior desse “barril” é formado um ambiente hidrofóbico onde as proteínas a serem redobradas passam para adquirir uma nova conformação. A energia de ATP é utilizada na função dessa chaperona, e frequentemente uma proteína necessita de várias interações para ser corretamente dobrada (Hayer-Hartl et al., 2016). DnaK e DnaJ estão envolvidas principalmente na ligação de proteínas durante sua tradução no ribossomo, impedindo o dobramento precoce, garantindo a correta formação dos domínios das proteínas (Willmund et al., 2013). Também apresentam a função de identificação de proteínas incorretamente dobradas e apresentação a proteases para degradação (Priya et al., 2013).

Diferentemente de *Escherichia coli* e outras bactérias Gram negativas, que possuem um fator sigma dedicado ao estresse térmico (σ^{32}) (Arsène et al., 2000), *L. monocytogenes* apresenta uma regulação da expressão de chaperonas baseada em um fator transcricional negativo denominado HrcA (Hanawa et al., 2000). Esse fator transcricional é constitutivamente expresso, porém seu correto dobramento depende da interação com a chaperona GroEL/S após sua tradução no ribossomo, permitindo sua ligação em uma região dos promotores por ele regulados denominada CIRCE (do inglês “controlling inverted repeat of chaperone expression” - ou repetição invertida de controle da expressão de chaperona) (Zuber & Schumann, 1994). Quando a célula se encontra em uma situação de estresse térmico, um maior número de proteínas no citoplasma se encontra desnaturado, levando a uma menor disponibilidade de GroEL/S, reduzindo a concentração do regulador negativo HrcA na sua forma nativa (Schumann, 2003). Dessa maneira, os promotores regulados se

encontram disponíveis para ligação da RNA-polimerase e podem transcrever as chaperonas e outras proteínas do choque térmico.

As proteases de choque térmico formam um complexo, contendo uma subunidade com capacidade proteolítica (ClpP) que se liga a diferentes subunidades com função de quebra de ATP. Essa ligação torna o complexo uma potente serina protease, capaz de degradar proteínas tóxicas no citoplasma (Frees et al., 2007). As principais subunidades ATPase descritas em *L. monocytogenes* são as ClpB (Chastanet et al., 2004), ClpC (Rouquette et al., 1996) e ClpE (Nair et al., 1999).

A regulação da expressão das proteases Clp em *L. monocytogenes* é semelhante à de *Bacillus subtilis*. A expressão dessas proteínas é reprimida pela proteína CtsR, que se liga no promotor dos genes expressos em sítios de ligação da subunidade σ^A da RNA-polimerase (Nair et al., 2000). O repressor CtsR é transcrito em um operon contendo o gene *clpC* e outros dois genes regulatórios, *mcsA* e *mcsB*. MrsB possui atividade tirosina quinase, capaz de fosforilar MrsA, que por sua vez doa o fosfato a CtsR levando a sua degradação (Kirstein et al., 2005). Essa cascata de fosforilação é dependente da ativação do choque térmico, quando há uma indisponibilidade de ClpC, que tem a função de inibir a atividade de tirosina quinase de MrsB (Kirstein & Turgay, 2006).

1.3.2. Estresse ácido

L. monocytogenes pode se desenvolver em uma ampla faixa de pH (McLauchlin & Rees, 2009). No entanto, quando o meio externo se encontra fora da neutralidade, a célula mantém o pH intracitoplasmático numa faixa fisiologicamente adequada (Krulwich et al., 2011). Nesse aspecto, a presença de

ácidos orgânicos fracos no ambiente tem um papel importante no estresse ácido. Fora da célula, com um pH reduzido, esses ácidos se encontram na forma indissociada, podendo atravessar a membrana citoplasmática. Uma vez no citoplasma, o pH mais elevado leva a protonação desse ácido, e a diminuição do pH intracelular (Cotter & Hill, 2003). Essa redução de pH é tóxica para célula, levando a redução da atividade de proteínas do citoplasma e a perda do potencial de membrana de prótons, importante em fatores como a geração de ATP e força próton motora (Krulwich et al., 2011).

Para sobreviver nessas condições, *L. monocytogenes* remove o íon H⁺ em excesso do citoplasma de diferentes maneiras. As principais formas de redução da acidificação do citoplasma consistem na descarboxilação e na deaminação de aminoácidos e na utilização da bomba de prótons para bombear o H⁺ citoplasmático para o exterior celular (Smith et al., 2013).

A principal reação ao estresse ácido em *L. monocytogenes* é a descarboxilação do aminoácido glutamato. Nesse processo, ocorre a formação de ácido γ -aminobutírico (GABA) e CO₂ através da ação da enzima glutamato-descarboxilase (GadD), sendo consumido um próton no processo. A principal fonte de glutamato é extracelular, dessa maneira a célula utiliza um sistema de transportadores de membrana para trocar o GABA pelo glutamato, denominado glutamato GABA antiporter (GadT) (Cotter et al., 2001). Já foram descritos diferentes genes relacionados ao sistema de descarboxilação de glutamato em *L. monocytogenes*, em especial dois sistemas denominados *gadD1T1*, *gadD2T2* e um gene separado *gadD3* (Gahan & Hill, 2014). O primeiro sistema aparenta ter maior atividade em condições de acidez mediana, e está ausente em isolados do sorotipo 4b (Cotter et al., 2005; Chen et al., 2012). A expressão das proteínas envolvidas no sistema de descarboxilação de glutamato é coordenada pelo fator

sigma alternativo σ^B , responsável pela transcrição de genes da fase estacionária de multiplicação celular e em outras respostas a diferentes condições de estresse (Wemekamp-Kamphuis et al., 2004).

Uma segunda forma de aumentar o pH citoplasmático encontrada por *L. monocytogenes* é a deaminação do aminoácido arginina. Nesse processo, várias reações levam a formação de ornitina, NH_3 , CO_2 e ATP a partir da arginina. As duas moléculas de NH_3 geradas nesse sistema podem combinar com H^+ citoplasmático, formando íon amônio (NH_4^+) aumentando o pH interno da célula (Gruening et al., 2006). A regulação da expressão gênica do sistema de deaminação de arginina envolve uma rede complexa envolvendo σ^B , PrfA e o regulador transcricional ArgR (Ryan et al., 2009).

A bomba de prótons celular $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ é utilizada na geração de ATP por micro-organismos capazes de respirar oxigênio quando acoplada a cadeia transportadora de elétrons (Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1996). *L. monocytogenes* aparenta não possuir uma cadeia transportadora de elétrons completa, porém pode utilizar a ATPase para produção de energia utilizando alguns aminoácidos (Cotter et al., 2000). No entanto, em condições de acidificação do citoplasma, onde a proporção de H^+ intra e extracitoplasmática se inverte, essa bomba de prótons pode consumir ATP para eliminar o excesso de prótons do citoplasma (Cotter & Hill, 2003). A atividade da ATPase é controlada pela afinidade de sua subunidade ϵ pela molécula de ADP e pela presença da força próton motora (Feniouk & Junge, 2005), diferenciando esse dos outros sistemas de resposta ao estresse que apresentam uma maior expressão das suas proteínas relacionada ao ambiente ácido.

1.3.3. Estresse osmótico

Em condições fisiológicas ideais, o citoplasma bacteriano apresenta osmolaridade levemente superior quando comparado ao meio em que está presente. A parede bacteriana impede o rompimento da membrana plasmática, e gera um turgor necessário para o crescimento celular e posterior divisão (Csonka, 1989).

Quando o meio apresenta uma osmolaridade superior à do citoplasma, como no caso de alimentos com alta concentração de sais e açúcares, o citoplasma perde água por osmose, levando a perda do volume citoplasmático e retração da membrana celular, um processo denominado plasmólise (Pilizota & Shaevitz, 2013). Nessa situação a célula se encontra em estresse osmótico e responde aumentando a concentração celular de compostos denominados solutos compatíveis. Esses compostos podem ser transportados para o citoplasma ou sintetizados, e têm uma baixa interferência com o metabolismo celular mesmo em altas concentrações (Imhoff, 1986).

O primeiro soluto compatível a ser acumulado numa resposta ao estresse osmótico é o potássio (K^+). Juntamente com seu contraíon glutamato, o potássio é importado para o interior celular rapidamente, restabelecendo o equilíbrio osmótico com o exterior celular (Csonka, 1989). Durante essa etapa inicial, outros transportadores são expressos para a substituição do K^+ , que apesar de ser um soluto compatível, pode interferir com algumas interações moleculares quando em alta concentração (Sutherland et al., 1986). Os solutos compatíveis mais utilizados por *L. monocytogenes* são glicina-betaína e carnitina, moléculas presentes em tecidos vegetais e animais, respectivamente (Rhodes & Hanson, 1993; Meadows & Wargo, 2015).

Os transportadores de glicina-betaína em *L. monocytogenes* são BetL e Gbu (Sleator et al., 2003). Mutantes sem a expressão de cada um dos transportadores são mais susceptíveis a estresse osmótico, porém mutantes de *gbu* apresentam maior redução do transporte desse soluto compatível (Wemekamp-Kamphuis et al., 2002). OpuC é o principal transportador de carnitina, apesar de estudos comprovarem a sua capacidade de importar glicina betaína, semelhante aos outros dois transportadores (Angelidis & Smith, 2003).

Apesar do aumento da expressão desses genes frente a indução de estresse osmótico, até o momento não foi definido claramente a maneira que a célula sinaliza a expressão desse estresse específico, sendo que as pesquisas têm como foco moléculas sensíveis da membrana plasmática (Wood, 2015). No entanto, o estresse osmótico é um importante ativador da regulação de Sigma B, e já foram descritos potenciais promotores relacionados a esse fator nos genes para os três transportadores (Cetin et al., 2004), e foi confirmada a expressão de genes de *opu* dependente de σ^B (Fraser et al., 2003).

1.3.4. Regulador geral de estresse - sigma B

O fator sigma é a subunidade da RNA polimerase responsável pelo reconhecimento da sequência dos promotores dos genes. Diferentes fatores sigmas podem existir na mesma célula e a ligação das diferentes subunidades sigma depende da concentração encontrada em determinado momento em função da fisiologia celular (Feklistov et al., 2014). Dessa maneira, a célula é capaz de alternar uma grande quantidade de genes transcritos para se adaptar rapidamente a diferentes condições fisiológicas (Gruber & Gross, 2003). Em geral, as bactérias apresentam um fator sigma principal, responsável pela

transcrição de genes em qualquer condição fisiológica. Em bactérias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes*, esse fator sigma principal recebe o nome de sigma A (σ^A). No entanto, as bactérias podem apresentar uma grande variedade de fatores sigma alternativos, responsáveis pela expressão de genes em situações como estresses específicos, metabolismo de compostos alternativos e esporulação (Paget & Helmann, 2003). Em *L. monocytogenes*, o fator sigma B (σ^B) é responsável pela expressão de genes na fase estacionária de desenvolvimento e em resposta a diferentes tipos de estresse (Wemekamp-Kamphuis et al., 2004).

A regulação da expressão de genes por sigma B acontece a nível transcricional e pós-traducional. O gene *sigB*, que dá origem a proteína σ^B , é expresso constitutivamente através de um promotor de reconhecimento de σ^A , porém um outro promotor permite a transcrição do gene por σ^B , permitindo uma retro-regulação positiva de transcrição (Guldimann et al., 2016). A proteína traduzida é mantida inativa pela ação de um fator anti-sigma RsbW, que se liga ao σ^B e impede sua interação com a RNA-polimerase (Benson & Haldenwang, 1993). Outra proteína, RsbV, um fator anti-anti-sigma, pode se ligar a RsbW, liberando o fator sigma alternativo para se ligar ao núcleo da RNA polimerase (Dufour & Haldenwang, 1994). A atividade de RsbV depende da sua fosforilação, que é realizada por duas fosfatases RsbU e RsbP (em *Bacillus subtilis*), e também pela atividade quinase de RsbW (Shin et al., 2010).

Situações de estresse ambiental (como elevada temperatura ou osmolaridade) ou estresse energético (redução de carbono ou ATP) são percebidas pela célula de uma maneira não muito bem definida através de um complexo multissubunidades denominado estresseassomo em *B. subtilis*,

formado principalmente pelas proteínas RsbS, RsbT e RsbR. Esse complexo é responsável pela atividade fosfatase de RsbU e RsbP, levando ao controle geral da atividade de sigma B (Marles-Wright & Lewis, 2008). Sigma B em *L. monocytogenes* regula a transcrição de aproximadamente 130 genes, conforme observado em experimentos de análise transcricional (Guldimann et al., 2016). Os genes regulados participam em: estresse osmótico, frio e ácido; virulência; invasão celular no hospedeiro; resistência à bile; e resistência a alguns antibióticos.

Diferentes genes relacionados à resposta a estresse apresentam promotores dependentes de σ^B para transcrição. Glutamato descarboxilase, e glutamato/GABA antiporter, envolvidos em estresse ácido (Wemekamp-Kamphuis et al., 2004); transportadores de solutos compatíveis (glicina betaína e carnitina) (Cetin et al., 2004), envolvidos em estresse osmótico e frio e a hidrolase de sais biliares Bsh, responsável pela sobrevivência de *L. monocytogenes* no intestino (Kazmierczak et al., 2003) possuem promotores de ligação de sigma B em seus genes, fazendo portanto parte do regulon desse sigma alternativo. Adicionalmente, o regulador geral de virulência de *L. monocytogenes* PrfA apresenta um promotor alternativo de sigma B, indicando um possível papel desse fator na patogênese (Ollinger et al., 2009). Também foi demonstrada que resistência a algumas substâncias antimicrobianas com atividade no envelope celular, incluindo bacteriocinas, como nisina e lacticina 3147 são influenciadas pela expressão de σ^B (Begley et al., 2006).

1.4. Controle de *L. monocytogenes* em alimentos

L. monocytogenes pode contaminar o alimento em diferentes pontos da cadeia produtiva e no consumo (Muhteren-Uyar et al., 2015). Apesar da importância de alimentos prontos para o consumo na veiculação desse patógeno, a contaminação cruzada durante o preparo nas residências também deve ser considerada na epidemiologia da listeriose (Wilks et al., 2006).

A matéria-prima pode ser considerada como uma das fontes de contaminação iniciais de *L. monocytogenes*. Nesse contexto, o risco microbiológico relacionado a esse patógeno aumenta em alimentos cujo processamento não envolve a eliminação de micro-organismos, como tratamentos térmicos (Lianou & Sofos, 2007). A pasteurização e o tratamento de ultraalta temperatura são eficientes para a eliminação de *L. monocytogenes* (Mackey & Bratchell, 1989).

A característica ubiquitária de *L. monocytogenes* também permite que o patógeno persista no ambiente de processamento. Uma vez que o patógeno seja introduzido no ambiente, a sua eliminação é dificultada pela sua capacidade de adesão e formação de biofilmes (Valderrama & Cutter, 2013). Dessa maneira, o alimento pode ser contaminado na indústria, inclusive após tratamentos industriais para eliminação de micro-organismos. Esse tipo de contaminação é comum no processamento de queijos, especialmente maturados (Guillier et al., 2008), e produtos de charcutaria, como salsichas e linguiça (Ristori et al., 2014).

Uma vez no alimento, *L. monocytogenes* pode se multiplicar durante a vida de prateleira, inclusive em condições de refrigeração, devido a sua característica psicrotrófica. Alimentos com condições adequadas a sua multiplicação, como alta atividade de água e pH próximo a neutralidade, podem

apresentar altas contagens de *L. monocytogenes* no fim de estocagem, aumentando o risco de veiculação de listeriose (Donnelly & Briggs, 1986).

Técnicas gerais de controle de micro-organismos contaminantes em alimentos, associadas às tecnologias de fabricação dos alimentos, podem ter um papel no controle da multiplicação de *L. monocytogenes*. Assim, alimentos fermentados, como queijos e salames apresentam baixo pH e presença de ácidos orgânicos que são capazes de inibir a multiplicação do patógeno (Breidt & Fleming, 1998). Outros processos, como adição de sal, açúcar e outros compostos que diminuem a atividade de água (Farber et al., 1992), e a adição de condimentos com propriedades bactericidas e bacteriostáticas (Oussalah et al., 2007) podem levar ao controle de *L. monocytogenes* no alimento. Nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, é aprovada para utilização em alimentos em diversos países, e possui capacidade de eliminação de diferentes micro-organismos, incluindo *L. monocytogenes* (de Arauz et al., 2009).

2. Gênero *Lactococcus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

As espécies do gênero *Lactococcus* se apresentam como cocos Gram positivos, ocorrendo sozinhos, em pares ou cadeias, não esporulantes ou móveis. São anaeróbios facultativos e catalase negativos. O gênero se enquadra no Filo Firmicutes, tendo um conteúdo G+C entre 34% e 43% (Teuber, 2009).

O primeiro isolamento ocorreu por Joseph Lister em 1873 na tentativa de provar a teoria de Pasteur, utilizando leite fervido como meio de cultura (Teuber, 2009). O isolado obtido recebeu o nome de *Bacterium lactis*, que foi posteriormente modificado para *Streptococcus lactis*. O gênero *Lactococcus*

surgiu a partir da subdivisão do gênero *Streptococcus* em 1985, sendo anteriormente classificado como *Streptococcus* do grupo N ou estreptococos lácteos (Schleifer et al., 1985).

Acredita-se que o habitat inicial das espécies do gênero *Lactococcus* seja material vegetal, onde ainda são encontrados isolados com capacidade de fermentação de diversos compostos vegetais. O uso de pastagens para alimentação do gado levou a contaminação do leite por essas bactérias, que posteriormente adquiriram a capacidade de utilizar os seus componentes e se adaptaram a esse novo ambiente. A capacidade de fermentação observada permitiu a conservação do leite e o desenvolvimento de produtos lácteos pelo homem primitivo, como queijos e leites fermentados (Cavanagh et al., 2015).

Nove espécies são descritas no gênero *Lactococcus*: *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. formosensis*, *L. piscium*, *L. fujiensis*, *L. chungangensis*, *L. taiwanensis* e *L. raffinolactis*. Dentre essas espécies, *L. lactis* é a mais estudada devido ao seu histórico de utilização em fermentações (Schleifer et al., 1985, Chen et al., 2013, Chen et al., 2014). *L. lactis* pode ser subdividido em quatro subespécies: *lactis*, *cremoris*, *hordniae* e *tructae* (Pérez et al., 2011). A subespécie *lactis* apresenta o biovariante *diacetylactis* (Bassit et al., 1993), capaz de fermentar citrato, produzindo diacetil e acetoína, responsáveis pelo aroma de manteiga presente em alguns queijos (Curoni & Bosset, 2002).

Antes da subdivisão do gênero *Streptococcus*, as subespécies *lactis* e *cremoris* eram classificadas como espécies, e sua diferenciação era caracterizada principalmente pelas características fenotípicas. Após o desenvolvimento de tecnologias de análises gênicas de alto rendimento, as diferenças entre subespécies foram estudadas a partir de sequenciamento e comparação de diversos genes. No entanto, frequentemente é observada uma

disparidade entre as características fenotípicas e genotípicas nessas subespécies, gerando confusão nas suas classificações (Cavanagh et al., 2015).

2.1. Características metabólicas importantes na fermentação láctea

A evolução de *L. lactis* para adaptação em leite e derivados envolveu a modificação do metabolismo para utilização dos componentes dessa matriz. Isolados de *L. lactis* de origem não-láctea frequentemente não apresentam genes de utilização dos componentes do leite, como a lactose (Siezen et al., 2011, Gao et al., 2011). A capacidade de fermentação da lactose e da utilização de caseína como fonte de aminoácidos são as principais características dessa evolução.

A utilização da lactose depende do transporte pela membrana, realizado por um sistema do tipo fosfoenolpiruvato-fosfotransferase (PEP-PTS) codificado pelos genes localizados no operon *lacEF* (de Vos et al., 1990) e pelas enzimas da via tagatose 6-fosfato codificado pelos genes do operon *lacABCD* (van Rooijen et al., 1991).

