

VALÉRIA QUINTANA CAVICCHIOLI

**DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E POTENCIAL BACTERIOCINOGÊNICO DE
BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE DE CABRA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014**

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

T

C382d
2014 Cavicchioli, Valéria Quintana, 1989-
Diferenciação genética e potencial bacteriocinogênico de
bactérias láticas isoladas de leite de cabra / Valéria Quintana
Cavicchioli. – Viçosa, MG, 2014.
xii, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luis Augusto Nero.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Leite de cabra. 2. Bactérias láticas. 3. Bacteriocinas.
4. PFGE. 5. Inibição. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 637.17

VALÉRIA QUINTANA CAVICCHIOLI

**DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E POTENCIAL BACTERIOCINOGENO DE
BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE DE CABRA**

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2014.



Maria Aparecida Scatamburlo Moreira



Svetoslav Dimitrov Todorov



Luis Augusto Nefo
(Orientador)

*“I’ve had the highest mountains
I’ve had the deepest rivers
You can have it all, but life keeps moving
I take it in, but don’t look down
I’m on top of the world,
Waiting on this for a while now
Paying my dues to the dirt
I’ve been waiting to smile,
Been holding it in for a while,
I could of gave up then, but
Then again I couldn’t have ‘cause
I’ve traveled all this way for something
And now, I’m on the top of the world.”*

On top of the world – Imagine Dragons

AGRADECIMENTOS

A Deus, por preparar meu caminho, guiar cada escolha e possibilitar tantas realizações.

Sei que nunca estive sozinha.

Meu mais profundo agradecimento aos meus pais, Silvio e Manoela, pelo amor sem medidas, e por estarem sempre presentes nas maiores alegrias e principalmente, nos momentos mais difíceis. Amo vocês! Obrigada por sempre me incentivar e me ajudar a realizar meus sonhos.

À minha irmã Vanessa, pelo companheirismo, apoio e pelas boas risadas de sempre. A tia Didi, por me revelar o mundo das letras e me apoiar nesta escolha.

Ao Thiago, por suportar a distância, por todo carinho, compreensão e incentivo fundamentais durante esses anos.

À Marisa, por abrir sua casa e seu coração para me receber em Viçosa.

Às queridas Mirian, Amanda, Francielly e demais agregados da República Damas de Copos, pela casa que dividimos e acima de tudo, pela família que formamos. Por tantas coisas boas que vivemos juntas, e por muitas mais que virão!

Agradeço à minha amiga Geisi, pelo incentivo, suporte e amizade sincera de tantos anos. Paula, por se aventurar nos caminhos que traziam até Viçosa, pelos conselhos e pelos momentos recheados de diversão.

Raquel, pela amizade e parceria constante nos melhores momentos e naqueles em que somente alguém, que enfrenta a mesma experiência é capaz entender.

Aos colegas do InsPOA, que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, fazendo meus dias no laboratório muito mais agradáveis. E em meio a tanto trabalho, agradeço à turma dos “Macrolitros”, que sempre garantiram o sucesso e a alegria dos eventos sociais! Agradeço, com muito carinho, aos que se tornaram grandes amigos e que compartilharam comigo momentos especiais e inesquecíveis: Monique, Mariane, Camilla, Letícia, Japa, Fábio. Vocês estarão para sempre no meu coração!

Aos estagiários: Wesley, Aline, Thalita que não me deixaram enlouquecer com tantas análises!

Aos colegas pós-graduandos do DVT: Pedro, David, Vitor, Carol, Marina, Otávio e Cristian por compartilharem suas experiências, pelo carinho e amizade.

Aos técnicos do DVT, em especial Dagoberto e Luiz, sempre dispostos a me auxiliar.

À Rosi, um anjo de pessoa, capaz de resolver problemas insolúveis e me acalmar em tantos momentos de desespero.

A todos os professores que participaram da minha trajetória acadêmica e contribuíram para a minha formação profissional e pessoal. Especialmente, aos Professores Abelardo e Cida, por tantos esclarecimentos e sugestões. Agradeço ainda, pela disponibilidade da Prof. Cida em participar da minha banca de defesa do mestrado.

Ao Dr. Svetoslav Dimitrov Todorov, pelas contribuições significativas, auxílio na purificação das bacteriocinas e por aceitar o convite da participação na banca de defesa.

Ao prof. Luciano Bersot, que com seu amor e dedicação à profissão me inspirou a seguir seus passos e possibilitou que hoje, esta conquista fosse possível.

Ao meu orientador, Professor Nero, pela confiança em meu trabalho, pela oportunidade concedida e por toda a atenção e dedicação para o desenvolvimento deste trabalho. Por ser um grande exemplo e referência de excelência.