A utilização das proteínas do leite envolve uma proteinase de envelope celular PrtP, diversos sistemas de transporte de peptídeos e várias peptidases intracelulares para liberação dos aminoácidos (Kunji et al., 1995). O metabolismo dos componentes do leite é geralmente dependente de produtos de genes presentes em plasmídeos, podendo estar associados em um mesmo plasmídeo. Esses plasmídeos são geralmente grandes e possuem elementos transponíveis, o que colabora para sua instabilidade (McKay & Baldwin, 1974). Dessa maneira, essas características podem ser facilmente perdidas pelas células, especialmente após múltiplas repicagens em meios ricos, como meio de cultura,

que não impõem uma pressão seletiva de manutenção desse metabolismo (Bachmann et al., 2012).

2.2. Nisina

A primeira descrição de uma substância inibitória diferente de ácidos orgânicos produzida por *L. lactis* em leite foi feita por Rogers em 1928, observando a inibição de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (anteriormente *L. bulgaricus*) por um isolado de *L. lactis*. Posteriormente, Whitehead (1933) observou essa característica em outros isolados, caracterizando a substância como resistente a tratamentos térmicos e relacionando com a acidez tardia em queijos.

Impulsionados pelo descobrimento e purificação da penicilina por Fleming, Mattick & Hirsch desenvolveram uma série de pesquisas na década de 1940 na tentativa da utilização dessa substância inibitória como tratamento terapêutico de doenças, com testes em cobaias para estreptococos hemolíticos (Mattick & Hirsch, 1944), *Mycobacterium tuberculosis* (Mattick & Hirsch, 1946) e descrição de purificação, toxicidade (Mattick & Hirsch, 1947) e farmacocinética e interação com outros antibióticos (Mattick & Hirsch, 1949). Esses autores foram os primeiros a usarem a denominação nisina, derivada do grupo N de *Streptococci*. Bavin et al. (1952) e Gowans et al. (1952) observaram características farmacocinéticas e de espectro de ação não satisfatórios da nisina, associando ainda com o baixo rendimento de produção *in vitro* dessa substância. Ainda segundo Bavin (1952), “nisina muito provavelmente não encontraria um lugar na terapêutica”.

A atenção das pesquisas foi então voltada para a sua produção *in vitro*, condições de desenvolvimento da cepa produtora, purificação, métodos quantitativos de análise e estrutura molecular (Berridge, 1949; Hirsch, 1949; Friedmann & Epstein, 1951; Hirsch, 1951; Beach, 1952, Berridge, 1952; Newton & Abraham, 1953; Mocquot & Lefebvre, 1956; Cheeseman & Berridge, 1957; Cheeseman & Berridge, 1959). Em 1951, Hirsch e colaboradores descreveram a capacidade de inibição de anaeróbios formadores de esporos em queijo suíço por uma cepa de *L. lactis* produtora de bacteriocina. Desta forma, foi proposto o uso de nisina como aditivo alimentar para controle de micro-organismos deteriorantes de alimentos, como clostrídios produtores de gás em queijos e bacilos, assim como o controle de *C. botulinum* produtor de toxinas em enlatados (Hawley, 1953; Hirsch, 1953; Lewis et al., 1954; Hawley, 1955; Ingram & Barnes, 1955; Thatcher, 1958; Campbell & Sniff, 1959; Eastoe & Long, 1959; Farber, 1959; Thorpe, 1960). Essa aplicação potencial em alimentos culminou com depósitos de patentes da preparação e purificação de nisina por Hawley (1957) e Hawley & Hall (1960). A nisina foi primeiramente comercializada como um aditivo alimentar na Inglaterra em 1953, e em 1969 foi aprovada como um aditivo alimentar em queijo pela FAO/WHO, numa concentração de 12,5 mg/Kg (de Arauz et al. 2009).

2.2.1. Estrutura molecular da nisina e variantes

A nisina é um peptídeo de 34 aminoácidos, com peso molecular de 3.500 Da. Esta bacteriocina se enquadra na classe I, ou lantibiótico, por conter os aminoácidos incomuns lantionina, metil-lantionina, deidroalanina e deidrobutirina (Liu & Hansen, 1990). Esses aminoácidos são formados a partir da desidratação

de aminoácidos do pré-peptídeo após a síntese ribossomal. A nisina apresenta em sua estrutura anéis formados pela interação entre aminoácidos. Diversas variantes de nisina foram descritas, com variação de aminoácidos e no tamanho da molécula (Figura 3) (Mulders et al., 1991, Zendo et al., 2003, Wirawan et al. 2006, de Kwaadsteniet et al. 2008).

A variante mais descrita, Nisina Z, apresenta modificação da Histidina 27 por Asparagina (Mulders et al., 1991), o que torna essa molécula mais solúvel em água, obtendo maior difusão em meios de cultura e em alimento (de Vos et al., 1993).

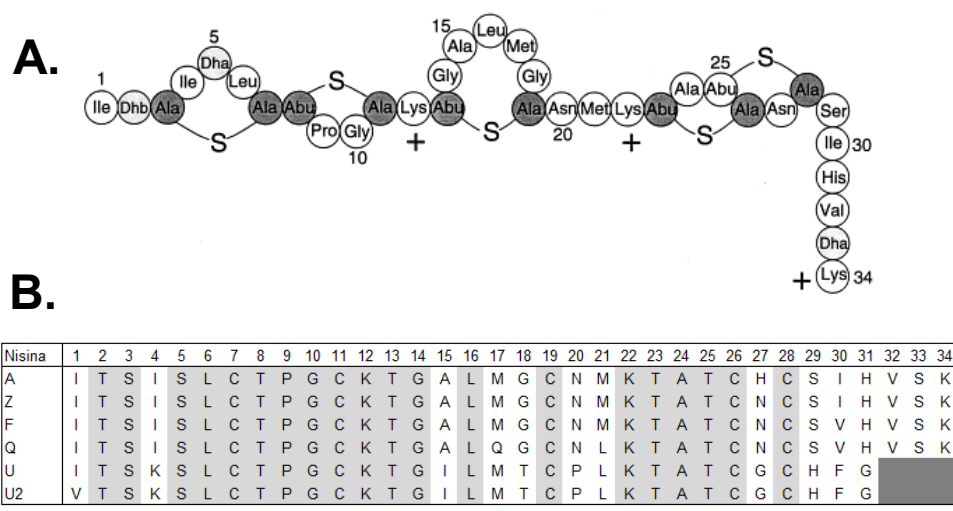


Figura 3. Estrutura de nisina. A e variação entre diferentes formas de nisina. A. Estrutura da molécula de nisina A. Aminoácidos não usuais: Dha: diidroalanina; Dhb: diidrobutirina; Ala-S-Ala: lantionina; Abu-S-Ala: β-metil-lantionina. B. Variação aminoacídica das diferentes formas de nisina. Adaptado de Breukink & Kruijff (1999) e Piper 2011.

2.2.2. Espectro e modo de ação

Assim como as bacteriocinas de outras espécies, a nisina tem ação principalmente em bactérias mais relacionadas com o gênero *Lactococcus*, como as bactérias lácticas (Davies et al., 1999), *Enterococcus* spp. (Piper et al.,

2009), *Streptococcus* spp. (Broadbent et al., 1989), e importantes bactérias patogênicas ou deterioradoras em alimentos, como *L. monocytogenes* (Benkerroum & Sandine, 1988), *Bacillus* spp. (Pol & Smid, 1999), *S. aureus* (Millette et al., 2007) e *Clostridium* spp (Scott & Taylor, 1981, Rilla et al., 2003, Bartoloni et al., 2004). Em geral, bactérias Gram negativas não são sensíveis a nisina, porém se associada a substâncias que desestabilizam a membrana externa, como EDTA, a nisina pode ter ação contra esse grupo microbiano (Delves-Boughton, 1993, Ukuku & Fett, 2004).

Existem dois modos de ação da nisina. Ambos estão relacionados com a sua ligação ao lipídeo II, presente na membrana celular de bactérias, e precursor de peptidoglicano. Sua ação mais estudada envolve a formação de poros na membrana, o que resulta em extravazamento de conteúdo citoplasmático, com perda do potencial de membrana e perda de ATP, levando a rápida morte celular (Breukink et al., 1999). Esse poro é formado pela interação de quatro moléculas de lipídeo II e oito moléculas de nisina, formando um poro híbrido (Hasper et al., 2004). Outro mecanismo de ação é a inibição de síntese de parede celular. Como o lipídeo II é um precursor do peptidoglicano, sua interação com a nisina causa seu deslocamento do septo, interferindo com o desenvolvimento bacteriano e a divisão celular (Wiedemann et al., 2001).

2.2.3. Genes e expressão gênica

Os genes envolvidos na expressão de nisina estão presentes em um transposon conjugativo denominado *Tn5276*, que também apresenta os genes para o metabolismo de sacarose. Os genes envolvidos estão presentes em

quatro operons *nisABTCIPRK*, *nisl*, *nisRK* e *nisFEG* (Figura 4) (Lubelski et al., 2008).

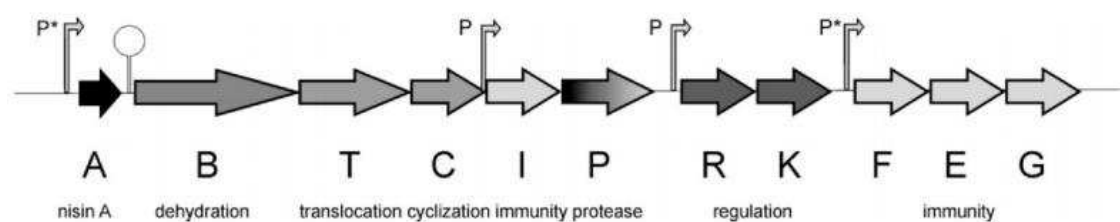


Figura 4. Organização dos genes e operons de nisina. P: promotor independente da sinalização por nisina; P*: promotor dependente a sinalização por nisina. Lubelski et al. (2008)

Nisina é traduzida inicialmente como um pré-peptídeo codificado pelo gene *nisA*, possuindo 57 resíduos de aminoácidos (Buchman et al., 1988). Esse pré-peptídeo apresenta uma sequência líder que sinaliza o transporte para o complexo de modificação e transporte localizado na membrana plasmática da célula produtora (Siegers et al., 1996). Esse complexo é formado pela enzima de desidratação (NisB), pela enzima ciclase (NisC), pelo transportador (NisT) e pela enzima proteolítica de remoção da sequência líder (NisP).

O pré-peptídeo apresenta apenas aminoácidos convencionais, porém a enzima codificada pelo gene *nisB*, apresenta a capacidade de desidratar resíduos de serina e treoninas, formando dehidroalanina e dehidrobutirina, respectivamente (Sen et al., 1999). Essa desidratação é essencial para a formação dos anéis intracadeias observados na nisina. A enzima ciclase codificada por *nisC* é a responsável pela formação dos anéis, através da interação dos aminoácidos desidratados com resíduos de cisteína presentes na molécula, com a formação de lantionina e metil-lantionina (Koponen et al., 2002).

Após a formação dos anéis, a pré-nisina modificada é transportada para fora da célula através de um transportador do tipo ABC, formado por um dímero

de NisT (Qiao & Saris, 1996). Já no ambiente extracelular, a enzima proteolítica do tipo serino-protease NisP remove a sequência líder, liberando a nisina ativa (Plat et al., 2011).

Bactérias produtoras de nisina possuem auto-imunidade. Essa imunidade é conferida pelos genes *nisl* e *nisFEG*. Estudos mostram que essa imunidade é derivada de uma ação sinérgica dos produtos desses genes (Sieggers & Entian, 1995, Ra et al., 1999). Nisl é uma lipoproteína de 245 aminoácidos com sequência sinal, que é removida. Ela é posteriormente ancorada a face externa da membrana celular (Qiao et al., 1995), porém também pode ser excretada no meio, sem a presença lipídica (Takala et al., 2004). Em ambos os casos, Nisl aparenta se complexar com a nisina, impedindo a interação com o lipídeo II. Os produtos do operon *nisFEG* codificam um complexo transportador do tipo ABC que aparenta ter uma ação de expulsão da nisina da membrana plasmática, com ou sem associação com Nisl (Stein et al., 2003).

A expressão dos genes de operons de nisina é controlada pelas proteínas NisK e NisR. NisK é um sensor histidina quinase, localizado na membrana plasmática e sensível a nisina (Kuipers et al., 1995). A partir da ligação de nisina no receptor NisK, ocorre uma autofosforilação de resíduo de histidina de NisK. Essa fosforilação é posteriormente transferida a NisR, um ativador transcricional capaz de se ligar aos promotores dos operons *nisABTCPRK* e *nisFEG*, levando a expressão dos genes de biossíntese e imunidade de nisina (Engelke et al., 1994).

3. Desenvolvimento de *Listeria* spp., *Lactococcus lactis* e interação em meio de cultura e alimentos

3.1. Desenvolvimento de *Listeria* spp. em meios de cultura e alimentos

Segundo o Manual de Bergey (McLauchlin & Rees, 2009), as faixas de desenvolvimento de *Listeria* spp. são de temperaturas entre 0 a 45 °C, pH 6 a 9 e até 10% de cloreto de sódio (NaCl). No entanto, McClure et al. (1989) observaram multiplicação de *L. monocytogenes* em menos de 24h em pH 4,5, quando a concentração de NaCl é inferior a 3%.

A partir de definição de meios mínimos e dos requerimentos nutricionais para *Listeria* spp. os aminoácidos essenciais variam de 2 (Tsai & Hodgson 2003) a 7-10 (Premaratne et al., 1991, Phan-Thanh & Gormon, 1997). Esses estudos demonstram a necessidade de vitaminas e ferro para a multiplicação de *Listeria* spp. Glicose é a fonte ideal de carboidrato, enquanto a lactose só permite o desenvolvimento em condição de aerobiose. A utilização de carboidratos presentes na parede bacteriana e fungica, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurâmico, celobiose e trealose, pode indicar a utilização da parede desses organismos em cultura mista, na falta de outro carboidrato (Pine et al., 1989, Premaratne et al., 1991).

O desenvolvimento de *L. monocytogenes* em leite pasteurizado contaminado pós processamento na década de 1980 levou a diversos estudos desse comportamento em baixas temperaturas. Segundo Pine et al. (1989), a multiplicação de *Listeria* spp. em leite a 5 °C é limitada pela potencial presença de bactérias competitivas, condições aeróbias ou semiaeróbias e a limitação de substrato. O desenvolvimento psicrotrófico em leite integral é maior que em leite

desnatado ou leite desnatado reconstituído, e isolados do sorotipo 4b tem melhor multiplicação em baixas temperaturas que dos sorotipos 1 e 3 (Donnelly & Briggs, 1986).

Através de modelagem matemática de multiplicação de *L. monocytogenes* em leite integral, Alavi et al. (1999) observaram taxas de desenvolvimento máximo específico ($\mu_{\text{máx}}$) entre 0,015/h e 0,344/h para 4 °C e 35 °C, sendo que a média da densidade populacional máxima foi de 7,47 log UFC/mL. Walker et al. (1990) obtiveram tempos de geração em leite UHT de 62; 24; 20; 16 e 5,5 h nas temperaturas de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 9,3 °C, respectivamente, sendo que a temperatura mínima de multiplicação variou entre -0,1 a -0,4 °C. Rosenow & Marth (1987) observaram tempos de geração de 41 min a 35 °C para leite desnatado, leite integral, leite com chocolate e creme de leite. Já a 4 °C, os tempos de geração variaram entre 29 h e 44 min e 45 h e 33 min, sendo que o leite com chocolate teve menor tempo de geração e o creme de leite o maior.

Em estudo de Genigeorgis et al. (1991), com diferentes tipos de queijo comercializados nos EUA, 36,7% permitiram o desenvolvimento de *L. monocytogenes* (queijos de tipo espanico, Ricota, Teleme, Brie, Camembert e Cottage). Ricota foi o queijo que apresentou a maior possibilidade de multiplicação de *L. monocytogenes*, mesmo quando apresentava conservantes como sorbato de potássio e vinagre. Características como baixa salinidade da salmoura, alto pH e pouca microbiota competidora podem ser responsáveis por esses resultados. No entanto, outros 16 tipos de queijo não permitiram o desenvolvimento de *L. monocytogenes* (entre eles queijos azuis, Suíço, Cheddar, Provolone e queijos processados). Os fatores mais relacionados com essa incapacidade de multiplicação são queijos mais duros (longa maturação e baixa atividade de água), uso de cultura starter e pH inferior ou igual a 5,5. Outros

trabalhos descrevem o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em queijos durante a maturação e a estocagem (Ryser et al., 1985, Ryser & Marth, 1987a, Ryser & Marth, 1987b, Chen & Hotchkiss, 1993, Bolton & Frank, 1999, Olarte et al., 2002).

3.2. Desenvolvimento de *L. lactis* em meios de cultura, leite e queijo

A faixa de temperatura de multiplicação de *L. lactis* é entre 10 e 40 °C. O pH ótimo é próximo da neutralidade, porém o desenvolvimento cessa ao atingir 4,5. *L. lactis* é capaz de se desenvolver em 4% de NaCl, porém *L. lactis* subsp. *cremoris* se multiplica apenas em concentrações até 2% (Teuber, 2009).

Os meios de cultura mais utilizados para o desenvolvimento de *L. lactis* em laboratório são M17 e MRS, meios ricos que permitem rápida multiplicação e alta produção de biomassa em fermentação. Diversas tentativas foram feitas para definir um meio mínimo para o desenvolvimento e as necessidades nutricionais de *L. lactis*. Porém, a diversidade metabólica dos isolados leva a uma heterogeneidade desses dados. Por exemplo, Cocaign-Bousquet et al. (1995), identificaram a necessidade de seis aminoácidos para uma cepa de *L. lactis* de origem vegetal, enquanto para a cepa de origem láctea eram necessários mais três aminoácidos. Uma maior auxotrofia dos isolados lácteos reflete a adaptação a esse meio rico. Jensen & Hammer (1993), sintetizaram um meio definido, com 19 dos 20 aminoácidos essenciais, além de vitaminas e minerais que suporta um desenvolvimento equiparado ao meio M17. As vitaminas ácido nicotínico, ácido pantotênico e biotina são essenciais, mas não os ácidos nucleicos. Manganês é essencial para a multiplicação em aerobiose devido a sua presença na enzima superóxido dismutase, podendo ser

necessário também a glutatona. Magnésio também é necessário para a ação de várias enzimas (Van Niel & Hägerdal, 1999).

A multiplicação de *L. lactis* em meios não definidos incluindo leite e derivados, depende da utilização dos aminoácidos, frequentemente presentes em proteínas e peptídeos. A multiplicação em leite apresenta um comportamento bifásico em isolados protease-positivos (Prf+), devido à utilização inicial de aminoácidos livres e peptídeos pequenos, seguido da utilização de caseína através da proteólise e importação dos hidrolisados (Juillard et al., 1995). Quando a caseína é a única fonte de aminoácidos, o transporte dos peptídeos é essencial para o desenvolvimento microbiano (Smid et al., 1989). Suplementação de proteínas do retentado de leite ou hidrolisado de caseína ao meio levam a um estímulo da multiplicação (St-Gelais et al., 1992, Bouhallab et al., 1993).

O desenvolvimento de *L. lactis* em leite é menor que em meios de cultura na temperatura de 30 °C. Pearce et al. (1974), obtiveram tempo de geração de 60 min para cepa Prf+ em leite, enquanto em meio de cultura esse tempo de 38 min. *L. lactis* subsp. *cremoris* apresenta taxa de multiplicação específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) entre 0,35 e 0,52 em leite, e 0,6-0,82 em caldo MRS (Hugenholtz & Veldkamp, 1985). Bellengier et al. (1997) observaram desenvolvimento bifásico de *L. lactis* Prf+ em leite com fases de multiplicação por hora (μ) de 1,69 e 1,13, sendo que a mudança ocorreu quando a população se apresentava a $1,20 \times 10^8$ UFC/mL. Em todos os experimentos *L. lactis* Prf+ apresentou populações finais da ordem de $2,0 \times 10^9$ UFC/mL.