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

Finalmente, agradeço, de forma sincera, a todos que contribuíram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Caprinocultura leiteira e o leite de cabra	3
2. Atividade antimicrobiana de BAL: bacteriocinas	6
3. Controle de micro-organismos patogênicos por bacteriocinas.....	11
4. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	14
Referências	15
OBJETIVOS	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos.....	24
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.	25
Resumo	26
Abstract	27
1. Introdução.....	28
2. Material e Métodos.....	29
2.1. Micro-organismos e condições de cultura	29
2.2. PFGE	34
2.3. Espectro de ação antimicrobiano	35
2.4. Potencial bacteriocinogênico contra <i>Listeria monocytogenes</i>	36
2.5. Estabilidade de bacteriocinas em diferentes valores de pH e temperatura	37
3. Resultados e Discussão	38
3.1. PFGE	38
3.2. Espectro de ação antimicrobiano	44
3.3. Potencial bacteriocinogênico contra <i>Listeria monocytogenes</i>	54
3.4. Estabilidade de bacteriocinas em diferentes valores de pH e temperatura	55
4. Conclusões.....	57
Referências	58
PERSPECTIVAS FUTURAS	69

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Modo de ação das bacteriocinas de Bactérias Láticas (Cotter et al., 2005)..... 10

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Figura 1. Eletroforese em gel de campo pulsado de isolados de *Lactococcus* spp. obtidos de leite de cabra cru – Enzima *SmaI* – Colunas 1 a 6: GLc14, GLc20, GLc13, GLc23, GLc15, GLc10. Colunas 7 a 12: GLc19, GLc22, GLc24, GLc16, GLc18, GLc06. M: Marcador de peso molecular λ ladder 50-1.000kb 38

Figura 2. Eletroforese em gel de campo pulsado dos isolados de *Enterococcus* spp. obtidos de leite de cabra cru – Enzima *SmaI* – Colunas 1 a 5: GEN19, GEN13, GEN16, GEN14, GEN15. Colunas 6 a 11: GEN26, Gen09, Gen20, GEN18, Gen12. M: Marcador de peso molecular λ ladder 50-1.000kb 39

Figura 3. Perfis genéticos obtidos após macrorrestrição com a enzima *SmaI* e PFGE de *Lactococcus* spp. isolados de leite de cabra em associação com genes de bacteriocinas pesquisados por Perin & Nero (2014) 40

Figura 4. Perfis genéticos obtidos após macrorrestrição com a enzima *SmaI* e PFGE de *Enterococcus* spp. isolados de leite de cabra em associação com genes de bacteriocinas pesquisados por Perin & Nero (2014) 42

LISTA DE TABELAS

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Tabela 1. Identificação dos micro-organismos utilizados no presente estudo e detalhamento de suas origens e aplicações.....	31
Tabela 2. Espectro de ação antimicrobiana de <i>Lactococcus</i> spp. isolados de leite de cabra contra 46 micro-organismos indicadores.....	46
Tabela 3. Espectro de ação antimicrobiana de <i>Enterococcus</i> spp. isolados de leite de cabra contra 46 micro-organismos indicadores.....	50
Tabela 4. Atividade bacteriocinogênica (UA/mL) do sobrenadante de BAL isoladas de leite de cabra contra diferentes sorotipos de <i>L. monocytogenes</i>	54
Tabela 5. Efeito do pH e temperatura na atividade bacteriocinogênica dos isolados de BAL selecionados contra a cepa de referência <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644. Atividade bacteriocinogênica expressa em UA/mL.....	56

RESUMO

CAVICCHIOLI, Valéria Quintana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Diferenciação genética e potencial bacteriocinogênico de Bactérias Lácticas isoladas de leite de cabra.** Orientador: Luís Augusto Nero. Co-orientador: Fábio Alessandro Pieri.

O leite de cabra, devido a diversidade de sua microbiota autóctone, é considerado uma boa fonte de novas cepas de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) com potencial para exploração como alternativas à biopreservação de alimentos. A crescente demanda dos consumidores por essas alternativas justifica estudos que investiguem o potencial antimicrobiano desses micro-organismos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética e o espectro de ação de cepas de BAL antagonistas autóctones de leite de cabra que podem ser potencialmente utilizadas como biopreservantes em alimentos. A atividade bacteriocinogênica contra *Listeria monocytogenes* e estabilidade das bacteriocinas em diferentes condições ambientais também foram alvo deste trabalho. Cinquenta e sete isolados de BAL (33 isolados de *Enterococcus* spp. e 24 isolados de *Lactococcus* spp.), previamente caracterizados como bacteriocinogênicos por metodologias genotípicas e fenotípicas, foram submetidos à macrorrestrrição com a enzima *SmaI* e PFGE e seus perfis foram comparados aos resultados de genes bacteriocinogênicos previamente pesquisados. Alta variabilidade genética foi observada para ambos os gêneros. Embora o PFGE tenha apresentado poder discriminatório suficiente, isolados com diferentes resultados para genes de bacteriocinas foram agrupados como idênticos em ambos os gêneros. Doze isolados de *Lactococcus* spp. e dezoito isolados de *Enterococcus* spp., representativos de diferentes pulstipos, foram selecionados para avaliação do espectro de ação antimicrobiana contra 46 micro-organismos indicadores (incluindo BAL, micro-organismos deteriorantes e patógenos). Os isolados de *Lactococcus* spp. demonstraram amplo espectro de ação sobre os micro-

organismos alvo, com destaque para a atividade contra os patógenos *L. monocytogenes* e *Clostridium* spp.. *Enterococcus* spp., de modo similar, foi capaz de inibir diversos micro-organismos alvo, apresentando atividade principalmente contra *Listeria* spp. Cepas Gram-negativas também apresentaram sensibilidade aos isolados de ambos os gêneros. Seis isolados (quatro *Enterococcus* spp. e dois *Lactococcus* spp.) foram avaliados quanto ao potencial bacteriocinogênico contra cepas de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos e todos os sorotipos foram inibidos pelas bacteriocinas produzidas pelas BAL. Adicionalmente, as bacteriocinas produzidas por estes isolados apresentaram ampla faixa de estabilidade em diferentes valores de pH e temperaturas. Os dados obtidos demonstraram que o leite de cabra pode conter uma microbiota bacteriocinogênica diversificada, capaz de inibir micro-organismos de interesse à indústria de alimentos, podendo ser potencialmente empregadas na bioconservação de alimentos produzidos em diferentes condições de processamento.

ABSTRACT

CAVICCHIOLI, Valéria Quintana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Genetic diversity, antimicrobial activity range and bacteriocinogenic potential of Lactic Acid Bacteria isolated from raw goat milk.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Fábio Alessandro Pieri.

Because of the diversity of its indigenous microbiota, goat milk is considered a good source of new strains of lactic acid bacteria (LAB) with potential for exploitation as alternatives to food biopreservation. The increasing consumer demand for these alternatives justifies studies to investigate the antimicrobial potential of these microorganisms. The present study aimed to evaluate the genetic diversity and the antimicrobial action range of autochthonous strains of BAL isolated from goat milk that can be potentially used as biopreservatives in food. The bacteriocinogenic activity against *Listeria monocytogenes* and stability in different environmental conditions were also the target of this study. Fifty-seven isolates of BAL (33 isolates of *Enterococcus* spp., and 24 isolates of *Lactococcus* spp.), previously characterized as bacteriocinogenic by genotypic and phenotypic methods, were subjected to macrorestriction with *Sma*I and PFGE and their profiles were compared with the results of bacteriocinogenic genes previously searched. High genetic diversity was observed for both genders. Although PFGE showed sufficient discriminatory power, isolates with different results for bacteriocinogenic genes were grouped as identical in both genders. Twelve isolates from *Lactococcus* spp. and eighteen isolates of *Enterococcus* spp., representing different pulsotypes, were selected for evaluation of the antimicrobial activity range against 46 target microorganisms (including BAL, pathogens and spoilage microorganisms). *Lactococcus* strains showed a wide spectrum against the targets, especially against *L. monocytogenes* and *Clostridium* spp.. *Enterococcus* spp., similarly, was able to inhibit various targets, acting mainly against *Listeria* spp. Gram- negative

microorganisms also showed sensitivity to isolates of both genders. Six isolates (four *Enterococcus* spp., and two *Lactococcus* spp.) were evaluated for bacteriocinogenic potential against *L. monocytogenes* strains from different serotypes and all of them were inhibited by bacteriocins produced by these LAB. Additionally, bacteriocins produced by these isolates showed a wide range of stability at different pH values and temperatures. The data showed that goat milk can contain a diverse microbiota able to inhibit microorganisms of interest to the food industry and can be potentially employed in biopreservation of foods produced at different processing conditions.

INTRODUÇÃO GERAL

O leite de cabra e seus derivados possuem um inegável apelo comercial devido ao seu status de “alimento saudável”. Essa classificação é justificada por seus componentes nutricionais e pela aceitação dos consumidores intolerantes ao leite de vaca, seja pela dificuldade em digerir os seus glóbulos de gordura ou pela intolerância à caseína. Em sintonia à aceitação comercial desse produto, o Brasil vive atualmente uma fase de expansão da caprinocultura leiteira, com um desenvolvimento significativo na região Sudeste.

Vários micro-organismos naturalmente presentes nesse produto possuem importantes características que podem ser aproveitadas industrialmente e em programas de inocuidade alimentar. Esses micro-organismos são as bactérias ácido lácticas (BAL), e estão naturalmente presentes no leite de cabra como componentes autóctones de sua microbiota. BAL produzem diversas substâncias que são aproveitadas industrialmente para a transformação de leite em produtos fermentados. Além disso, também são capazes de produzir diversas substâncias com potencial antimicrobiano, sendo as bacteriocinas de particular interesse industrial. Essas substâncias são proteínas com grande aplicabilidade nas indústrias de alimentos como ferramentas para garantia de qualidade e inocuidade alimentar, e são capazes de inibir micro-organismos patogênicos e deteriorantes.

Atualmente são descritas inúmeras espécies de BAL capazes de produzir uma infinidade de bacteriocinas, com diferentes características de inibição, espectro de ação, sensibilidade a enzimas e temperatura, além de outros fatores. Atributos antimicrobianos e sensoriais são usualmente cepa-específicos, justificando a avaliação da diversidade genética destas bactérias. Neste sentido, a constante busca de novas cepas bacterianas e novas bacteriocinas produzidas é de especial interesse da indústria

de alimentos e está em sintonia com a atual tendência de consumidores procurarem alimentos saudáveis e livres de resíduos químicos. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a variabilidade genética de BAL isoladas de leite de cabra cru, verificar seu espectro de ação antimicrobiano e potencial bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes*, além de testar a estabilidade das bacteriocinas em diferentes condições ambientais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Caprinocultura leiteira e o leite de cabra

De acordo com a FAO (2010) 95% do rebanho caprino mundial estão concentrados nos países em desenvolvimento, nos quais fornecem múltiplas oportunidades econômicas, contribuindo para a segurança alimentar e redução da pobreza.