Avaliando temperaturas encontradas na fabricação de queijo, Raynaud et al. (2005) avaliaram os parâmetros de desenvolvimento de *L. lactis* em leite desnatado reconstituído sem correção de pH e com uma refrigeração gradual.

Após 8 h de fermentação a 34 °C, a temperatura foi reduzida gradualmente até 12 °C ao final de 17,5h. O final da fase de multiplicação ocorreu com 11 h de fermentação, numa temperatura de 27 °C e pH de 4,94. Pós-acidificação foi observada até 180 h, com um pH final de 4,64. Panoff et al. (1994), obtiveram tempos de geração em M17 iguais a 48 min; 3,5 h; 57 h; e 7 dias nas temperaturas de 30; 16; 8 e 4 °C, respectivamente.

3.3. Produção de substâncias inibitórias não-bacteriocina

Bactérias lácticas, incluindo *L. lactis*, são capazes de produzir substâncias inibitórias no meio em que se desenvolvem, incluindo alimentos, permitindo uma competição com outros micro-organismos. Essa capacidade é utilizada pelos humanos para a conservação de produtos diversos, tanto de origem animal quanto vegetal (Stiles, 1996).

A principal substância inibitória produzida são os ácidos orgânicos, provenientes do metabolismo dos carboidratos do meio. Em relação a *L. lactis*, por ser uma bactéria homofermentativa, ácido lático é produzido (Cocaign-Bousquet et al., 1996). Esse ácido é capaz de inibir micro-organismos presentes no meio pela difusão para o citoplasma, causando alteração do pH intracelular, o que pode causar modificações das proteínas citoplasmáticas e perda do potencial de membrana (Gonçalves et al., 1997).

Apesar de não apresentar a enzima catalase, *L. lactis* é capaz de se desenvolver na presença de oxigênio. Nessas condições, ocorre a produção de radicais superóxido, que são convertidos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pelas enzimas superóxido dismutase (Sanders et al., 1995) e NADH oxidase (Jiang & Bommarius, 2004). O peróxido de hidrogênio pode ser acumulado no meio

inibindo outros micro-organismos devido ao seu efeito oxidante (Piard & Desmazeaud, 1991).

L. lactis subsp *lactis* biovar diacetylactis é capaz de utilizar o citrato presente no meio como fonte de carbono e energia. Esse metabolismo dá origem a dióxido de carbono (CO₂) e diacetil (Hugenholtz & Starrenburg, 1992). Dióxido de carbono pode inibir o desenvolvimento de bactérias aeróbias restritas como espécies de *Pseudomonas*, importantes deterioradoras de alimentos (Gil & Tan, 1980). Diacetil possui a capacidade de inibir bactérias (especialmente Gram negativas) e leveduras (Jay, 1982). Essa inibição não é bem compreendida, podendo estar relacionada à interação com resíduos de arginina no sítio catalítico de enzimas (Yankeelov Jr et al., 1968).

3.4. Interação de *Lactococcus lactis* e *Listeria monocytogenes*

A interação de *L. lactis* e *L. monocytogenes* tem sido estudada em meios de cultura e alimentos, no intuito de aumentar a inocuidade de produtos fermentados. Interações entre micro-organismos podem ser de várias naturezas. As principais associações encontradas em queijos estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1. Interações microbianas em queijo.

Interação	Efeito em queijo	Micro-organismos envolvidos	Fenômeno microbiológico
Comensalismo	Uso de ácido láctico e deacidificação	Leveduras e bactérias	Desenvolvimento de bactérias sensíveis a ácido
Amensalismo	Produção de ácidos orgânicos	LAB, bactérias deteriorantes de patogênicas	Inibição de bactérias sensíveis a ácido
	Bacteriocinas		Lise bacteriana
Competição	Necessidade de ferro	Bactérias com e sem sideróforos	Menor crescimento de auxotróficos de ferro
	Efeito Jamerson	Microbiota presente em madeira, <i>L. monocytogenes</i>	Limitação de colonização por <i>L. monocytogenes</i>
Parasitismo	Defeito de fermentação	Fagos e bactérias	Inativação de starters

Adaptado de: Irlinger & Mounier, 2009, p.144.

Em relação às interações entre *L. lactis* e *L. monocytogenes*, podem ser observadas o amensalismo e a competição. No caso do amensalismo, substâncias produzidas por *L. lactis*, como bacteriocinas e ácidos orgânicos, levam a uma inibição ou morte de *L. monocytogenes*. Já a competição pode ser exemplificada pela quantidade limitada de nitrogênio livre no leite (menor variedade de proteases para degradação de caseínas por *L. monocytogenes*) e pela menor eficiência de *L. monocytogenes* em utilizar a lactose do leite como fonte de carbono. (Sieuwerts et al., 2008).

A maior quantidade de estudos foca na interação em alimentos, mais especificamente queijos. No entanto, Breidt & Fleming (1998) observaram que o principal fator de inibição de *L. monocytogenes* em meio de cultura foi a produção de ácido láctico por *L. lactis*. Em leite ultrafiltrado, retentado e permeado uma

cultura mesofílica de *L. lactis* foi capaz de inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes* (El-Gazzar et al., 1992).

O queijo apresenta diversas características que influenciam na multiplicação e interação microbiana. Sua composição físico-química heterogênea permite a colonização diversificada por micro-organismos (Irlinger & Mounier, 2009). Além disso, a natureza sólida do queijo exerce um grande impacto microbiano, alterando o padrão de desenvolvimento de planctônico para colonial, exercendo estresse nas células, aumentando a fase lag e diminuindo a taxa de multiplicação (Aspridou et al., 2014). Essa restrição é derivada da restrição física das células e da limitação de difusão de nutrientes e produtos metabólicos (Antwi et al., 2007).

Devido à necessidade de compreensão da interação microbiana, a maioria dos trabalhos utiliza apenas duas bactérias na fabricação do queijo. No entanto, a microbiota de queijos é muito variável, especialmente em queijos produzidos com leite cru e submetidos a maturação. A diversidade microbiana e as mudanças físico-químicas provenientes da maturação dos queijos têm grande impacto na interação microbiana, o que pode levar a diferenças da interação em estudos com apenas duas espécies. Saubusse et al. (2007) isolaram e identificaram micro-organismos presentes em leite de queijo cru, caracterizando alguns isolados como inibitórios para *L. monocytogenes* (*Enterococcus saccharominimus*, *Corynebacterium flavensis*, *L. garvieae* e *L. lactis*). Apesar de nenhum destes isolados produzirem substâncias inibitórias isoladamente *in vitro*, queijos produzidos com cada uma em separado e em conjunto apresentaram inibição de *L. monocytogenes*. Até o oitavo dia de maturação, *L. lactis* foi o isolado que apresentou maior potencial de inibição; porém, ao final do período de maturação, foi identificado maior potencial de inibição por toda a microbiota

inibitória isolada do queijo. Esses resultados comprovam que a interação é diferente em culturas múltiplas, não apenas em termos de maior fermentação, já que o pH não variou entre os diferentes queijos (Saubusse et al., 2007).

Devido à importância das bacteriocinas no controle de micro-organismos deterioradores e patogênicos em alimentos, a interação de *L. monocytogenes* e *L. lactis* produtores de bacteriocinas tem sido estudada em queijos. Usualmente, esses estudos envolvem a produção de queijo com e sem a cultura produtora, com a comparação da contagem de *L. monocytogenes* em diversas etapas da fabricação e estocagem. Um importante fator nesses estudos é a real produção das bacteriocinas *in situ*, que deve ser verificada. Isolados produtores de bacteriocinas em meio de cultura frequentemente não o fazem em leite e queijo (Dal Bello et al., 2012). A disponibilidade dessas bacteriocinas também poder estar reduzida no alimento, devido à interação com componentes como gordura e proteínas (Jung et al., 1992), além da ação de proteases (Hernández et al., 2005), em especial no queijo. A menor difusão de substâncias na matriz sólida de queijo também pode impedir a ação de bacteriocinas (Aly et al., 2011).

Em relação à nisina, Sulzer & Busse (1991) observaram que *L. lactis* produtor de nisina inibiu *L. monocytogenes* quando inoculado sozinho em queijo Camembert, porém esse efeito não foi observado quando uma cultura *starter* foi também utilizada. Também em Camembert, Maisnier-Patin et al. (1992) observaram inibição de *L. monocytogenes* (10^1 a 10^3 UFC/g) por *L. lactis* produtor de nisina. Esses autores ainda comentam a importância no aumento de pH da casca em Camembert para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e na estabilidade da nisina durante a maturação.

Stecchini et al. (1995) observaram o desenvolvimento de *L. monocytogenes* após a segunda semana de estocagem de Mozzarella produzida

com *L. lactis* produtor de nisina. Essa queda de inibição também foi observada em queijo semi duro, após o segundo mês de maturação, em termos de atividade de nisina, sendo correlacionada com o aumento do pH do queijo (Rodríguez et al., 2001). Para contornar esse problema, Benech et al. (2002) demonstraram que o encapsulamento de nisina Z em lipossomos foi mais eficiente que o uso de cultura produtora em queijo, levando a maior redução de *L. innocua* pós fabricação, menor população no final de maturação, e maior atividade residual de nisina por seis meses.

Em queijo Minas Frescal, isolados de *L. lactis* com potencial de produção de nisina não reduziram a contagem (Nascimento et al., 2008) ou tiveram a mesma inibição de *L. monocytogenes* que cepa não bacteriocinogênica (Furtado et al., 2015). No primeiro estudo não foi encontrada atividade de nisina no queijo, enquanto que no segundo essa pesquisa não foi feita, apontando para necessidade de comprovação dessa produção *in situ*.

Outra bacteriocina muito estudada é a pediocina. Pediocina é uma bacteriocina da classe IIa (peptídeo catiônico com atividade anti-*Listeria*), sendo produzida por isolados de *Pediococcus* spp., especialmente *P. acidilactici* (Papagianni & Anastasiadou, 2009). Como essa bactéria tem baixa fermentação de lactose e habilidade proteolítica de leite (Caldwell et al., 1996), *L. lactis* mutantes, com capacidade de produzir pediocina, foram desenvolvidos. Buyong et al. (1998) obtiveram redução de *L. monocytogenes* em queijo Cheddar produzido com *L. lactis* produtor de pediocina, com 64.000 UA/g após o primeiro dia de produção, e 2.000 AU/g após 6 meses de estocagem. Rodriguez et al. (2005) desenvolveram um *L. lactis* mutante produtor de nisina e pediocina e um mutante produtor apenas de pediocina; no entanto, o mutante produtor de pediocina teve maior atividade inibitória sobre *L. monocytogenes* em queijo.

Aparentemente, a cepa com os genes de ambas as bacteriocinas não foi capaz de produzir pediocina no queijo. Reviriego et al. (2007) também transformou *L. lactis* para produzir nisina e pediocina, obtendo bons resultados de inibição em queijo, com redução de aproximadamente 5 log de UFC/g em relação ao controle após 28 dias de armazenamento a 12 °C. Outros transconjugantes foram produzidos para expressar bacteriocinas enterocina A (Liu et al., 2008) e lacticina 3147 (McAuliffe et al., 1999, O'Sullivan et al., 2006). Esses estudos obtiveram bons resultados para a inibição de *L. monocytogenes* em queijo.

O controle de *Listeria* spp. e outros patógenos em alimentos leva a uma busca contínua por isolados de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e com características tecnológicas interessantes. Dal Bello et al. (2012) isolaram *L. lactis* produtor de nisina de produtos lácteos fermentados e caracterizaram sua capacidade para aplicação em queijo. No entanto, não houve produção de bacteriocinas no queijo e, portanto, apresentou baixa inibição de *L. monocytogenes*.

Benkerroum et al. (2000) isolaram *L. lactis* de queijo típico marroquino (Jben), capaz de produzir uma bacteriocina não descrita. A aplicação dessa cultura em queijo com *L. monocytogenes* levou a uma redução de 2,7 log quando em inóculo inicial de alta concentração de *L. monocytogenes* (7 log UFC/g), enquanto em inóculo inicial de 4 log UFC/g não houve mais enumeração do patógeno. Em um trabalho posterior, essa cepa, associada a uma cultura starter produtora de diacetil, levou a uma redução de 6 log UFC/g de *L. monocytogenes* em queijo em comparação com o controle, após 6 dias de armazenamento (Benkerroum et al., 2002).

4. Referências

- Alavi SH, Puri VM, Knabel SJ, Mohtar RH & Whiting RC** 1999 Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. *Journal of Food Protection* 62(2) 170-176
- Aly S, Flourey J, Famelart MH, Madec MN, Dupont D, Le Gouar Y, Lortal S & Jeanson S** 2011 Nisin quantification by ELISA allows the modeling of its apparent diffusion coefficient in model cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(17) 9484-9490
- Angelidis AS & Smith GM** 2003 Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2) 1013-1022
- Antwi M, Bernaerts K, Van Impe JF & Geeraerd AH** 2007 Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono-and coculture. *International Journal of Food Microbiology* 120(1) 71-84
- Arsène F, Tomoyasu T & Bukau B** 2000 The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 55(1) 3-9
- Aspidou Z, Moschakis T, Biliaderis CG & Koutsoumanis KP** 2014 Effect of the substrate's microstructure on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Research International* 64 683-691
- Bachmann H, Starrenburg MJ, Molenaar D, Kleerebezem M & van Hylckama Vlieg JE** 2012 Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Research* 22(1) 115-124
- Bartoloni A, Mantella A, Goldstein BP, Dei R, Benedetti M, Sbaragli S & Paradisi F** 2004 In-vitro activity of nisin against clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Journal of Chemotherapy* 16(2) 119-121
- Bassit N, Boquien CY, Picque D & Corrieu G** 1993 Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis. *Applied and Environmental Microbiology* 59(6) 1893-1897
- Bavin EM, Beach AS, Falconer R & Friedmann R** 1952 Nisin in experimental tuberculosis. *The Lancet* 259(6699) 127-129
- Beach AS** 1952 An agar diffusion method for the assay of nisin. *Microbiology* 6(1-2) 60-63

- Beauregard KE, Lee KD, Collier RJ & Swanson JA** 1997 pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Experimental Medicine* 186(7) 1159-1163
- Bednarska NG, Schymkowitz J, Rousseau F & Van Eldere J** 2013 Protein aggregation in bacteria: the thin boundary between functionality and toxicity. *Microbiology* 159(9) 1795-1806
- Begley M, Hill C & Ross RP** 2006 Tolerance of *Listeria monocytogenes* to cell envelope-acting antimicrobial agents is dependent on SigB. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3) 2231-2234
- Bellengier P, Richard J & Foucaud C** 1997 Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. *Journal of Dairy Science* 80(8) 1520-1527
- Benech RO, Kheadr EE, Laridi R, Lacroix C & Fliss I** 2002 Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8) 3683-3690
- Benkerroum N & Sandine WE** 1988 Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 71(12), 3237-3245
- Benkerroum N, Ghouati Y, Ghalfi H, Elmejdoub T, Roblain D, Jacques P & Thonart P** 2002 Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a model cultured milk (lben) by in situ bacteriocin production from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *International Journal of Dairy Technology* 55(3) 145-151
- Benkerroum N, Oubel H, Zahar M, Dlia S & Filali-Maltouf A** 2000 Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan lben. *Journal of Applied Microbiology* 89(6) 960-968
- Benson AK & Haldenwang WG** 1993 *Bacillus subtilis* sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(6) 2330-2334
- Berridge NJ** 1949 Preparation of the antibiotic nisin. *Biochemical Journal* 45(4) 486-493
- Berridge NJ** 1952 Purification and nature of the antibiotic nisin. *Biochemical Journal* 52(4) 529-535
- Bertsch D, Rau J, Eugster MR, Haug MC, Lawson PA, Lacroix C & Meile L** 2013 *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(2) 526-532
- Bitar AP, Cao M & Marquis H** 2008 The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is activated by intramolecular autocatalysis. *Journal of Bacteriology* 190(1) 107-111

- Bolton LF & Frank JF** 1999 Defining the growth/no-growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheese based on salt, pH, and moisture content. *Journal of Food Protection* 62(6) 601-609
- Bouhallab S, Favrot C & Maubois JL** 1993 Growth-promoting activity of tryptic digest of caseinomacropeptide for *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Le Lait* 73(1) 73-77
- Braun L, Ghebrehiwet B & Cossart P** 2000 gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *The EMBO Journal* 19(7) 1458-1466
- Breidt F & Fleming HP** 1998 Modeling of the Competitive Growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in Vegetable Broth. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9) 3159-3165
- Breukink E & de Kruijff B** 1999 The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1462(1) 223-234
- Breukink E, Wiedemann I, Van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl HG & De Kruijff B** 1999 Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286(5448) 2361-2364
- Broadbent JR, Chou YC, Gillies K & Kondo JK** 1989 Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *Journal of Dairy Science* 72(12) 3342-3345
- Buchman GW, Banerjee S & Hansen JN** 1988 Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 263(31) 16260-16266
- Buyong N, Kok J & Luchansky JB** 1998 Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12) 4842-4845
- Caldwell SL, McMahon DJ, Oberg CJ & Broadbent JR** 1996 Development and characterization of lactose-positive *Pediococcus* species for milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 62(3) 936-941
- Campbell Jr LL & Sniff EE** 1959 Effect of subtilin and nisin on the spores of *Bacillus coagulans*. *Journal of Bacteriology* 77(6) 766-770
- Carpentier B & Cerf O** 2011 Review – persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Food of Microbiology* 145(1) 1-8
- Casey A, Fox EM, Schmitz-Esser S, Coffey A, McAuliffe O & Jordan K** 2014 Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to biocide stress reveals a multi-system response involving cell wall synthesis, sugar uptake, and motility. *Frontiers in Microbiology* 5(68) 1-10

- Cavanagh D, Fitzgerald GF & McAuliffe O** 2015 From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology* 47 45-61
- Cetin MS, Zhang C, Hutkins RW & Benson AK** 2004 Regulation of transcription of compatible solute transporters by the general stress sigma factor, σ_B , in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 186(3) 794-802
- Chastanet A, Derre I, Nair S & Msadek T** 2004 *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *Journal of Bacteriology* 186(4) 1165-1174
- Cheeseman GC & Berridge NJ** 1957 An improved method of preparing nisin. *Biochemical Journal* 65(3) 603-608
- Cheeseman GC & Berridge NJ** 1959 Observations on the molecular weight and chemical composition of nisin A. *Biochemical Journal* 71(1) 185-194
- Chen JH & Hotchkiss JH** 1993 Growth of *Listeria monocytogenes* and *Clostridium sporogenes* in cottage cheese in modified atmosphere packaging. *Journal of Dairy Science* 76(4) 972-977
- Chen YS, Chang CH, Pan SF, Wang LT, Chang YC, Wu HC & Yanagida F** 2013 *Lactococcus taiwanensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from fresh cummingcordia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(7) 2405-2409
- Chen YS, Otoguro M, Lin YH, Pan SF, Ji SH, Yu CR, Liou MS, Chang YC, Wu HC & Yanagida F** 2014 *Lactococcus formosensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from yan-tsai-shin (fermented broccoli stems). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(1) 146-151
- Chen J, Fang C, Zheng T, Zhu N, Bei Y & Fang W** 2012 Genomic presence of *gadD1* glutamate decarboxylase correlates with the organization of *ascB-dapE* internalin cluster in *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* 9(2) 175-178
- Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Loubiere P & Lindley ND** 1996 Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70(2-4) 253-267
- Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Novak L, Lindley ND & Loubiere P** 1995 Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology* 79(1) 108-116
- Conlan JW & North RJ** 1992 Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infection and Immunity* 60(12) 5164-5171