A população de cabras no Brasil atingiu a marca de aproximadamente 10 milhões de animais em 2007, tornando-se o 7º maior rebanho mundial (FAO, 2010; Lôbo et al., 2010). Mais de 93% do rebanho nacional está localizada no Nordeste, sendo a Paraíba o principal estado produtor. Embora o Nordeste seja responsável por 67% da produção nacional, a atividade é caracterizada por sistemas de produção familiar de baixa produtividade (Oliveira et al., 2011). A região sudeste, em contrapartida, possui uma cadeia produtiva mais estruturada e organizada, contribuindo de forma significativa com a produção leiteira nacional.

O Brasil destaca-se como maior produtor de leite de cabra da América do Sul, e em 2011 foi responsável pela produção de mais de 148 mil toneladas representando aproximadamente 1,3% do leite produzido mundialmente (FAO, 2011). Embora em níveis mundiais a produção seja relativamente baixa, a caprinocultura leiteira é uma atividade que se apresenta em constante crescimento no país, com aumento de aproximadamente 15% ao ano (FAO, 2011).

Do total de leite que é produzido no Brasil, somente 1.100 toneladas são destinadas à produção de derivados, revelando um importante consumo de leite de fluido (Medina et al., 2011). Assim, os produtos mais importantes no mercado brasileiro

são o leite (pasteurizado, UHT, em pó e congelado) e derivados, como queijos, iogurtes, doces, sorvetes e cosméticos.

O aumento do consumo e de produção do leite de cabra está ligado principalmente às suas características nutricionais e tecnológicas. Seu potencial tecnológico vem sendo muito explorado, a partir do desenvolvimento de produtos diferenciados, como queijos e iogurtes. Inúmeras variedades de derivados, como queijos de cabra são produzidas em todo o mundo (Scintu & Piredda, 2007). Esses produtos possuem um alto valor agregado, devido a características sensoriais particulares e ao apelo que possuem junto aos consumidores, por serem considerados “alimentos saudáveis”.

Esse apelo é justificado por suas características nutricionais e pelos efeitos benéficos para a manutenção da saúde e de funções fisiológicas que seu consumo pode gerar, especialmente para pessoas que possuem alergias ou outros problemas gastrointestinais (Haenlein, 2004; Park, 2007; Ribeiro & Ribeiro, 2010). As proteínas do leite de cabra são mais rapidamente digeridas e os aminoácidos são absorvidos com maior eficiência do que aminoácidos do leite de vaca (Jandal, 1996; Jenness, 1980). Os glóbulos de gordura do leite de cabra são menores do que os de leite de vaca, com maior superfície de contato, o que possibilita a ação efetiva de lipases e facilita a sua digestão (Jandal, 1996; Jenness, 1980). Ainda em relação à gordura, o consumo de leite de cabra reduz os níveis de colesterol total e da fração LDL, devido à maior presença de triglicerídeos de cadeia média (36% no leite de cabra contra 21% no leite de vaca), o que diminui a síntese de colesterol endógeno (Haenlein, 2004). Ao contrário do leite de vaca, que é ligeiramente ácido, o leite de cabra tem natureza alcalina, sendo benéfico para pessoas com problemas de acidez estomacal. Esta alcalinidade se deve à maior quantidade de proteína e a um arranjo diferente de fosfatos (Haenlein, 2004). Diferentemente do leite de vaca, a caseína do leite de cabra não possui a fração α -

caseína, sendo majoritariamente constituído de β -caseína, o que representa uma grande vantagem para pessoas alérgicas ao leite de vaca. Essa condição é considerada comum e acomete cerca de 2,5% das crianças durante os três primeiros anos de vida.

O leite de cabra, assim como o leite de vaca, possui uma microbiota autóctone extremamente rica e complexa, e o seu conhecimento detalhado é essencial para a produção de derivados fermentados (Asteri et al., 2010; Herreros et al., 2005; Wouters et al., 2002). Características sensoriais específicas dos produtos artesanais são provenientes da fermentação natural causada por micro-organismos naturalmente presentes no leite, principalmente por integrantes do grupo das Bactérias Ácido Lácticas (BAL), os quais são muito estudados em todo o mundo visando sua utilização como bioprotetores e coadjuvantes tecnológicos para produção de alguns derivados, como queijos (Asteri et al., 2010; Dal Bello et al., 2012; Dolci et al., 2008; Madrau et al., 2006; Nikolic et al., 2008).

BAL constituem um grupo amplo de micro-organismos que compõem naturalmente a microbiota autóctone de diversos alimentos, incluindo o leite cru e seus derivados. Os gêneros que compõem este grupo são: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* e *Streptococcus* (von Wright & Axelsson, 2012).

Micro-organismos desses gêneros possuem muitas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum: são descritos como bacilos ou cocos Gram-positivos, aerotolerantes, ácido tolerantes, não formadores de esporos, não produtores de catalase e possuem o ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos. O processo de fermentação também pode ser utilizado para identificação deste grupo e pode ocorrer por dois mecanismos: homofermentativo ou heterofermentativo. O mecanismo homofermentativo produz apenas ácido láctico

enquanto o heterofermentativo gera dióxido de carbono, etanol ou acetato, além do ácido láctico (von Wright & Axelsson, 2012).

Os principais gêneros de BAL que compõem a microbiota autóctone de leite são *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* (Dal Bello et al., 2010; Ortolani et al., 2010; Rodriguez et al., 2000). *Lactococcus* e *Enterococcus* são gêneros de BAL muito relevantes para a elaboração de derivados. Cepas de *Lactococcus* são frequentemente utilizadas como cultura starter para a produção de queijos e leites fermentados (O'Sullivan et al., 2002). Estes micro-organismos também são capazes de produzir diversas bacteriocinas. O lantibiótico nisina, mais importante entre as bacteriocinas, é produzido por várias cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e possui um amplo espectro de ação, sendo principalmente ativo contra bactérias Gram-positivas (de Arauz et al., 2009).

Enterococcus spp. encontra-se amplamente distribuído no ambiente, como parte da microbiota do trato gastrointestinal de humanos e outros animais, presentes também em vegetais, solo e alimentos (Gong et al., 2010). Estas bactérias destacam-se pela marcante atividade bacteriocinogênica contra *Listeria monocytogenes*. Porém, o emprego de *Enterococcus* spp. em alimentos ainda exige certa cautela. Por serem responsáveis por infecções nosocomiais e capazes de transferir genes de virulência, este grupo divide as opiniões de pesquisadores a respeito de seu status de segurança. Contudo, o histórico de utilização em alimentos não relata danos à saúde, fazendo destas bactérias uma potencial ferramenta de biopreservação, capaz de contribuir na redução das contagens de *L. monocytogenes* em alimentos.

2. Atividade antimicrobiana de BAL: bacteriocinas

BAL possuem naturalmente a capacidade de inibir micro-organismos patogênicos e deteriorantes presentes nos alimentos (Dal Bello et al., 2010). A interferência de BAL sobre esses organismos pode ocorrer de várias formas: competição por nutrientes, oxigênio, sítios de ligação e produção de substâncias antagonistas (Nes et al., 2012). Várias dessas substâncias são importantes para transformar a matéria-prima em produtos derivados, promovendo o desenvolvimento de características organolépticas particulares, extensão da vida de prateleira, e contribuindo para a inocuidade dos alimentos.

Entre as substâncias produzidas por BAL com potencial antimicrobiano, destacam-se: ácido lático, peróxido de hidrogênio, diacetil e outros ácidos orgânicos. Além desses produtos finais resultantes de seu metabolismo, algumas cepas também são capazes de sintetizar compostos antimicrobianos de origem proteica, denominados bacteriocinas (Carr et al., 2002; Castellano et al., 2008; Cleveland et al., 2001; Deegan et al., 2006; Galvez et al., 2007; Leroy & de Vuyst, 2004; Rodriguez et al., 2000; Wouters et al., 2002).

As bacteriocinas de BAL são definidas como compostos proteicos ribossomalmente sintetizados, liberados extracelularmente, e que possuem atividade antimicrobiana contra outras bactérias, principalmente contra espécies de bactérias estreitamente relacionadas, no qual a célula produtora expressa imunidade específica (Dal Bello et al., 2010; Guinane et al., 2006; O'Sullivan et al., 2002; Rodriguez et al., 2000). Estes peptídeos podem variar quanto ao espectro de atividade, modo de ação, origem genética, massa molecular e propriedades bioquímicas (Eijsink et al., 2002; Galvez et al., 2008; Zasloff, 2002).

Diversas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são capazes de produzir bacteriocinas. Os primeiros estudos relacionados à produção de bacteriocinas por espécies Gram-positivas são referentes à descoberta da nisina, em

1928. Sua comercialização foi iniciada na Inglaterra em 1953 e em 1969 foi considerada segura pela Food and Agriculture Organization (FAO). Em 1988 foi aprovada pela Food and Drug Agency (FDA, EUA) para ser utilizada em queijos pasteurizados (Cotter et al., 2005). Atualmente, a nisina é aprovada para uso como aditivo alimentar em cerca de 50 países, e tem liderado o caminho no campo de estudo de bacteriocinas, não só no que diz respeito ao conhecimento acumulado de suas características químicas e genéticas, como também para extensas e variadas aplicações práticas.

As bacteriocinas geralmente são sintetizadas como pré-peptídeos inativos, que possuem uma sequência guia N-terminal (Macwana & Muriana, 2012). Estes precursores são transportados para a superfície celular durante a fase de desenvolvimento exponencial e são enzimaticamente convertidos a suas formas ativas. Os carreadores contêm uma porção peptídica N-terminal responsável por guiar a clivagem do peptídeo, assim como uma porção C-terminal responsável pelo suprimento de energia e hidrólise de ATP (Aucher et al., 2005).