- Conlan JW & North RJ** 1994 Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *The Journal of Experimental Medicine* 179(1) 259-268
- Cotter PD & Hill C** 2003 Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(3) 429-453
- Cotter PD, Gahan CG & Hill C** 2000 Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F₀F₁-ATPase operon in the acid tolerance response. *International Journal of Food Microbiology* 60(2) 137-146
- Cotter PD, Gahan CG & Hill C** 2001 A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Molecular Microbiology* 40(2) 465-475
- Cotter PD, Ryan S, Gahan CG & Hill C** 2005 Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6) 2832-2839
- Csonka LN** 1989 Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, 53(1), 121-147
- Curioni PMG & Bosset JO** 2002 Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal* 12(12) 959-984
- Dabiri GA, Sanger JM, Portnoy DA & Southwick FS** 1990 *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(16) 6068-6072
- Dal Bello B, Coccolin L, Zeppa G, Field D, Cotter PD & Hill C** 2012 Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology* 153(1) 58-65
- Dalton CB, Austin CC, Sobel J, Hayes PS, Bibb WF, Graves LM, Swaminathan B, Proctor ME & Griffin PM** 1997 An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine* 336(2) 100-106
- Davies EA, Milne CF, Bevis HE, Potter RW, Harris JM, Williams GC, Thomas LV & Delves-Broughton J** 1999 Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *Journal of Food Protection* 62(9) 1004-1010
- de Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG & Penna TCV** 2009 Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(3), 146-154

- de Kwaadsteniet M, ten Doeschate K & Dicks LMT** 2008 Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). *Applied and Environmental Microbiology* 74(2) 547-549
- de las Heras A, Cain RJ, Bielecka MK & Vazquez-Boland JA** 2011 Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology* 14(2) 118-127
- de Vos WM, Boerrigter I, van Rooyen RJ, Reiche B & Hengstenberg W** 1990 Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry* 265(36) 22554-22560
- de Vos WM, Mulders JW, Siezen RJ, Hugenholtz J & Kuipers OP** 1993 Properties of nisin Z and distribution of its gene, nisZ, in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(1) 213-218
- Deckers-Hebestreit G & Altendorf K** 1996 The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex. *Annual Reviews in Microbiology* 50(1) 791-824
- Delves-Broughton J** 1993 The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards Gram-negative bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* 32(1-3) 87-97
- den Bakker HC, Warchicki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, Stasiewicz MJ, Burrell A, Roof S, Strawn LK, Fortes E, Nightingale KK, Kephart D & Wiedmann M** 2014 *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria conellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(6) 1882-1889
- Donnelly CW & Briggs EH** 1986 Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *Journal of Food Protection* 49(12) 994-1002
- Dramsi S, Dehoux P, Lebrun M, Goossens PL & Cossart P** 1997 Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infection and Immunity* 65(5) 1615-1625
- Drevets DA & Bronze MS** 2008 *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 53(2) 151-165
- Dufour A & Haldenwang WG** 1994 Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *Journal of Bacteriology* 176(7), 1813-1820
- Dussurget O, Cabanes D, Dehoux P, Lecuit M, Buchrieser C, Glaser P & Cossart P** 2002 *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Molecular Microbiology* 45(4) 1095-1106

- Eastoe JE & Long JE** 1959 The effect of nisin on the growth of cells and spores of *Clostridium welchii* in gelatin. *Journal of Applied Bacteriology* 22(1) 1-7
- EI-Gazzar FE, Bohner HF & Marth EH** 1992 Antagonism between *Listeria monocytogenes* and *Lactococci* during fermentation of products from ultrafiltered skim milk. *Journal of Dairy Science* 75(1) 43-50
- Elias M, Wieczorek G, Rosenne S & Tawfik DS** 2014 The universality of enzymatic rate-temperature dependency. *Trends in Biochemical Sciences* 39(1) 1-7
- Engelke G, Gutowski-Eckel Z, Kiesau P, Siegers K, Hammelmann M & Entian KD** 1994 Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Applied and Environmental Microbiology* 60(3) 814-825
- Farber L** 1959 Antibiotics in food preservation. *Annual Reviews in Microbiology* 13(1) 125-140
- Farber JM, Coates F & Daley E** 1992 Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 15(3) 103-105
- Feder ME & Hofmann GE** 1999 Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61(1) 243-282
- Feklistov A, Sharon BD, Darst SA & Gross CA** 2014 Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annual Review of Microbiology*, 68, 357-376
- Feniouk BA & Junge W** 2005 Regulation of the F₀F₁-ATP synthase: The conformation of subunit ϵ might be determined by directionality of subunit γ rotation. *FEBS Letters* 579(23) 5114-5118
- Ferreira V, Wiedmann M, Teixeira P & Stasiewicz MJ** 2014 *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection* 77(1) 150-170
- Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes, PS, Plikaytis BD, Holmes MS, Audurier A, Broome CV & Reingold AL** 1985 Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine* 312(7) 404-407
- Flint A, Butcher J & Stintzi A** 2016 Stress responses, adaptation, and virulence of bacterial pathogens during host gastrointestinal colonization. *Microbiology Spectrum* 4(2) 1-18
- Fraser KR, Sue D, Wiedmann M, Boor K & O'Byrne CP** 2003 Role of σ B in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of *opuC* is σ B dependent. *Applied and Environmental Microbiology* 69(4) 2015-2022

- Frees D, Savijoki K, Varmanen P & Ingmer H** 2007 Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 63(5) 1285-1295
- Freitag NE, Port GC & Miner MD** 2009 *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 7(9) 623
- Friedmann R & Epstein C** 1951 The assay of the antibiotic nisin by means of a reductase (resazurin) test. *Microbiology* 5(5) 830-839
- Furtado DN, Todorov SD, Landgraf M, Destro MT & Franco BDGM** 2014 Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: characterization of the bacteriocin. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(4) 1541-1550
- Gahan CG & Hill C** 2014 *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4(9) 1-7
- Gao Y, Lu Y, Teng KL, Chen ML, Zheng HJ, Zhu YQ & Zhong J** 2011 Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women. *Journal of Bacteriology* 193(11) 2886-2887
- Genigeorgis C, Carniciu M, Dutulescu D & Farver TB** 1991 Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30 °C. *Journal of Food Protection* 54(9) 662-668
- Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE & Berche P** 1987 Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 55(7) 1641-1646
- Gill CO & Tan KH** 1980 Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 39(2) 317-319
- Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couvé E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Domínguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian KD, Fsihi H, Garcia-Del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gómez-López N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones LM, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Madueño E, Maitournam A, Mata Vicente J, Ng E, Nedjari H, Nordsiek G, Novella S, de Pablos B, Pérez-Díaz JC, Purcell R, Remmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez A, Vázquez-Boland JA, Voss H, Wehland J & Cossart P** 2001 Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294(5543) 849-852
- Gonçalves LMD, Ramos A, Almeida JS, Xavier AMRB & Carrondo MJT** 1997 Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48(3) 346-350

- Gouin E, Mengaud J & Cossart P** 1994 The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infection and Immunity* 62(8) 3550-3553
- Gowans JL, Smith N & Florey HW** 1952 Some properties of nisin. *British Journal of Pharmacology* 7(3) 438-449
- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B & Sauders BD** 2010 *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(6) 1280-1288
- Gruber TM & Gross CA** 2003 Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Reviews in Microbiology* 57(1) 441-466
- Gruening P, Fulde M, Valentin-Weigand P & Goethe R** 2006 Structure, regulation, and putative function of the arginine deiminase system of *Streptococcus suis*. *Journal of bacteriology* 188(2) 361-369
- Guillier L, Stahl V, Hezard B, Notz E & Briandet R** 2008 Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International Journal of Food Microbiology* 128(1) 51-57
- Guldemann C, Boor KJ, Wiedmann M & Guariglia-Oropeza V** 2016 Resilience in the Face of Uncertainty: Sigma Factor B Fine-Tunes Gene Expression To Support Homeostasis in Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 82(15) 4456-4469
- Haas A & Goebel W** 1992 Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radical Research* 16(3) 137-157
- Halter EL, Neuhaus K & Scherer S** 2013 *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(2) 641-647
- Hanawa T, Kai M, Kamiya S & Yamamoto T** 2000 Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *dnaK* heat shock operon of *Listeria monocytogenes*. *Cell Stress & Chaperones* 5(1) 21-29
- Hasper HE, de Kruijff B & Breukink E** 2004 Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry* 43(36) 11567-11575
- Hawley HB & Hall RH** 1960 Production of nisin. U.S. Patent No. 3.093.551. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office

- Hawley HB** 1953 The preservation of foodstuffs: general introduction. Proceedings of the Society for Applied Bacteriology 16(1) 62-68
- Hawley HB** 1955 The development and use of nisin. Journal of Applied Bacteriology 18(2) 388-395
- Hawley HB** 1957 Nisin preparations. U.S. Patent No. 2.785.108. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office
- Hayer-Hartl M, Bracher A & Hartl FU** 2016 The GroEL–GroES chaperonin machine: a nanocage for protein folding. Trends in Biochemical Sciences 41(1) 62-76
- Hernández D, Cardell E & Zarate V** 2005 Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. Journal of Applied Microbiology 99(1) 77-84
- Hill C, Cotter PD, Sleator RD & Gahan CG** 2002 Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. International Dairy Journal 12(2) 273-283
- Hirsch A** 1949 The assay of the antibiotic nisin. Microbiology 4(1) 70-83
- Hirsch A** 1951 Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. Microbiology. 5(1) 208-221
- Hirsch A** 1953 Antibiotics in food preservation. Applied Bacteriology 16(1)100-106
- Hirsch A, Grinsted E, Chapman HR & Mattick ATR** 1951 446. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. Journal of Dairy Research 18(02) 205-206
- Hugenholtz J & Starrenburg MJ** 1992 Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. Applied Microbiology and Biotechnology 38(1) 17-22
- Hugenholtz J & Veldkamp H** 1985 Competition between different strains of *Streptococcus cremoris*. FEMS Microbiology Ecology 1(1) 57-62
- Imhoff, JF** 1986 Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. FEMS Microbiology Reviews 2(1-2) 57-66
- Ingram M & Barnes EM** 1955 Problems of the use of antibiotics for preserving meat. Journal of Applied Bacteriology 18(3) 549-564
- Irlinger F & Mounier J** 2009 Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. Current Opinion in Biotechnology 20(2) 142-148

- Jay JM** 1982 Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44(3) 525-532
- Jensen PR & Hammer K** 1993 Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(12) 4363-4366
- Jiang R & Bommarius AS** 2004 Hydrogen peroxide-producing NADH oxidase (nox-1) from *Lactococcus lactis*. *Tetrahedron: Asymmetry* 15(18) 2939-2944
- Juillard V, Le Bars D, Kunji ER, Konings WN, Gripon JC & Richard J** 1995 Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8) 3024-3030
- Jung DS, Bodyfelt FW & Daeschel MA** 1992 Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal of Dairy Science* 75(2) 387-393
- Karunasagar I, Senghaas B, Krohne G & Goebel W** 1994 Ultrastructural study of *Listeria monocytogenes* entry into cultured human colonic epithelial cells. *Infection and Immunity* 62(8) 3554-3558
- Kazmierczak MJ, Mithoe SC, Boor KJ & Wiedmann M** 2003 *Listeria monocytogenes* σ B regulates stress response and virulence functions. *Journal of Bacteriology* 185(19) 5722-5734
- Kirstein J & Turgay K** 2006 A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in signal transduction in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 9(3-4) 182-188
- Kirstein J, Zühlke D, Gerth U, Turgay K & Hecker M** 2005 A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *The EMBO Journal* 24(19) 3435-3445
- Kocks C, Gouin E, Tabouret M, Berche P, Ohayon H & Cossart P** 1992 *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 68(3) 521-531
- Koponen O, Tolonen M, Qiao M, Wahlström G, Helin J & Saris PE** 2002 NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. *Microbiology* 148(11) 3561-3568
- Kreft J & Vázquez-Boland JA** 2001 Regulation of virulence genes in *Listeria*. *International Journal of Medical Microbiology* 291(2) 145-157
- Krulwich TA, Sachs G & Padan E** 2011 Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 9(5) 330-343

- Kuhn M & Goebel W.** Molecular Virulence Determinants of *Listeria monocytogenes*. In: **Ryser ET & Marth EH** Ed(s). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Broken Sound Parkway NW: CRC Press, 2007. 111-155
- Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PG, Luesink EJ & de Vos WM** 1995 Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 270(45) 27299-27304
- Kunji ER, Mierau I, Hagting A, Poolman B & Konings WN** 1996 The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70(2-4) 187-221
- Lado BH & Yousef AE.** Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: **Ryser ET & Marth EH** Ed(s). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Broken Sound Parkway NW: CRC Press, 2007. 157-213
- Lamont RF, Sobel J, Mazaki-Tovi S, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Kim SK, Uldbjerg N & Romero R** 2011 Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *Journal of Perinatal Medicine* 39(3) 227-236
- Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PA, le Flèche-Matéos A, Roche SM, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, le Monnier A, Lecuit M & Allerberger F** 2010 *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(9) 2210-2214
- Lecuit M, Ohayon H, Braun L, Mengaud J & Cossart P** 1997 Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infection and Immunity* 65(12) 5309-5319
- Leistner, L** 2000 Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55(1) 181-186
- Lewis JC, Michener HD, Stumbo R & Titus DS** 1954 Antibiotics in food processing: additives accelerating death of spores by moist heat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2(6) 298-302
- Lianou A & Sofos JN** 2007 A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection* 70(9) 2172-2198
- Liu L, O'Conner P, Cotter PD, Hill C & Ross RP** 2008 Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* 104(4) 1059-1066

- Liu W & Hansen JN** 1990 Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 56(8) 2551-2558
- Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D & Carlier MF** 1999 Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401(6753) 613-616
- Lou Y & Yousef AE** 1997 Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied and Environmental Microbiology* 63(4) 1252-1255
- Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll GN & Kuipers OP** 2008 Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model antibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(3) 455-476
- Mackey BM & Bratchell N** 1989 The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 9(3) 89-94
- Maisnier-Patin S, Deschamps N, Tatini SR & Richard J** 1992 Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Le Lait* 72(3) 249-263
- Marco AJ, Altimira J, Prats N, Lopez S, Dominguez L, Domingo M & Briones V** 1997 Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microbial Pathogenesis* 23(5) 255-263
- Marder EP, Cieslak PR, Cronquist AB, Dunn J, Lathrop S, Rabatsky-Ehr T, Ryan P, Smith K, Tobin-D'Angelo M, Vugia DJ, Zansky S, Holt KG, Wolpert BJ, Lynch M, Tauxe R & Geissler AL** 2017 Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance—Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US Sites, 2013–2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 66(15) 397-403
- Marles-Wright J & Lewis RJ** 2008 The *Bacillus subtilis* stressosome: A signal integration and transduction hub. *Communicative & Integrative Biology* 1(2) 182-184
- Marquis H, Bouwer HG, Hinrichs DJ & Portnoy DA** 1993 Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infection and Immunity* 61(9) 3756-3760
- Mattick ATR & Hirsch A** 1944 A powerful inhibitory substance produced by group N *Streptococci*. *Nature* 154(3913) 551
- Mattick ATR & Hirsch A** 1946 Sour milk and the tubercle bacillus. *The Lancet* 471-418

- Mattick ATR & Hirsch A** 1947 Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic *Streptococci*. *The Lancet* 250(6462) 5-8
- Mattick ATR & Hirsch A** 1949 Some recent applications of nisin. *The Lancet* 254(6570) 190-193
- McAuliffe O, Hill C & Ross RP** 1999 Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology* 86(2) 251-256
- McClure PJ, Roberts TA & Oguru PO** 1989 Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Letters in Applied Microbiology* 9(3) 95-99
- McKay LL & Baldwin KA** 1974 Simultaneous loss of proteinase-and lactose-utilizing enzyme activities in *Streptococcus lactis* and reversal of loss by transduction. *Applied Microbiology* 28(3) 342-346
- McLauchlin J & Rees CED** Genus *Listeria*. In: **De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH & Whitman WB** Ed (s). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume Three: The *Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2009. 244-257
- Meadows JA & Wargo MJ** 2015 Carnitine in bacterial physiology and metabolism. *Microbiology* 161(6) 1161-1174
- Millette M, Le Tien C, Smoragiewicz W & Lacroix M** 2007 Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control* 18(7) 878-884
- Milohanic E, Glaser P, Coppée JY, Frangeul L, Vega Y, Vázquez-Boland JA, Kunst F, Cossart P & Buchrieser C** 2003 Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Molecular Microbiology* 47(6) 1613-1625
- Mocquot G & Lefebvre E** 1956 A simple procedure to detect nisin in cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 19(2) 322-323
- Møretrø T & Langsrud S** 2004 *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 1(2) 107-121
- Muhterem-Uyar M, Dalmaso M, Bolocan AS, Hernandez M, Kapetanakou AE, Kuchta T, Manios SG, Melero B, Minarovičová J, Nicolau AI, Rovira J., Skandamis PN, Jordan K, Rodríguez-Lázaro D, Stessl B & Wagner M** 2015 Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control* 51 94-107

- Mulders JW, Boerrigter IJ, Rollema HS, Siezen RJ & de Vos WM** 1991 Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry* 201(3) 581-584
- Murray EGD, Webb RA & Swann MBR** 1926 A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology* 29(4) 407-439
- Nair S, Frehel C, Nguyen L, Escuyer V & Berche P** 1999 ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* 31(1) 185-196
- Nair S, Milohanic E & Berche P** 2000 ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 68(12) 7061-7068
- Nair S, Derré I, Msadek T, Gaillot O & Berche P** 2000 CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* 35(4) 800-811
- Nair S, Frehel C, Nguyen L, Escuyer V & Berche P** 1999 ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* 31(1) 185-196
- Nascimento MS, Moreno I & Kuaye AY** 2008 Applicability of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking. *International Journal of Dairy Technology* 61(4) 352-357
- Newton GGF & Abraham EP** 1953 Sulphur-containing amino-acids of nisin. *Nature* 171 606
- Olarte C, González-Fandos E, Giménez M, Sanz S & Portu J** 2002 The growth of *Listeria monocytogenes* in fresh goat cheese (Cameros cheese) packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology* 19(1) 75-82
- Olivares AO, Baker TA & Sauer RT** 2015 Mechanistic insights into bacterial AAA+ proteases and protein-remodelling machines. *Nature Reviews Microbiology* 14 33-44
- Ollinger J, Bowen B, Wiedmann M, Boor KJ & Bergholz TM** 2009 *Listeria monocytogenes* σ B modulates PrfA-mediated virulence factor expression. *Infection and Immunity* 77(5) 2113-2124
- Ooi ST & Lorber B** 2005 Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases* 40(9) 1327-1332

- O'Sullivan L, O'Connor EB, Ross RP & Hill C** 2006 Evaluation of live-culture-producing lactacin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* 100(1) 135-143
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L & Lacroix M** 2007 Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18(5) 414-420
- Paget MS & Helmann JD** 2003 The σ 70 family of sigma factors. *Genome Biology* 4(1) 203
- Painter J & Stutsker L**. Listeriosis in Humans. In: **Ryser ET & Marth EH** Ed(s). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Broken Sound Parkway NW: CRC Press, 2007. 85-109
- Panoff JM, Legrand S, Thammavongs B & Boutibonnes P** 1994 The cold shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current Microbiology* 29(4) 213-216
- Papagianni M & Anastasiadou S** 2009 Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories* 8(1) 3
- Pearce LE, Skipper NA & Jarvis BDW** 1974 Proteinase activity in slow lactic acid-producing variants of *Streptococcus lactis*. *Applied Microbiology* 27(5) 933-937
- Pérez T, Balcázar JL, Peix A, Valverde A, Velázquez E, de Blas I & Ruiz-Zarzuela I** 2011 *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61(8) 1894-1898
- Phan-Thanh L & Gormon T** 1997 A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*. *International Journal of Food Microbiology* 35(1) 91-95
- Piard JC & Desmazeaud M** 1991 Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le lait* 71(5) 525-541
- Pilgrim S, Kolb-Mäurer A, Gentschev I, Goebel W & Kuhn M** 2003 Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infection and Immunity* 71(6) 3473-3484
- Pilizota T & Shaevitz JW** 2013 Plasmolysis and cell shape depend on solute outer-membrane permeability during hyperosmotic shock in *E. coli*. *Biophysical Journal* 104(12) 2733-2742
- Pine L, Malcolm GB, Brooks JB & Daneshvar MI** 1989 Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian Journal of Microbiology* 35(2) 245-254