Diversas categorizações têm sido propostas para as bacteriocinas, no entanto, de acordo com a divisão proposta por Cotter et al. (2005), as bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas dividem-se em três classes, de acordo com sua estrutura química e função biológica (Heng et al., 2007; Nagao et al., 2006). Os modos de ação das bacteriocinas pertencentes a essas classes são ilustrados na Figura 1, e suas principais características são descritas a seguir:

- ✓ **Bacteriocinas da Classe I (Lantibióticos):** Os lantibióticos são pequenos peptídeos que contêm aminoácidos modificados em sua estrutura - lantionina e ou β -metilantionina. De acordo com a estrutura e modo de ação, podem ser divididos em duas subclasses. A subclasse Ia é composta por peptídeos mais longos, flexíveis e carregados positivamente que atuam na membrana plasmática da bactéria alvo

através da formação de poros, ocasionando o efluxo de metabólitos, íons e/ou a diminuição da concentração intracelular de ATP. Por outro lado, a subclasse Ib é caracterizada por peptídeos esféricos, rígidos e neutros ou carregados negativamente que atuam nas reações enzimáticas essenciais de bactérias sensíveis. Embora a atuação do lantibiótico na membrana bacteriana não tenha sido completamente elucidada, há uma molécula, reconhecida como lipídeo II, que participa da ligação da bacteriocina na membrana da bactéria alvo. O lipídeo II é o principal transportador de subunidades de peptídeoglicano do citoplasma para a parede celular. Adicionalmente, ela promove a inserção da bacteriocina na membrana da célula alvo, iniciando a formação de poros. Propõe-se ainda que a bacteriocina pode utilizar o lipídeo II como uma molécula de acoplamento para iniciar o processo de inserção na membrana e formação de poros, causando a morte celular (Figura 1) (Cotter et al., 2005).

- ✓ **Bacteriocinas da Classe II:** Reúne peptídeos não lantibióticos termoestáveis de peso molecular inferior a 10kDa. Em geral, os peptídeos dessa classe possuem uma estrutura helicoidal anfifílica que permite sua inserção na célula alvo, seguida pela despolarização da membrana e morte celular através da formação de poros. Este grupo de bacteriocinas também divide-se em três subclasses. A subclasse IIa é composta por peptídeos semelhantes a pediocina, como a pediocina PA-1, os quais possuem ampla atividade antimicrobiana contra *Listeria spp.* Estes peptídeos contêm uma região N-terminal altamente conservada (pediocina-box YGNGVXC) e dois resíduos de cisteína ligados por uma ponte de enxofre (S-S), que estabiliza a estrutura (Javed et al., 2011). Alterações nesta sequência podem reduzir o potencial inibidor da bacteriocina contra o micro-organismo alvo (Franz et al., 2007). A subclasse IIb é composta por bacteriocinas que necessitam de dois componentes para sua atividade antibacteriana. Esta subclasse inclui bacteriocinas sem a

sequência YGNGVXC e são sintetizadas sem peptídeo líder, requerendo complexo sistema de transporte (Franz et al., 2007; Heng et al., 2007). Outras bacteriocinas que não se enquadram nas subclasses IIa e IIb, fazem parte da subclasse IIc.

- ✓ **Bacteriocinas da Classe III (Bacteriolisinas):** Nesta classe, são agrupadas bacteriocinas grandes e termolábeis que atuam na célula alvo através de hidrólise da membrana celular (Figura 1).

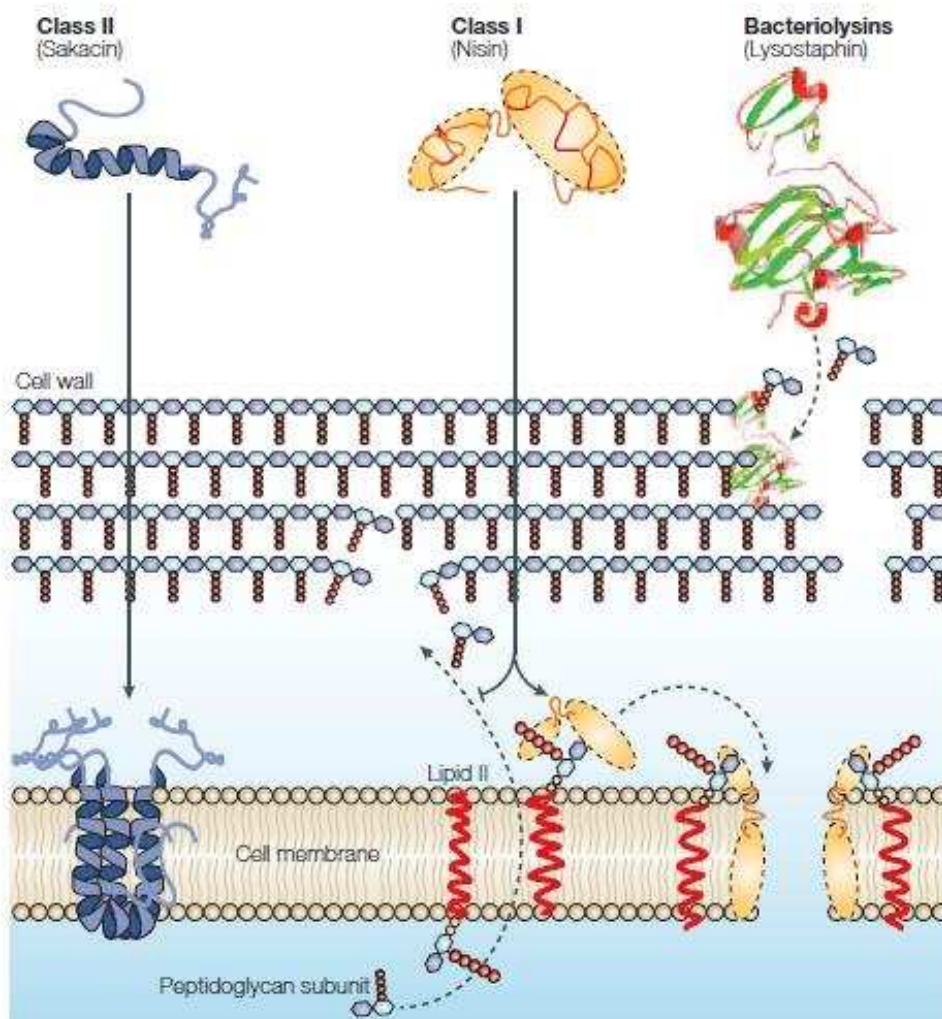


Figura 1. Modo de ação das bacteriocinas de Bactérias Láticas (Cotter et al., 2005).

Quanto ao espectro de ação, as bacteriocinas produzidas por BAL podem possuir espectro amplo ou restrito. Geralmente a atividade ocorre contra bactérias Gram-positivas intimamente relacionadas ao micro-organismo produtor. São capazes de inibir também patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*,

Clostridium perfringens e *Bacillus cereus* (Achemchem et al., 2012; Castellano et al., 2008; de Martinis et al., 2002; Settanni et al., 2014).

Devido à presença da membrana externa em bactérias Gram-negativas, a ação das bacteriocinas é restrita (Deegan et al., 2006; Ortolani et al., 2010; Rodriguez et al., 2000). No entanto, as bacteriocinas podem ser usadas em combinação com outros tratamentos que afetem a integridade da membrana de bactérias Gram-negativas (Cotter et al., 2005; Deegan et al., 2006).

3. Controle de micro-organismos patogênicos por bacteriocinas

O leite constitui um excelente meio para o desenvolvimento de micro-organismos devido à sua composição química e alta atividade de água. Assim, diversas espécies que compõem a microbiota são provenientes de fontes de contaminação, tais como canal do teto e pele dos animais durante a ordenha, equipamentos e utensílios utilizados no processamento, água utilizada na higienização bem como o próprio ambiente de produção. A contaminação dos derivados lácteos, de modo similar, pode ser resultante do próprio leite e de condições inadequadas de higiene durante o processamento ou recontaminações pós-processo (Motarjemi et al., 2014; Samelis et al., 2009).

Sob o ponto de vista de inocuidade, o queijo de cabra, assim como outros tipos de queijos, pode conter uma série de micro-organismos patogênicos, causadores de doença ao homem, com destaque para *L. monocytogenes*, patógeno que pode causar doença de elevada mortalidade (Morgan et al., 2001). *L. monocytogenes* é um contaminante ambiental que apresenta elevada resistência fisiológica. Esta bactéria suporta uma série de estresses ambientais como congelamento, secagem, acidez e altas concentrações de cloreto de sódio, mesmo não sendo formadora de esporos. Outra

característica importante é sua capacidade de formar biofilmes em sítios específicos, o que torna difícil a eliminação deste patógeno de ambientes industriais (Carpentier & Cerf, 2011; Dykes & Moorhead, 2000). Estas características fazem de *L. monocytogenes* um micro-organismo ameaçador à inocuidade dos alimentos e o coloca entre as bactérias que mais preocupam a indústria de alimentos (Vazquez-Boland et al., 2001).

A listeriose humana pode ser causada pela ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*, sendo particularmente perigosa para gestantes, recém-nascidos, indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam o comprometimento do sistema imunológico. A taxa de mortalidade entre os indivíduos afetados pode variar de 20 a 30%. Para indivíduos que não se apresentem nestas condições, a morte é rara. A dose infectante depende da patogenicidade e da virulência da cepa envolvida na infecção, bem como do estado de saúde e dos fatores de risco do hospedeiro (Swaminathan & Gerner-Smith, 2007).

O procedimento mais utilizado para limitar a multiplicação microbiana em queijos é a conservação sob refrigeração, o que oferece condições ideais para a multiplicação de *L. monocytogenes* devido a sua habilidade de se multiplicar em baixas temperaturas. Assim, uma alternativa interessante para prevenir o desenvolvimento deste patógeno é o emprego de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas através do processo denominado bioconservação ou biopreservação (de Martinis & Freitas, 2003).