- Piper C, Draper LA, Cotter PD, Ross RP & Hill C** 2009 A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(3) 546-551
- Piper C, Hill C, Cotter PD & Ross RP** 2011 Bioengineering of a Nisin A producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. *Microbial Biotechnology* 4(3) 375-382
- Pirie JHH** 1927 A new disease of veld rodents, "Tiger river disease". *Publications South African Institute of Medical Research* 3(13) 163-187
- Pirie JHH** 1940 Listeria: Change of name for a genus bacteria. *Nature* 145(3668) 264
- Pizarro-Cerdá J, Sousa S & Cossart P** 2004 Exploitation of host cell cytoskeleton and signalling during *Listeria monocytogenes* entry into mammalian cells. *Comptes Rendus Biologies* 327(6) 523-531
- Plat A, Kluskens LD, Kuipers A, Rink R & Moll GN** 2011 Requirements of the engineered leader peptide of nisin for inducing modification, export, and cleavage. *Applied and Environmental Microbiology* 77(2) 604-611
- Pol IE & Smid EJ** 1999 Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 29(3) 166-170
- Poulsen KP & Czuprynski CJ** 2013 Pathogenesis of listeriosis during pregnancy. *Animal Health Research Reviews* 14(01) 30-39
- Premaratne RJ, Lin WJ & Johnson EA** 1991 Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 57(10) 3046-3048
- Priya S, Sharma SK & Goloubinoff P** 2013 Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides. *FEBS Letters* 587(13) 1981-1987
- Qiao M & Saris PE** 1996 Evidence for a role of NisT in transport of the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* N8. *FEMS Microbiology Letters* 144(1) 89-93
- Qiao M, Immonen T, Koponen O & Saris PE** 1995 The cellular location and effect on nisin immunity of the NisI protein from *Lactococcus lactis* N8 expressed in *Escherichia coli* and *L. lactis*. *FEMS Microbiology Letters* 131(1) 75-80
- Ra R, Beerthuyzen MM, de Vos WM, Saris PE & Kuipers OP** 1999 Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. *Microbiology* 145(5) 1227-1233

- Raynaud S, Perrin R, Coccain-Bousquet M & Loubiere P** 2005 Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12) 8016-8023
- Reviriego C, Fernández L & Rodríguez JM** 2007 A food-grade system for production of pediocin PA-1 in nisin-producing and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains: application to inhibit *Listeria* growth in a cheese model system. *Journal of Food Protection* 70(11) 2512-2517
- Rhodes D & Hanson AD** 1993 Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 44(1) 357-384
- Rilla N, Martí B & Delgado T** 2003 Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *International Journal of Food Microbiology* 85(1) 23-33
- Ristori CA, Rowlands REG, Martins CG, Barbosa ML, Yoshida JT & Franco BDGM** 2014 Prevalence and populations of *Listeria monocytogenes* in meat products retailed in Sao Paulo, Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease* 11(12) 969-973
- Rocourt J & Buchrieser C.** The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification. In: **Ryser ET & Marth EH** Ed(s). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Broken Sound Parkway NW: CRC Press, 2007. 1-20
- Rodríguez E, Arqués JL, Gaya P, Nuñez M & Medina M** 2001 Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. *Journal of Dairy Research* 68(01) 131-137
- Rodríguez E, Calzada J, Arqués JL, Rodríguez JM, Nuñez M & Medina M** 2005 Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 in cheese. *International Dairy Journal* 15(1) 51-57
- Rogers LA** 1928 The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology* 16 (5) 321
- Rosenow EM & Marth EH** 1987 Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35 °C. *Journal of Food Protection* 50(6) 452-463
- Rouquette C, Ripio MT, Pellegrini E, Bolla JM, Tascon RI, Vázquez-Boland JA & Berche P** 1996 Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and in vivo survival of *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology* 21(5) 977-987

- Ryan S, Begley M, Gahan CG & Hill C** 2009 Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environmental Microbiology* 11(2) 432-445
- Ryser ET & Marth EH** 1987a Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Journal of Food Protection* 50(1), 7-13
- Ryser ET & Marth EH** 1987b Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Protection* 50(5) 372-378
- Ryser ET, Marth EH & Doyle MP** 1985 Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese. *Journal of Food Protection* 48(9) 746-753
- Saibil H** 2013 Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(10) 630-642
- Sanders JW, Leenhouts KJ, Haandrikman AJ, Venema G & Kok J** 1995 Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *Journal of Bacteriology* 177(18) 5254-5260
- Saubusse M, Millet L, Delbes C, Callon C & Montel MC** 2007 Application of single strand conformation polymorphism—PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 116(1) 126-135
- Sauders BD & Wiedmann M.** Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In: **Ryser ET & Marth EH** Ed(s). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Broken Sound Parkway NW: CRC Press, 2007. 21-53
- Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES & Broome CV** 1983 Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* 308(4) 203-206
- Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Bälz R, Collins MD & Fischer W** 1985 Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 6(2) 183-195
- Schubert WD, Urbanke C, Ziehm T, Beier V, Machner MP, Domann E, Wehland J, Chakraborty T & Heinz DW** 2002 Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell*, 111(6) 825-836
- Schumann W** 2003 The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress & Chaperones* 8(3) 207-217

- Schumann W** 2016 Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell Stress and Chaperones* 21(6) 959-968
- Scott VN & Taylor SL** 1981 Temperature, pH, and spore load effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Food Science* 46(1) 121-126
- Sen AK, Narbad A, Horn N, Dodd HM, Parr AJ, Colquhoun I & Gasson MJ** 1999 Post-translational modification of nisin. *European Journal of Biochemistry*, 261(2) 524-532
- Shin JH, Brody MS & Price CW** 2010 Physical and antibiotic stresses require activation of the RsbU phosphatase to induce the general stress response in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 156(9) 2660-2669
- Siebers A & Finlay BB** 1996 M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends in microbiology* 4(1) 22-29
- Siegers K & Entian KD** 1995 Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Applied and Environmental Microbiology* 61(3) 1082-1089
- Siegers K, Heinzmann S & Entian KD** 1996 Biosynthesis of lantibiotic nisin: posttranslational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. *Journal of Biological Chemistry* 271(21) 12294-12301
- Sieuwerts S, de Bok FAM, Hugenholtz J & Vlieg JETVH** 2008 Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 74(16) 4997-5007
- Siezen RJ, Bayjanov J, Renckens B, Wels M, van Hijum SA, Molenaar D & van Hylckama Vlieg JE** 2010 Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant-associated lactic acid bacterium. *Journal of Bacteriology* 192(10) 2649-2650
- Sleator RD, Francis GA, O'Beirne D, Gahan CGM & Hill C** 2003 Betaine and carnitine uptake systems in *Listeria monocytogenes* affect growth and survival in foods and during infection. *Journal of Applied Microbiology* 95(4) 839-846
- Smid EJ, Plapp R & Konings WN** 1989 Peptide uptake is essential for growth of *Lactococcus lactis* on the milk protein casein. *Journal of Bacteriology* 171(11) 6135-6140
- Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA & Goldfine H** 1995 The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infection and Immunity* 63(11) 4231-4237
- Smith JL, Liu Y & Paoli GC** 2013 How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? *Canadian Journal of Microbiology* 59(3) 141-152

- Somero GN** 1995 Proteins and temperature. *Annual Review of Physiology*,57(1) 43-68
- Stecchini ML, Aquili V & Sarais I** 1995 Behavior of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* 25(3) 301-310
- Stein T, Heinzmann S, Solovieva I & Entian KD** 2003 Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisl* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 278(1) 89-94
- St-Gelais D, Roy D & Haché S** 1992 Growth and activities of *Lactococcus lactis* in milk enriched with low mineral retentate powders. *Journal of Dairy Science* 75(9) 2344-2352
- Stiles ME** 1996 Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70(2-4) 331-345
- Sulzer G & Busse M** 1991 Growth inhibition of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *International Journal of Food Microbiology* 14(3) 287-296
- Sutherland, L, Cairney, J, Elmore, MJ, Booth, IR & Higgins, CF** 1986 Osmotic regulation of transcription: induction of the proU betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *Journal of Bacteriology* 168(2) 805-814
- Swaminathan B & Gerner-Smidt P** 2007 The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9(10) 1236-1243
- Takala TM, Koponen O, Qiao M & Saris PE** 2004 Lipid-free Nisl: interaction with nisin and contribution to nisin immunity via secretion. *FEMS Microbiology Letters* 237(1) 171-177
- Teuber M** Genus *Lactococcus*. In: **De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH & Whitman WB** Ed (s). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Three: The Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2009. 711-722
- Thatcher FS** 1958 Antibiotics in foods: a review of some public health aspects. *Canadian Journal of Public Health* 49(2) 58-72
- Thorpe RH** 1960 The action of nisin on spoilage bacteria: the effect of nisin on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Applied Bacteriology* 23(1) 136-143
- Tilney LG & Portnoy DA** 1989 Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Cell Biology* 109(4) 1597-1608
- Tsai HN & Hodgson DA** 2003 Development of a synthetic minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 69(11) 6943-6945

- Ukuku DO & Fett WF** 2004 Effect of nisin in combination with EDTA, sodium lactate, and potassium sorbate for reducing *Salmonella* on whole and fresh-cut cantaloupe. *Journal of Food Protection* 67(10) 2143-2150
- Unanue ER** 1997 Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Current Opinion in Immunology* 9(1) 35-43
- Valderrama WB & Cutter CN** 2013 An ecological perspective of *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53(8) 801-817
- van Niel EWJ & Hahn-Hägerdal B** 1999 Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52(5) 617-627
- van Rooijen RJ, van Schalkwijk S & de Vos WM** 1991 Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the tagatose 6-phosphate pathway gene cluster of the lactose operon of *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry* 266(11) 7176-7181
- Vázquez-Boland JA, Domínguez-Bernal G, González-Zorn B, Kreft J & Goebel W** 2001a Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and Infection* 3(7) 571-584
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J & Kreft J** 2001b *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14(3) 584-640
- Vega Y, Rauch M, Banfield MJ, Ermolaeva S, Scotti M, Goebel W & Vázquez-Boland JA** 2004 New *Listeria monocytogenes* prfA* mutants, transcriptional properties of PrfA* proteins and structure–function of the virulence regulator PrfA. *Molecular Microbiology* 52(6) 1553-1565
- Walker SJ, Archer P & Banks JG** 1990 Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 68(2) 157-162
- Weller D, Andrus S, Wiedmann M & den Bakker HC** 2015 *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(1) 286-292
- Wemekamp-Kamphuis HH, Wouters JA, de Leeuw PP, Hain T, Chakraborty T & Abee T** 2004 Identification of sigma factor σ_B -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6) 3457-3466
- Wemekamp-Kamphuis HH, Wouters JA, Sleator RD, Gahan CG, Hill C & Abee T** 2002 Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria*

monocytogenes affect virulence and growth at high osmolarity. Applied and Environmental Microbiology 68(10) 4710-4716

Whitehead HR 1933 A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic *Streptococci*. Biochemical Journal 27(6) 1793-1800

Wiedemann I, Breukink E, van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, de Kruijff B & Sahl HG 2001 Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. Journal of Biological Chemistry 276(3) 1772-1779

Wilks SA, Michels HT & Keevil CW 2006 Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. International Journal of Food Microbiology 111(2) 93-98

Willmund F, del Alamo M, Pechmann S, Chen T, Albanèse V, Dammer EB, Peng J & Frydman J 2013 The cotranslational function of ribosome-associated Hsp70 in eukaryotic protein homeostasis. Cell 152(1) 196-209

Wirawan RE, Klesse NA, Jack RW & Tagg JR 2006 Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. Applied and Environmental Microbiology 72(2) 1148-1156

Wood JM 2015 Bacterial responses to osmotic challenges. The Journal of General Physiology, 145(5), 381-388

Yankeelov Jr JA, Mitchell CD & Crawford TH 1968 Simple trimerization of 2, 3-butanedione yielding a selective reagent for the modification of arginine in proteins. Journal of the American Chemical Society 90(6) 1664-1666

Zendo T, Fukao M, Ueda K, Higuchi T, Nakayama J & Sonomoto K 2003 Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 67(7) 1616-1619

Zuber U & Schumann W 1994 CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 176(5) 1359-1363

OBJETIVOS

Esse estudo teve como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados a estresse de *L. monocytogenes* em interação com *L. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina. Considerando esse objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Objetivo 01: Caracterizar o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e *L. lactis* produtor de nisina em meio de cultura e leite, por meio de técnicas convencionais de cultivo bacteriano
- Objetivo 02: Caracterizar a interação de *L. monocytogenes* e *L. lactis* produtor de nisina em meio de cultura e leite, por meio de técnicas convencionais de cultivo bacteriano
- Objetivo 03: Avaliar a expressão relativa de genes relacionados a condições de estresse em *L. monocytogenes* através de técnica de RT-qPCR.

ARTIGO CIENTÍFICO: Expressão de genes associados a condições de estresse por *Listeria monocytogenes* em interação com *Lactococcus lactis* produtor de nisina

Rodrigo Otávio Miranda, Maria Emilene Martino Campos-Galvão, Luís Augusto Nero

Artigo científico a ser submetido na revista *Food Research International*

Fator de Impacto: 3.182

Resumo

A utilização de cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* produtoras de nisina em alimentos tem como vantagem a produção dessa bacteriocina *in situ*, o que permite o controle de bactérias como *L. monocytogenes*. Uma concentração não suficiente para eliminar a população da bactéria alvo pode levar a uma resposta cruzada a diferentes estresses no alimento. *L. monocytogenes* apresenta grande capacidade de sobreviver em diferentes condições de estresses, como ácido, térmico e osmótico. O objetivo desse trabalho foi avaliar a interação de uma cepa comercial de *L. lactis* subsp. *lactis* produtora de nisina e uma cepa de *L. monocytogenes* em caldo BHI e leite desnatado reconstituído, e sua influência em genes relacionados a estresse geral (*sigB*), ácido (*gadD2*), térmico (*groEL*) e osmótico (*gbu*) de *L. monocytogenes*. Nisina foi produzida tanto em BHI como em leite desnatado reconstituído, confirmado pela capacidade inibitória do sobrenadante de crescimento e pela maior expressão do gene *nisK* em relação ao tempo de inoculação. A expressão dos genes de estresse de *L. monocytogenes* foi variável em relação aos tempos de amostragem e o meio de cultura. Em relação ao leite, *gadD2* apresentou uma maior expressão em 24 h quando em interação, enquanto os outros genes de estresse (*sigB*, *groEL* e *gbu*) apresentaram uma redução da expressão. Esses resultados indicam que a exposição à nisina e a interação entre *L. monocytogenes* e *L. lactis* subsp. *lactis* podem interferir na capacidade do patógeno em sobreviver às condições de estresse encontradas em alimentos fermentados.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; nisina; interação; estresse

Abstract

The use of nisin producing *L. lactis* subsp. *lactis* in food has the advantage of producing this bacteriocin *in situ*, which allows the control of bacteria such as *L. monocytogenes*. A concentration not sufficient to eliminate the population of the target bacterium can lead to a cross response to different stresses in the food. *L. monocytogenes* exhibits great ability to survive under different stress conditions, such as acid, thermal and osmotic. The aim of this work was to evaluate the interaction of a nisin producing commercial strain of *L. lactis* subsp. *lactis* and a strain of *L. monocytogenes* in BHI broth and reconstituted skimmed milk, and its influence on general (*sigB*), acid (*gadD2*), thermal (*groEL*) and osmotic (*gbu*) stress genes of *L. monocytogenes*. Nisin was produced in both BHI and reconstituted skim milk, confirmed by the inhibitory capacity of the growth supernatant and the increased expression of the *nisK* gene in relation to the inoculation time. Expression of the *L. monocytogenes* stress genes was variable in relation to sampling times and culture medium. Regarding milk, *gadD2* presented a higher expression in 24 h when in interaction, while the other stress genes (*sigB*, *groEL* and *gbu*) showed a reduction in expression. These results indicate that exposure to nisin and the interaction between *L. monocytogenes* and *L. lactis* subsp. *lactis* may interfere with the pathogen's ability to survive the stress conditions found in fermented foods.

Key-words: *Listeria monocytogenes*; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; nisin; interaction; stress

1. Introdução

Lactococcus lactis subsp. *lactis* é uma bactéria ácido-lática de ampla aplicação na indústria láctea, especialmente na fabricação de queijos (Ruggirello et al., 2016). Alguns isolados dessa bactéria são capazes de sintetizar nisina, uma bacteriocina com ação bactericida e bacteriostática para diversos micro-organismos, especialmente Gram positivos (Zacharof & Lovitt, 2012). Assim, a utilização de uma cepa de *L. lactis* produtora de nisina como cultura *starter* na produção de um alimento representa uma vantagem adicional de segurança, uma vez que pode eliminar uma eventual contaminação por patógenos alimentares, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp (de Arauz et al., 2009). No entanto, a aplicação dessa cultura *starter* depende de sua capacidade de sintetizar essa bacteriocina no alimento (Perin et al., 2015). Além disso, a síntese de baixas concentrações de nisina no alimento pode ser insuficiente para o controle de patógenos e bactérias deteriorantes: nessas condições, alguns micro-organismos são capazes de se adaptar e aumentar sua resistência frente a outras condições de estresse (Wesche et al., 2009).

Listeria monocytogenes é um patógeno de origem alimentar, e possui uma grande quantidade de fatores de virulência que permitem a colonização de um hospedeiro (Vázquez-Boland et al., 2001). Condições adversas encontradas em alimentos e na sua produção determinam respostas fisiológicas de *L. monocytogenes*, importantes para que esse patógeno seja veiculado ao hospedeiro, envolvendo a expressão de genes relacionados a condições de estresse (Lado & Yousef, 2007). Variações na acidez, temperatura e pressão osmótica são as situações de estresse mais comuns encontradas na produção

de alimentos e as quais *L. monocytogenes* é submetido. Nessas situações, diferentes genes, como o de glutamato descarboxilase (*gadD*), da chaperona *groEL*, e do transportador de glicina betaína (*gbu*), têm sua expressão aumentada em condições de estresse específicas, permitindo a célula sobreviver em condições subótimas (Cotter et al., 2001; Hayer-Hartl et al., 2016; Wemekamp-Kamphuis et al., 2002). O fator sigma alternativo, sigma B (σ^B), tem um papel importante em diversas condições de estresse, permitindo a expressão de uma variedade de genes em resposta a mudanças ambientais e de multiplicação (Wemekamp-Kamphuis et al., 2004). A modificação da expressão desses genes relacionados ao estresse pode alterar a capacidade de *L. monocytogenes* em sobreviver nestas condições, incluindo aquelas encontradas após a ingestão por um hospedeiro (Gahan & Hill, 2014).

Nesse contexto, esse estudo tem como objetivo a avaliação da interação de *L. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina com *L. monocytogenes* em meio de cultura e leite, pela avaliação de suas populações e expressão de genes relacionados a condições de estresse.

2. Material e Métodos

2.1. Micro-organismos

L. monocytogenes Scott A (ATCC 49594) e a cepa comercial de *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 (Lyofast DY 13- Sacco, Cadorago, Itália) produtora de nisina, foram utilizadas nesse estudo. As cepas foram conservadas em meio de cultivo caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra - para *L. monocytogenes*) e caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS, BD - Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) para *L. lactis* subsp.

lactis) adicionado de glicerol a 20%, armazenadas a -20 °C. No momento de uso, as cepas foram repicadas em seus respectivos caldos e incubadas a 37 °C por 24h.