A biopreservação de alimentos através de bacteriocinas pode ser feita de duas maneiras: pela fermentação do alimento com BAL produtoras de bacteriocinas - emprego *in situ* - ou através da adição de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas ao alimento - aplicação *ex situ* (Balciunas et al., 2013; Cotter et al., 2005; Deegan et al., 2006; Galvez et al., 2007). A produção de bacteriocinas *in situ* é vantajosa em relação a

produção *ex situ*, em termos de legislação e custo, sendo mais atrativa para as indústrias. Contudo, alguns elementos da matriz alimentar e os processamentos aos quais serão submetidos podem interferir na atividade das bacteriocinas (Balciunas et al., 2013; Deegan et al., 2006). Por isso, é importante que as bacteriocinas possuam ampla faixa de atividade sob diferentes condições de processamento as quais o alimento seja submetido, para que mantenham a estabilidade e sejam eficazes na biopreservação de alimentos específicos.

Estudos demonstram que cepas de diversas espécies de BAL utilizadas como culturas starter na produção de queijos são capazes de produzir bacteriocinas *in situ* e podem ser utilizadas no controle de *L. monocytogenes*, assim como de outros patógenos (Achemchem et al., 2006; Achemchem et al., 2005; O'Sullivan et al., 2003; Psoni et al., 2007; Rodriguez et al., 2001; Settanni et al., 2014).

A utilização de bacteriocinas na biopreservação de alimentos oferece diversos benefícios, como aumento da vida de prateleira e redução do risco de veiculação de micro-organismos patogênicos. Ainda podem ser utilizadas substituindo conservantes químicos, gerando alimentos livres de ingredientes artificiais, atendendo à crescente demanda dos consumidores por alimentos minimamente processados, livres de conservantes químicos, porém em condições estritas de qualidade e inocuidade microbiológica (Balciunas et al., 2013; Castellano et al., 2008; Galvez et al., 2007). Além dos benefícios de sua utilização, bacteriocinas produzidas por BAL devem possuir o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para garantir a segurança para aplicação como biopreservantes de alimentos.

Desse modo, o sucesso do uso de bioconservantes estimula o surgimento de estudos objetivando a caracterização e a descoberta de novas bacteriocinas a partir de novas fontes, como alternativas à biopreservação de alimentos.

4. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A seleção de uma cepa de BAL apropriada para aplicação como biopreservante de alimentos demanda atenção crítica à identificação da cultura e avaliação da diversidade genética intraespecífica, uma vez que atributos antimicrobianos e sensoriais são usualmente cepa-específicos (Galvez et al., 2007).

A classificação de cepas de BAL baseada apenas em características fisiológicas e bioquímicas não é suficiente para a avaliação da variabilidade intraespecífica das bactérias. Portanto, para um melhor entendimento da diversidade microbiana é preciso associar técnicas complementares à abordagem microbiológica clássica. Neste sentido, uma variedade de técnicas moleculares tem sido desenvolvida para o estudo de perfis genéticos, como alternativas para a caracterização molecular de isolados. Em geral, estas técnicas são vantajosas sobre os métodos de identificação fenotípica por não serem influenciadas pelas condições de cultura. A seleção do método de tipagem mais apropriado depende do custo, rendimento e reprodutibilidade (Randazzo et al., 2009).

Cepas de BAL isoladas podem ser caracterizadas e agrupadas de acordo com sua similaridade genética utilizando alguns métodos moleculares, como polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), amplificação de elementos repetitivos de DNA (rep-PCR) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), dentre outras técnicas. A análise dos géis gerados especificamente por estes métodos se baseia na digitalização dos perfis genéticos e consequente produção do dendrograma de similaridade. A partir dos dendrogramas é possível a identificação de diferentes *clusters* que fornecem importantes informações sobre a dinâmica e a diversidade entre organismos da mesma espécie (Cocolin et al., 2011).

A técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) é considerada como padrão ouro para análise da variabilidade genética de populações bacterianas devido ao seu alto poder discriminatório e reprodutibilidade. O elemento chave desta técnica consiste na seleção das enzimas de restrição. O uso de enzimas de corte infrequente reduz o número de fragmentos, requerendo uma técnica diferenciada de eletroforese, que seja capaz de separar os grandes fragmentos gerados pela restrição (Goering, 2010; Randazzo et al., 2009). O perfil genético de DNA gerado depende da especificidade das enzimas de restrição utilizadas e da sequência do genoma bacteriano, que é característico de uma espécie bacteriana particular ou cepa. Este perfil genético representa o genoma completo e deste modo é capaz de detectar alterações internas específicas (inserções, deleções ou rearranjos) de determinada cepa ao longo do tempo. O elevado poder discriminatório do PFGE tem sido útil para a diferenciação de cepas pertencentes às mesmas espécies de BAL, avaliação de diversidades e na distinção entre cepas de diferentes espécies de BAL (Randazzo et al., 2009). Esta técnica tem sido utilizada com sucesso para avaliar a diversidade a nível de cepa, tanto em isolados de *Lactococcus* spp