2.2. Comportamento de *L. lactis* subsp. *lactis* em caldo BHI e leite desnatado reconstituído

2.2.1. Tratamentos e condições de incubação

O desenvolvimento de *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 foi avaliado a partir da sua inoculação em caldo BHI (Oxoid) e em leite desnatado reconstituído (BD). No momento da inoculação, uma alíquota foi transferida para o meio de crescimento para uma população inicial entre 6 e 7 log. Os meios foram então incubados a 20 °C e 30 °C, por 24 h. As análises foram realizadas em tempo 0 h e a cada 3 h, até o tempo final de 24 h.

2.2.2. Avaliação da população e da variação de pH dos meios

Amostras de leite desnatado reconstituído inoculado foram diluídas de maneira seriada decimal em NaCl (VETC Química Fina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,85% (m/v) seguida de plaqueamento em duplicata e por superfície em ágar MRS (BD). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A média da contagem de duas placas foi utilizada para conversão em UFC/mL.

A análise de densidade óptica foi realizada para o caldo BHI (Oxoid) em espectrofotômetro (Bel Equipamentos Analíticos LTDA, Piracicaba, SP, Brasil) em comprimento de onda de 600 nm. Quando a mensuração da densidade óptica foi superior a 1,0 a amostra foi diluída com meio sem inóculo, e a medida de densidade obtida foi corrigida pelo fator de diluição.

A mensuração de pH foi realizada em potenciômetro (Bel Equipamentos Analíticos LTDA).

2.2.3. *Produção de bacteriocina*

A análise de inibição foi realizada pelo método *agar-spot-test*, de acordo com Todorov (2008) com modificações. Após centrifugação da amostra a 10.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi recolhido e tratado termicamente a 80 °C por 10 min. Para avaliar quantitativamente a produção de nisina, o sobrenadante tratado foi diluído seriadamente em solução tampão fosfato de sódio (PBS, VETC) 10 mM pH 6,5. Alíquotas de 10 µL foram então aplicadas na superfície de ágar BHI (Oxoid, 12 g/L de ágar-ágar), contendo *L. monocytogenes* Scott A a 1%. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, quando a observação de halos na superfície do ágar foi considerada como positiva para inibição. A observação de halo na maior diluição realizada foi considerada para a determinação da concentração de bacteriocina em unidades arbitrárias. A produção de nisina foi expressa em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL), calculada como $a^b \times 100$, onde “a” corresponde ao fator de diluição e “b” corresponde à última diluição que produziu halo de inibição (Schirru et al., 2012).

2.3. **Interação de *L. lactis subsp. lactis* e *L. monocytogenes***

2.3.1. *Tratamentos e condições de incubação*

BHI (Oxoid) e leite desnatado reconstituído (BD) foram inoculados com *L. monocytogenes* Scott A (população inicial entre 7 e 8 log) e *L. lactis subsp. lactis* DY-13 (população inicial entre 6 e 7 log) e incubados a 20 °C e 30 °C por 24 h. Amostras foram coletadas no tempo 0 h e a cada 3 h para análises de

contagem em placa e atividade inibitória. Adicionalmente, meios inoculados apenas com *L. monocytogenes* Scott A foram utilizados como controle, sendo incubados e amostrados nas mesmas condições.

2.3.2. Enumeração das populações

A análise de contagem das populações em placas foi conduzida para BHI e leite desnatado reconstituído como descrito anteriormente para *L. lactis* subsp. *lactis* em leite desnatado reconstituído, porém para *L. monocytogenes* o plaqueamento foi realizado por superfície em ágar BHI (Oxoid) suplementado com cloreto de lítio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a 10 g/L.

2.3.3. Produção de bacteriocina

A análise de atividade inibitória foi realizada como descrito anteriormente para cultura de *L. lactis* subsp. *lactis* em cultura pura.

2.4. Análises de expressão gênica

2.4.1. Amostragem e extração de RNA

Considerando os resultados obtidos na etapa de interação entre *L. monocytogenes* Scott A e *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 em caldo BHI e leite, os tempos 0, 9, 18 e 24 h foram selecionados para amostragem e análise de expressão gênica. Nesses tempos foram coletadas amostras para extração de RNA.

A extração foi realizada utilizando o reagente Trizol (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), segundo o protocolo do fabricante com modificações. As modificações foram: 1) diluição do inóculo em leite desnatado

reconstituído com solução de citrato de sódio (Isofar indústria e comércio de produtos químicos, Nova Iguaçu, RJ, Brasil) 2% na proporção de 1:1, para facilitar a diferenciação do pellet na centrifugação; 2) a introdução de etapa de lise de parede celular de bactéria Gram positiva, segundo o protocolo do Kit de purificação de DNA Wizard Genomic (Promega Co, Madison, WI, EUA). Após a extração o RNA foi quantificado em Nanodrop Lite (Thermo Scientific, Madison, WI, EUA) e armazenado a -80 °C até o momento de uso.

2.4.2. *Tratamento de DNase e síntese de cDNA*

O RNA extraído foi tratado com DNase para remoção de DNA contaminante, utilizando o kit DNA-free da Ambion (Life). A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA tratado com DNase. Ao volume de 10 µL de RNA tratado foram adicionados 1 µL de solução de dNTP (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, EUA - 10 mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e 1 µL de primer randômico (Invitrogen) e incubados em termociclador por 65 °C por 5 min e 4 °C por 5 min. A esse tubo foram adicionados 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 2 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL de RNase OUT (Invitrogen), sendo posteriormente incubado em termociclador por 37 °C por 2 min. Ao tubo foi então adicionado 1 µL de enzima M-MLV RT (Invitrogen - 200 unidades) sendo a etapa de síntese de cDNA realizada em termociclador com o ciclo de 25 °C por 10 min, 37 °C por 50 min e 70 °C por 20 min. O cDNA foi então armazenado a -20 °C até o momento de uso.

2.4.3. *Primers utilizados*

A Tabela 1 apresenta os primers utilizados nesse estudo. Os primers para os genes *rplD*, *tuf*, *gadD2*, *groEL* e *gbu* foram obtidos a partir da ferramenta

primer BLAST, utilizando-se os genomas depositados no NCBI (*L. monocytogenes* Scott A, código de acesso CM001159 e de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II1403, código de acesso AE005176). Os primers para o gene *sigB* foram utilizados segundo Werbrouk et al. (2009) e para o gene *nisK* segundo Trmčić et al. (2011).

2.4.4. Expressão relativa de *nisK* por *L. lactis* subsp. *lactis* em interação com *L. monocytogenes*

A expressão do gene *nisK* em relação ao tempo foi avaliada em *L. lactis* subsp. *lactis* quando em interação com *L. monocytogenes*. O gene *tuf* foi utilizado como controle endógeno. A expressão relativa do gene *nisK* foi avaliada utilizando o tempo 0 h de incubação como controle, e sua expressão relativa foi avaliada nos tempos 9, 18 e 24 h.

2.4.5. Expressão relativa dos genes de estresse de *L. monocytogenes* em interação com *L. lactis* subsp. *lactis*

A variação da expressão de genes de estresse por *L. monocytogenes* foi avaliada quando em interação com *L. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina. As expressões relativas dos genes *sigB*, *gadD2*, *groEL* e *gbu* foram avaliadas, utilizado o gene *rplD* como controle endógeno. Para avaliar o efeito da interação, as amostras de interação de cada tempo (9, 18 e 24 h) foram avaliadas relativamente com amostras controle de *L. monocytogenes* em crescimento em monocultura nos mesmos tempos.

Tabela 1. Primers utilizados no estudo

Micro-organismo	gene	Produto do gene	Sequência	Referência
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>tuf¹</i>	Fator Tu de alongamento da tradução	F: TGAACCACAATGGGTTGCTA R: TCGACTGGAAGAAGGAGTGG	Este artigo
	<i>nisK</i>	Histidina quinase de sistema de dois componentes de nisina	F: CGAACGTGATATGAAACACTACCC R:	Trmčić et al., 2011
<i>L. monocytogenes</i>	<i>rplD¹</i>	Proteína ribossomal L4 da subunidade 50S	F: GTCCCTTGACGTAGGGATGC R: GGAACAAACGCTGGCGAAAT	Este artigo
	<i>sigB</i>	Subunidade sigma B da RNA polimerase	F: AAAGAAACGGGTGAACTACTCGAT R: CAACCCCTCTCCAACTTTTTTAA	Werbrouk et al., 2009
	<i>gadD2</i>	Enzima glutamato descarboxilase	F: CAGCTACCTTGGCGGAGAAA R: GATGAATGGTGCGGTAGCCT	Este artigo
	<i>groEL</i>	Chaperona molecular	F: TGC GTTTTGTAGTGCGGAAC R: AAGCAGTTGGCGTTGGTTTC	Este artigo
	<i>gbu</i>	Transportador de glicina betaína	F: GCGCTTGTTATTGGGGTTCC R: CCGAAAAATGCTACGGCAGG	Este artigo

¹ gene de controle endógeno

2.4.6. Condições de qPCR e análise de $\Delta\Delta Ct$

A concentração de cDNA foi analisada por PCR quantitativa, em termociclador Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha). A reação de PCR em tempo real, cujo volume final foi 10 μL , consistiu de 5 μL de Power SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, Inglaterra), 100 nM de cada primer, 200 ng de cDNA e água ultra pura para completar o volume. O *no-template control* (ausência de amostra) foi incorporado em cada análise. O programa de amplificação consistiu em uma temperatura de desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 45 ciclos de 10 s a 95°C e 1 min a 60°C. A curva de dissociação (*melting curve*) foi obtida para determinar a especificidade da reação e a presença de dímeros de oligonucleotídeos, além de possíveis contaminações.

As análises dos dados de expressão gênica foram realizadas utilizando o modelo $\Delta\Delta Ct$ de quantificação relativa. Os valores de threshold cycle (Ct) para cada gene foram convertidos em escala logarítmica e exportados para o software Microsoft Excel. O valor de Ct para cada um dos genes de interesse pesquisados foram subtraídos dos valores de Ct para os genes de referência, para o cálculo do ΔCt . Em seguida, o $\Delta\Delta Ct$ foi obtido a partir da diferença entre o ΔCt de cada gene em cada um dos desafios microbianos propostos pelo ΔCt dos mesmos genes nas amostras controle. As quantidades relativas (Q) foram obtidas a partir da fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. A eficiência de cada primer foi avaliada utilizando-se diluições decimais de amostras de DNA, assegurando-se uma eficiência entre 0,95 e 1,05.

3. Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta os resultados do desenvolvimento de *L. lactis* subsp. *lactis* e produção de nisina em caldo BHI e leite desnatado reconstituído nas temperaturas de 20 e 30 °C por 24 h.

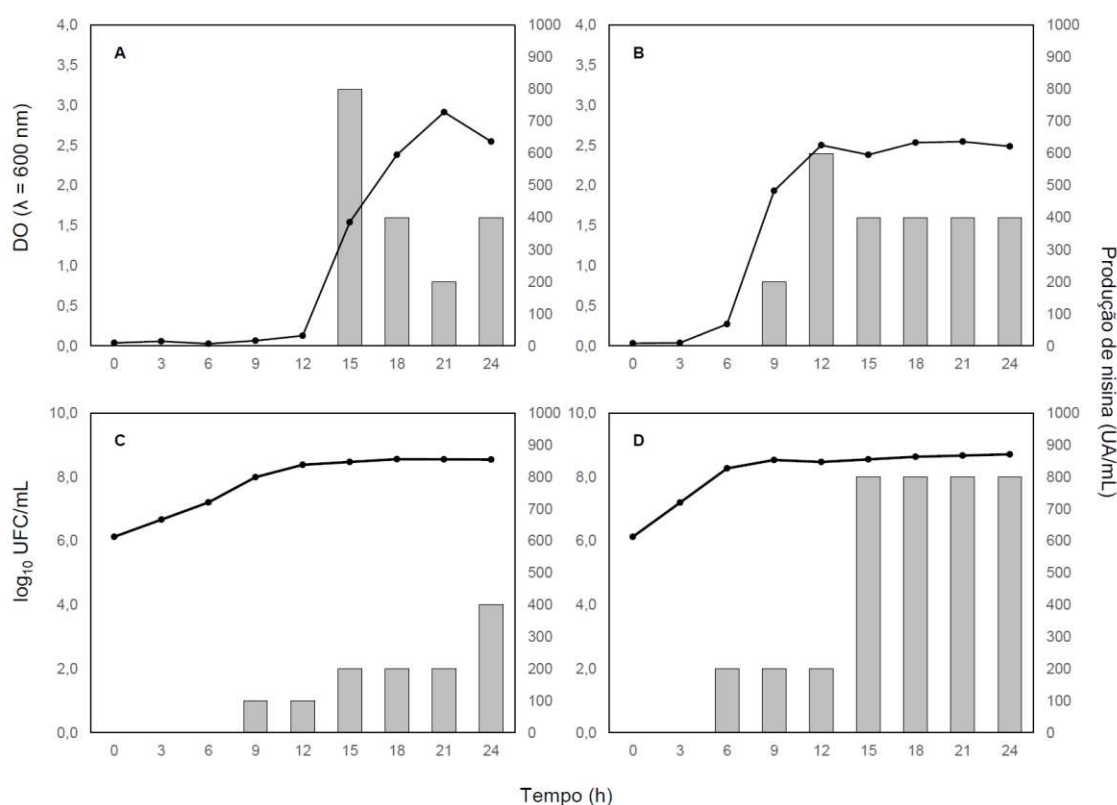


Figura 1. Desenvolvimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13 em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D), nas temperaturas de 20 (A, C) e 30 °C (B, D) por 24 h. linhas: população (medida de densidade óptica ou log₁₀ UFC/mL); barras: produção de nisina (UA/mL).

Em caldo BHI, observou-se o início do desenvolvimento logarítmico de *L. lactis* subsp. *lactis* entre 12 e 15 h para a temperatura de 20 °C, e entre 6 e 9 h para a temperatura de 30 °C (Figura 1AB). Nesses intervalos também foi observada a maior redução do pH do meio, com uma variação de 1,31 e 1,63 para 20 e 30 °C, respectivamente (dados não apresentados). A fase estacionária a 20 °C se iniciou entre 18 e 24 h, atingindo maior densidade óptica no tempo 21

h, porém reduzindo novamente ao final de 24 h (Figura 1A). Na temperatura de 30 °C a fase estacionária se iniciou a partir de 12 h (Figura 1B). O pH ao final de 24 h foi de 5,68 e 5,39 para 20 e 30 °C, respectivamente (dados não apresentados).

Em leite desnatado reconstituído, observou-se o início do desenvolvimento logarítmico de *L. lactis* subsp. *lactis* entre 0 e 12 h a 20 °C (Figura 1C), e entre 0 e 9 h a 30 °C (Figura 1D). A fase estacionária na temperatura de 20 °C se inicia entre 12 e 15 h, atingindo uma população aproximada de 8,5 log (Figura 1C). A 30 °C a fase estacionária se iniciou a partir de 9 h, com a mesma população aproximada (Figura 1D). A variação de pH do leite foi de 0,22 e 0,77, atingindo o valor final de 6,46 e 5,92, para as temperaturas de 20 e 30 °C, respectivamente (dados não apresentados).

A produção de nisina por *L. lactis* subsp. *lactis* em cultura simples em caldo BHI e leite desnatado reconstituído se iniciou na fase exponencial de desenvolvimento, como descrito por de Arauz et al. (2009). No entanto, em leite houve um aumento dessa produção durante a fase estacionária, diferente do observado por Hirsch (1951) e De Vuyst & Vandamme (1992).

A Figura 2 apresenta os resultados das curvas de interação entre *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. monocytogenes* em caldo BHI e leite desnatado reconstituído nas temperaturas de 20 e 30 °C por 24 h. O comportamento de *L. monocytogenes* em culturas puras foram apresentados como referenciais para o desenvolvimento do patógeno em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis*.

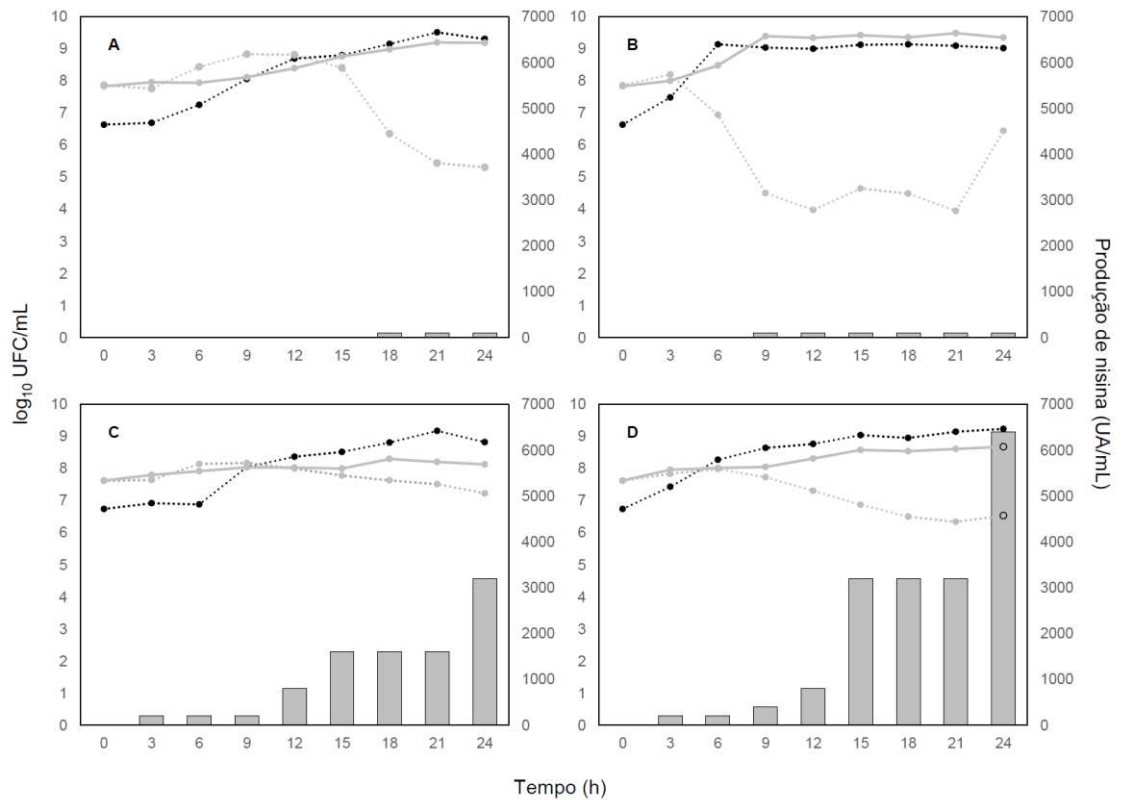


Figura 2. Desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* Scott A e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13 e produção de nisina em co-cultura em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D), a 20 (A, C) e 30 °C (B, D). Em cada gráfico, linha cinza tracejada (*L. monocytogenes* em co-cultura, log UFC/mL), linha cinza contínua (*L. monocytogenes* inoculada isolada - controle, log UFC/mL), linha preta tracejada (*L. lactis* em co-cultura, log UFC/mL), barras cinzas (produção de nisina, UA/mL).

Em caldo BHI durante a interação, a população de *L. lactis* subsp. *lactis* a 20 °C atingiu o valor máximo de 9,5 log no tempo 21 h. A detecção de nisina nessa temperatura se iniciou no tempo 18 h com 100 UA/mL, mantendo essa concentração até o tempo de 24 h (Figura 2A). A 30 °C, o crescimento logarítmico da população de *L. lactis* subsp. *lactis* acontece entre os tempos 0 e 6 h, com a entrada na fase estacionária entre 9,0 e 9,1 log UFC/mL. A produção de nisina a 30 °C se iniciou na fase estacionária no tempo de 9 h com 100 UA/mL, mantendo essa concentração até o tempo de 24 h (Figura 2B).

Em leite desnatado reconstituído, o crescimento exponencial da população de *L. lactis* subsp. *lactis* ocorreu entre 6 e 12 horas a 20 °C (Figura

2C), e entre 0 e 9 h a 30 °C (Figura 2D). No entanto, ao final da fase exponencial de crescimento, a população de *L. lactis* subsp. *lactis* apresentou um aumento até a última amostragem no tempo de 24 h, de aproximadamente 0,5 log UFC/mL para ambas as temperaturas (Figura 2). A produção de nisina no leite de 100 UA/mL foi observada a partir de 3 h para ambas as temperaturas, permanecendo nessa concentração até 9 e 6 h para 20 e 30 °C, respectivamente (Figura 2). A maior concentração de nisina em leite durante a interação foi observada no tempo de 24 h, com os valores de 3200 e 6400 UA/mL para as temperaturas de 20 e 30 °C, respectivamente (Figura 2).

Nos ensaios de interação entre *L. monocytogenes* e *L. lactis* subsp. *lactis*, a detecção de nisina no caldo BHI só foi observada após a entrada na fase estacionária de crescimento e em baixa quantidade (100 UA/mL, Figura 2), diferentemente dos resultados obtidos em cultura simples (Figura 1). Perin (2011) demonstrou essa baixa produção de nisina em meio BHI. O desenvolvimento de bactérias ácido-láticas em leite pode levar a hidrólise de suas proteínas e formação de peptídeos com características antimicrobianas (Benkerroum, 2010), o que pode explicar em parte a detecção observada no tempo de 3 h de incubação no leite em co-cultura.

A redução da população de *L. monocytogenes* em co-cultura, em relação a sua cultura simples em BHI foi coincidente com o início de detecção de nisina a 20 °C (18 h) e a 6 h a 30 °C, sendo a produção de nisina iniciada no próximo ponto amostral nessa temperatura (9 h) (Figuras 2AB). No entanto, no tempo amostral de 24 h houve um aumento na população de *L. monocytogenes* na temperatura de 30 °C (Figura 2B). Segundo Ming & Daeschel (1995), *L. monocytogenes* Scott A pode adquirir resistência a nisina pela modificação do conteúdo de fosfolipídios da membrana.

Apesar da maior detecção de nisina no leite, a redução de contagem de *L. monocytogenes* nesse meio foi inferior àquela encontrada em caldo BHI (Figura 2). Matrizes complexas como o leite podem interferir na capacidade bactericida de bacteriocinas devido a interações com proteínas e lipídios (Jung et al., 1992; Stecchini et al., 1995) e a proteólise (Hernández et al., 2005).

O objetivo desse experimento foi avaliar a expressão de genes específicos de *L. monocytogenes* com relação a sua interação com *L. lactis* subsp. *lactis*. Nesse contexto, o inóculo inicial de *L. monocytogenes* foi alto, com o intuito de que a inibição não eliminasse a população desse micro-organismo e possibilitasse a extração de material para as análises de expressão. No contexto do alimento, não é comum uma alta contaminação inicial.

A Figura 3 apresenta a expressão de *nisK* por *L. lactis* subsp. *lactis* em relação ao tempo de incubação na condição de co-cultura em caldo BHI e leite. O tempo 0 h de amostragem foi utilizado como referencial. O gene *nisK* de *L. lactis* subsp. *lactis* em co-cultura teve sua expressão aumentada em relação ao tempo 0, para os dois meios e as duas temperaturas, atingindo o máximo em cada condição no tempo amostral de 24 h. Relacionando-se a expressão do gene *nisK* com os resultados de atividade inibitória (Figura 2) a *L. monocytogenes* pode-se verificar que a expressão desse gene apresentou aumento em relação ao tempo 0 h a partir de 9 h de amostragem para todos os meios e temperaturas. Com exceção do resultado de caldo BHI a 20 °C, produção de nisina foi observada nesse tempo para as outras condições. Essa exceção pode ser explicada por uma menor sensibilidade do teste utilizado (Agar Spot) em relação à sensibilidade do qPCR. A partir do tempo 18 h, observa-se um aumento relativo da expressão de *nisK* e a inibição em todos os meios e temperaturas. A expressão do gene *nisK* atinge o máximo para cada meio e

temperatura na amostragem de 24 h, coincidindo no leite com o máximo de produção de nisina para cada temperatura. Em caldo BHI não houve uma variação da concentração de nisina desde o início dessa atividade até o final da amostragem em 24 h.

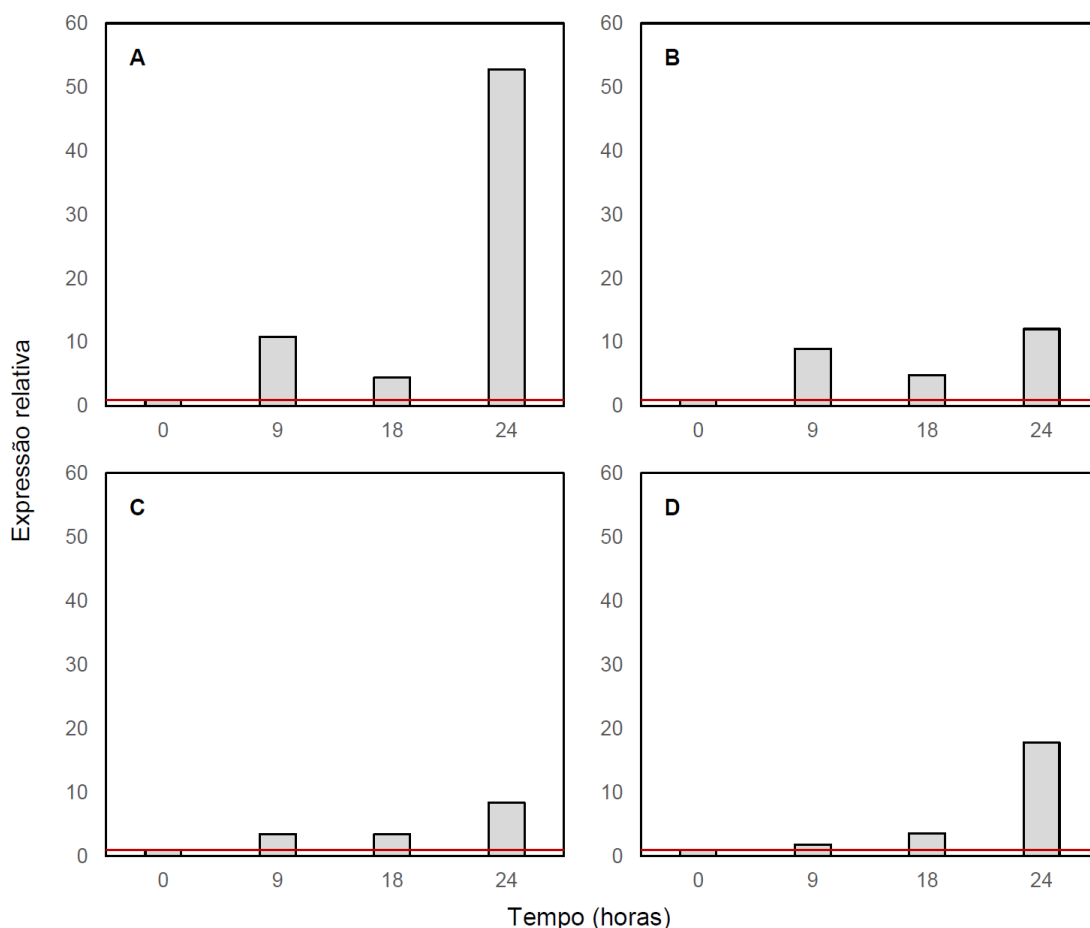


Figura 3. Expressão relativa do gene *nisK* de *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 produtor de nisina em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D) a 20 (A, C) e 30 °C (B, D) em co-cultura com *L. monocytogenes* Scott A em relação ao tempo de cultivo. O gene *tuf* foi utilizado como controle endógeno, e a expressão do gene *nisK* no tempo 0 h em cada meio foi utilizada como controle (linha vermelha) para realização da expressão relativa por RT-qPCR por análise de $\Delta\Delta Ct$.

O gene *nisK* pertence ao cluster de nisina, dando origem a proteína de membrana histidina quinase responsável pelo sistema de dois componentes de transdução de sinal dependente de nisina do meio extracelular (Ge et al., 2017). A ligação da nisina nesse receptor permite sua autofosforilação, que ativa o

regulador transcricional NisR, que por sua vez reconhece os promotores de operons do cluster de nisina, permitindo suas transcrições (Lubelski et al., 2008). O gene *nisK* pode ser transcrito a partir de dois promotores diferentes. O primeiro promotor é independente de nisina, gerando o transcrito *nisRK*, permitindo a expressão constitutiva do sistema de dois componentes anteriormente a presença da nisina no meio (Trmčić et al., 2011). O segundo promotor da origem ao transcrito *nisABCTIPRK* (Ra et al., 1996), é dependente da sinalização de nisina no meio extracelular e pode amplificar a resposta da ativação por nisina (Kleerebezem, 2004). Trmčić et al. (2011) demonstraram que a expressão de *nisK* foi maior quando havia presença de nisina no meio, e que a expressão do gene sofreu modificação em relação ao tempo. Os resultados de expressão do gene de nisina (Figura 3), associados aos resultados de inibição por unidade arbitrária (Figura 2) podem indicar indiretamente a produção de nisina por *L. lactis* subsp. *lactis* nos meios de cultura durante a interação com *L. monocytogenes*.

A Figura 4 apresenta os resultados de expressão relativa do gene *sigB* de *L. monocytogenes* em caldo BHI e leite desnatado reconstituído. Durante a interação em caldo BHI houve uma redução da expressão de *sigB* a 20 °C no tempo de 9 h, seguido por um aumento da expressão nos tempos de 18 e 24 h, porém menor que o dobro de expressão. A 30 °C houve uma redução da expressão em todos os tempos.

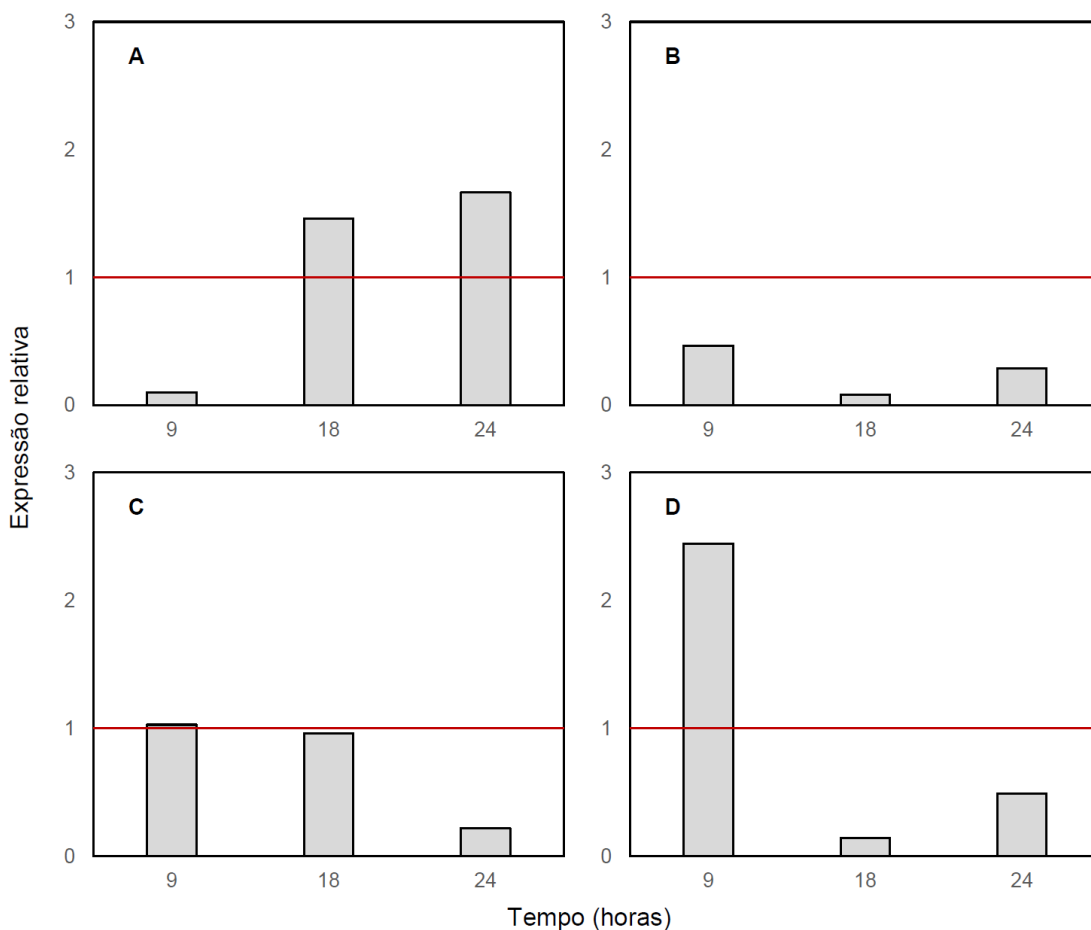


Figura 4. Expressão relativa do gene *sigB* de *L. monocytogenes* Scott A em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D) a 20 (A, C) e 30 °C (B, D) em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 produtor de nisina. O gene *rpID* foi utilizado como controle endógeno e a expressão do gene *sigB* em cultura simples no mesmo meio e tempo de cultivo foi utilizada como controle para realização da expressão relativa por RT-qPCR por análise de $\Delta\Delta Ct$. Linha vermelha: valor referencial para variação da expressão de *sigB*.

Em leite, a expressão de *sigB* foi reduzida no tempo de 24 h a 20 °C, enquanto não houve uma variação nos outros tempos. A 30 °C inicialmente no tempo 9 h houve um aumento de 2,5 da expressão, seguido por uma redução nos tempos 18 e 24 h. O regulon de *sigB* está envolvido com o estresse geral de *L. monocytogenes*, situação em que se encontra no presente estudo em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis*, porém não há um consenso sobre a sua ação em relação a nisina. Enquanto Begley et al. (2006) encontraram que *L.*

monocytogenes mutantes $\Delta sigB$ foram mais sensíveis a níveis sub-letais de nisina, Palmer et al. (2009) demonstraram que mutantes $\Delta sigB$ foram mais resistentes a essa bacteriocina. Ainda, estudo de Laursen et al. (2014) com pediocina, outra bacteriocina com ação na membrana plasmática e perda de potencial de membrana, demonstrou que não houve uma alteração inicial na expressão de *sigB*, porém houve um aumento da expressão de seu regulon, seguida de uma repressão da expressão, tanto do gene *sigB*, quanto de seu regulon.

A Figura 5 apresenta os resultados de expressão relativa de *gadD2* de *L. monocytogenes* em caldo BHI e leite desnatado reconstituído. O gene de glutamato descarboxilase foi relativamente menos expresso em caldo BHI para todos os tempos em ambas as temperaturas. Essa expressão é conflitante com os dados de pH desse meio, que chegou a valores mais baixos que no leite (dados não apresentados). Em leite, em geral foi observada uma maior expressão de *gadD2*, especialmente nos tempos de 18 h para 20 °C e 9h para 30 °C.

A análise foi restrita ao gene *gadD2*, já que *L. monocytogenes* Scott A tem sorologia 4b, grupo que não possui o gene *gadD1* (Chen et al., 2012). O gene *gadD2* foi relacionado com resposta a estresse em pH mais baixo, enquanto *gadD1* em pH mais alto (Cotter et al., 2005). O observado nesse presente estudo aparentemente indica que nos tempos observados ocorria uma resposta ao estresse ácido devido à produção de ácidos orgânicos pelas bactérias (especialmente láctico).

Segundo Begley et al. (2010), mutantes de *L. monocytogenes* $\Delta gadD1$ são mais sensíveis a nisina, o que não foi observado com $\Delta gadD2$. Bonnet & Montville (2005) demonstraram que *L. monocytogenes* pré-adaptadas a

condições ácidas foram mais resistentes a nisina, sendo que Bonnet et al. (2006) atribuem essa resposta cruzada a atividade da F₀F₁-ATPase em economizar ATP celular.

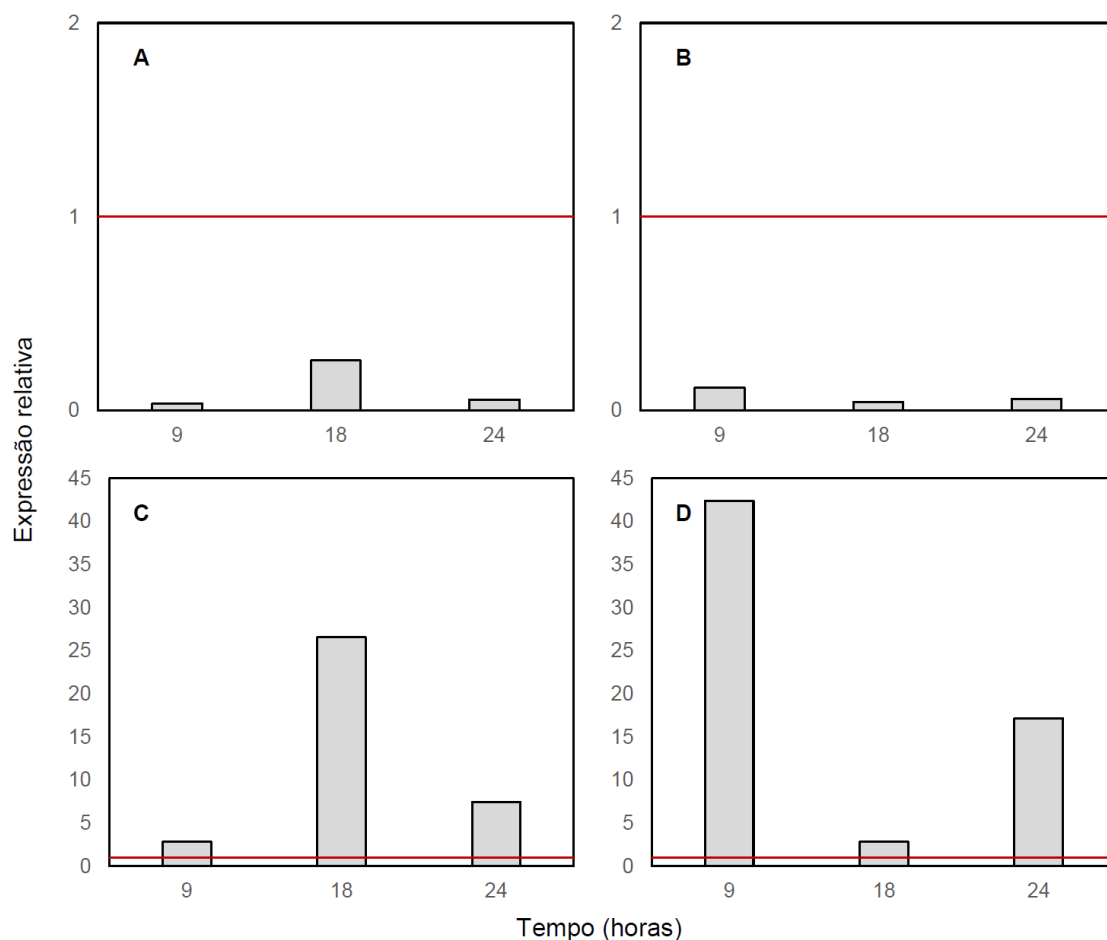


Figura 5. Expressão relativa do gene *gadD2* de *L. monocytogenes* Scott A em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D) a 20 (A, C) e 30 °C (B, D) em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 produtor de nisina. O gene *rplD* foi utilizado como controle endógeno e a expressão do gene *gadD2* em cultura simples no mesmo meio e tempo de cultivo foi utilizada como controle para realização da expressão relativa por RT-qPCR por análise de $\Delta\Delta C_t$. Linha vermelha: valor referencial para variação da expressão de *gadD2*.

A Figura 6 apresenta os resultados de expressão relativa de *groEL* de *L. monocytogenes* em caldo BHI e leite desnatado reconstituído. *L. monocytogenes* apresentou menor expressão de *groEL* quando em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis* em caldo BHI em todos os tempos, nas duas temperaturas. Em

leite, a interação levou a um aumento aproximado de duas vezes nos tempos 9 e 18 h para 20 °C, e de 9 h para 30 °C, sendo seguido de uma diminuição da expressão em ambas as temperaturas.

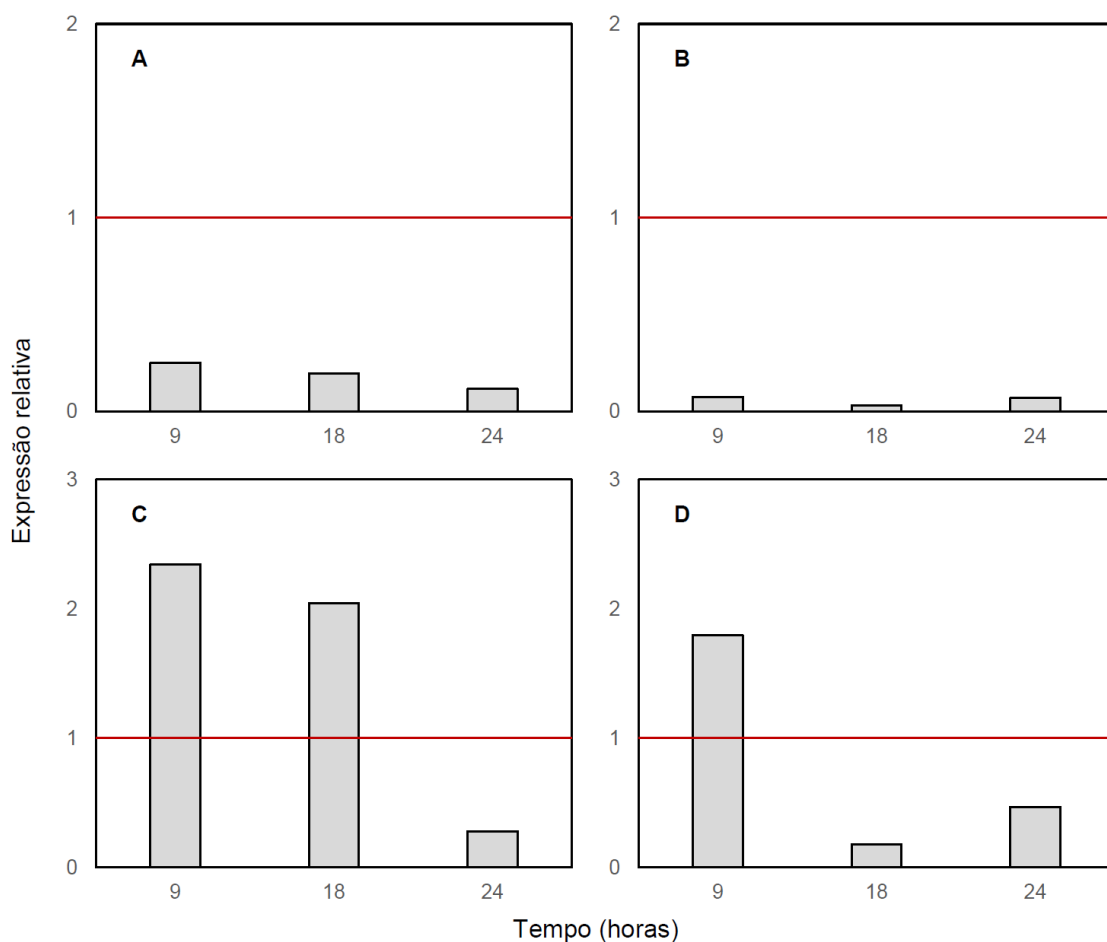


Figura 6. Expressão relativa do gene *groEL* de *L. monocytogenes* Scott A em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D) a 20 (A, C) e 30 °C (B, D) em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 produtor de nisina. O gene *rpID* foi utilizado como controle endógeno e a expressão do gene *groEL* em cultura simples no mesmo meio e tempo de cultivo foi utilizada como controle para realização da expressão relativa por RT-qPCR por análise de $\Delta\Delta Ct$. Linha vermelha: valor referencial para variação da expressão de *groEL*.

O gene *groEL* está envolvido na resposta ao choque térmico (Hayer-Hartl et al., 2016). No entanto, as temperaturas testadas, 20 e 30 °C, estão dentro da faixa de temperatura de multiplicação de *L. monocytogenes*. Outras condições de estresse podem estar relacionadas com a regulação de *groEL*, que

envolvem a perda da conformação proteica no citoplasma, como ácido e radiação ultravioleta (Hartke et al., 1997). Lado et al. (2004) demonstraram que *L. monocytogenes* Scott A tratada com campo elétrico pulsado, tratamento que, como a nisina, induz a permeabilização da membrana, apresentou redução da concentração das chaperonas citoplasmáticas DnaJ, GroEL e GroES, apresentando também redução na resistência a tratamento térmico.

A Figura 7 apresenta os resultados de expressão relativa de *gbu* de *L. monocytogenes* em caldo BHI e leite desnatado reconstituído. A expressão de *gbu* em caldo BHI a 20 °C foi relativamente 2,5 vezes mais expresso no tempo de 9 h, enquanto nos tempos de 18 e 24 h a expressão foi próxima aquela da cultura pura (entre 1 e 1,5 vezes). Na temperatura de 30 °C inicialmente a 9 h a expressão reduziu pela metade, sendo dobrada no tempo de 18 h e próxima a cultura pura a 24 h. Em leite, a expressão de *gbu* teve pouca variação nos tempos de 9 e 18 h, a 20 °C, sendo que no tempo de 24 h ocorreu uma redução da sua expressão. Na temperatura de 30 °C inicialmente a 9 h a expressão foi mais que 2,5 vezes maior, não sofrendo variação no tempo de 18 h e tendo uma grande redução de sua expressão a 24 h.

gbu codifica uma proteína responsável pelo transporte de glicina betaína, soluto compatível responsável pela sobrevivência da bactéria em casos de estresse osmótico e frio (Pittman et al., 2014). As condições de desenvolvimento não estão relacionadas a essas condições de estresse, já que o caldo BHI e o leite apresentam atividade de água adequada para a multiplicação de *L. monocytogenes* (Beuchat et al., 2013), e as temperaturas de 20 e 30 °C não ativam uma resposta de estresse frio.

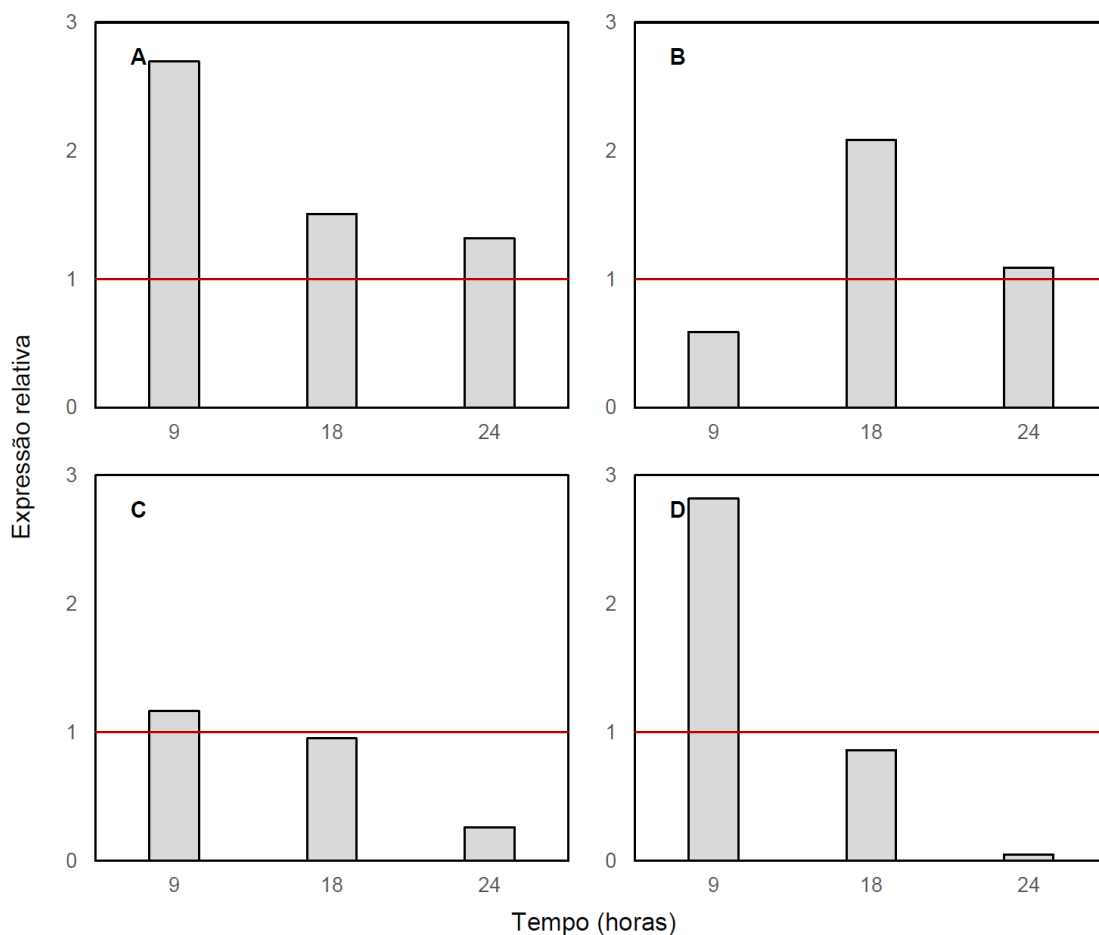


Figura 7. Expressão relativa do gene *gbu* de *L. monocytogenes* Scott A em caldo BHI (A, B) e leite desnatado reconstituído (C, D) a 20 (A, C) e 30 °C (B, D) em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis* DY-13 produtor de nisina. O gene *rpID* foi utilizado como controle endógeno e a expressão do gene *gbu* em cultura simples no mesmo meio e tempo de cultivo foi utilizada como controle para realização da expressão relativa por RT-qPCR por análise de $\Delta\Delta Ct$. Linha vermelha: valor referencial para variação da expressão de *gbu*.

Não há dados disponíveis na literatura quanto à mudança de expressão de *gbu* por *L. monocytogenes* relacionado com a sua interação com *L. lactis* subsp. *lactis*. No entanto, Cetin et al. (2004) determinaram que esse gene pode ser expresso por dois promotores, um relacionado ao sigma principal, σ^A , e outro ao sigma B, relacionado a estresse. Como observado por Laursen et al. (2014) com pediocina, o aumento da expressão inicial (9 h em BHI a 20 °C, e em leite a 30 °C) pode ser dependente do aumento da expressão do regulon de sigma B,

enquanto a redução no tempo de 24 h em ambas temperaturas no leite também pode estar relacionada a redução da expressão, tanto do gene sigma B, quanto de seu regulon.

A pré-exposição a condições ácidas e hiperosmóticas pode levar a uma maior resistência de *L. monocytogenes* a nisina (Bergholz et al., 2013; Bonnet et al., 2006). A utilização de culturas starters produtoras de nisina no alimento leva a uma acidificação gradual, anterior à produção de nisina, o que poderia causar uma resistência cruzada, em comparação a adição de nisina diretamente no alimento. Além disso, a utilização da salga do leite no preparo de queijo também pode levar a essa adaptação de *L. monocytogenes* a nisina. Essas situações devem ser consideradas para a escolha da utilização da nisina *in situ*.

A expressão de genes relacionados a condições de estresse em *L. monocytogenes* em interação com *L. lactis* subsp. *lactis* foi variada nos diferentes tempos, quando comparada com a *L. monocytogenes* isolada. No entanto, a maioria dos genes teve sua expressão relativa reduzida no tempo de 24 h. Essa expressão reduzida pode indicar uma menor capacidade de *L. monocytogenes* em sobreviver a condições de estresse no alimento, levando a uma redução desse micro-organismo em alimentos fermentados com *L. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina.

Referências Bibliográficas

- Begley M, Cotter PD, Hill C & Ross RP** 2010 Glutamate decarboxylase-mediated nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(19) 6541-6546
- Begley M, Hill C & Ross RP** 2006 Tolerance of *Listeria monocytogenes* to cell envelope-acting antimicrobial agents is dependent on SigB. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3) 2231-2234

- Benkerroum N** 2010 Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *International Journal of Dairy Technology* 63(3) 320-338
- Bergholz TM, Tang S, Wiedmann M & Boor KJ** 2013 Nisin resistance of *Listeria monocytogenes* is increased by exposure to salt stress and is mediated via LiaR. *Applied and Environmental Microbiology* 79(18) 5682-5688
- Beuchat LR, Komitopoulou E, Beckers H, Betts RP, Bourdichon F, Fanning S, Joosten HM & Ter Kuile BH** 2013 Low–water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 76(1) 150-172
- Bonnet M & Montville TJ** 2005 Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 40(4) 237-242
- Bonnet M, Rafi MM, Chikindas ML & Montville TJ** 2006 Bioenergetic mechanism for nisin resistance, induced by the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(4) 2556-2563
- Cetin MS, Zhang C, Hutkins RW & Benson AK** 2004 Regulation of transcription of compatible solute transporters by the general stress sigma factor, σ_B , in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 186(3) 794-802
- Chen J, Fang C, Zheng T, Zhu N, Bei Y & Fang W** 2012 Genomic presence of gadD1 glutamate decarboxylase correlates with the organization of *ascB-dapE* internalin cluster in *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* 9(2) 175-178
- Cotter PD, Gahan CG & Hill C** 2001 A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Molecular Microbiology* 40(2) 465-475
- Cotter PD, Ryan S, Gahan CG & Hill C** 2005 Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6) 2832-2839
- de Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG & Penna TCV** 2009 Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20(3) 146-154
- De Vuyst L & Vandamme EJ** 1992 Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Microbiology* 138(3) 571-578
- Gahan CG & Hill C** 2014 *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(9) 1-7
- Ge X, Teng K, Wang J, Zhao F, Zhang J & Zhong J** 2017 Identification of Key Residues in the NisK Sensor Region for Nisin Biosynthesis Regulation. *Frontiers in Microbiology* 8(106) 1-11

- Hartke A, Frère J, Boutibonnes P & Auffray Y** 1997 Differential induction of the chaperonin GroEL and the co-chaperonin GroES by heat, acid, and UV-irradiation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current Microbiology* 34(1) 23-26
- Hayer-Hartl M, Bracher A & Hartl FU** 2016 The GroEL–GroES chaperonin machine: a nanocage for protein folding. *Trends in Biochemical Sciences* 41(1) 62-76
- Hernández D, Cardell E & Zarate V** 2005 Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology* 99(1) 77-84
- Hirsch A** 1951 Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *Microbiology*. 5(1) 208-221
- Jung DS, Bodyfelt FW & Daeschel MA** 1992 Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal of Dairy Science* 75(2) 387-393
- Kleerebezem M** 2004 Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* 25(9) 1405-1414
- Lado BH & Yousef AE**. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: **Ryser ET & Marth EH** Ed(s). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Broken Sound Parkway NW: CRC Press, 2007. 157-213
- Lado BH, Bomser JA, Dunne CP & Yousef AE** 2004 Pulsed electric field alters molecular chaperone expression and sensitizes *Listeria monocytogenes* to heat. *Applied and Environmental Microbiology* 70(4) 2289-2295
- Laursen MF, Bahl MI, Licht TR, Gram L & Knudsen GM** 2014 A single exposure to a sublethal pediocin concentration initiates a resistance-associated temporal cell envelope and general stress response in *Listeria monocytogenes*. *Environmental Microbiology* 17(4) 1134-1151
- Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll GN & Kuipers OP** 2008 Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(3) 455-476
- Ming X & Daeschel MA** 1995 Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* 58(4) 416-420
- Palmer ME, Wiedmann M & Boor KJ** 2009 σ B and σ L contribute to *Listeria monocytogenes* 10403S response to the antimicrobial peptides SdpC and nisin. *Foodborne Pathogens and Disease* 6(9) 1057-1065
- Perin LM** 2011 Caracterização de fatores interferentes na produção de bacteriocinas por bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo. 101 f. Dissertação (Mestrado em

Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011

- Perin LM, Dal Bello B, Belviso S, Zeppa G, de Carvalho AF, Cocolin L & Nero LA** 2015 Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. *International Journal of Food Microbiology* 214 159-167
- Pittman JR, Buntyn JO, Posadas G, Nanduri B, Pendarvis K & Donaldson JR** 2014 Proteomic analysis of cross protection provided between cold and osmotic stress in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Proteome Research* 13(4) 1896-1904
- Ra SR, Qiao M, Immonen T, Pujana I & Saris PE** 1996 Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology* 142(5) 1281-1288
- Ruggirello M, Cocolin L & Dolci P** 2016 Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. *Food Microbiology* 59 112-118
- Schirru S, Todorov SD, Favaro L, Mangia NP, Basaglia M, Casella S, Comunian R, Franco BDGM & Deiana P** 2012 Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. *Food Control* 25(1) 309-320
- Stecchini ML, Aquili V & Sarais I** 1995 Behavior of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* 25(3) 301-310
- Todorov SD** 2008 Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(1) 178-187
- Trmčić A, Monnet C, Rogelj I & Matijašić BB** 2011 Expression of nisin genes in cheese - A quantitative real-time polymerase chain reaction approach. *Journal of Dairy Science* 94(1) 77-85
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J & Kreft J** 2001 *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14(3) 584-640
- Wemekamp-Kamphuis HH, Wouters JA, de Leeuw PP, Hain T, Chakraborty T & Abee T** 2004 Identification of sigma factor σ B-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6) 3457-3466
- Wemekamp-Kamphuis HH, Wouters JA, Sleator RD, Gahan CG, Hill C & Abee T** 2002 Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria*

monocytogenes affect virulence and growth at high osmolarity. Applied and Environmental Microbiology 68(10) 4710-4716

Werbrouck H, Vermeulen A, Van Coillie E, Messens W, Herman L, Devlieghere F & Uyttendaele M 2009 Influence of acid stress on survival, expression of virulence genes and invasion capacity into Caco-2 cells of *Listeria monocytogenes* strains of different origins. International Journal of Food Microbiology 134(1) 140-146

Wesche AM, Gurtler JB, Marks BP & Ryser ET 2009 Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. Journal of Food Protection 72(5) 1121-1138

Zacharof MP & Lovitt RW 2012 Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. APCBEE Procedia 2 50-56

CONCLUSÕES

L. monocytogenes e *L. lactis* subsp. *lactis* desenvolveram em caldo BHI e leite desnatado reconstituído nas temperaturas de 25 e 37 °C, atingindo altas concentrações no tempo de 24 h. *L. lactis* subsp. *lactis* produziu nisina nos dois meios, atingindo a concentração de 400 UA/mL em caldo BHI e leite (25 °C) e 800 UA/mL em leite a 37 °C, no tempo de 24 h.

Durante a interação, inibição de *L. monocytogenes* foi maior em caldo BHI que em leite. No entanto, a produção de nisina foi maior em leite atingindo 3200 e 6400 UA/mL em 24 h nas temperaturas de 25 e 37 °C, respectivamente, enquanto que em BHI a concentração não ultrapassou 100 UA/mL.

A produção de nisina nos dois meios durante a interação foi comprovada por sua detecção no meio de cultivo e pela maior expressão do gene *nisK* em relação ao tempo de incubação. A expressão relativa dos genes relacionados a estresse de *L. monocytogenes* em cultura simples e em co-cultura com *L. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina foi variável. No entanto, a maioria dos genes teve sua expressão reduzida em interação no tempo de 24 h, o que pode indicar uma menor capacidade de *L. monocytogenes* em resistir a condições de estresse quando em interação com *L. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina.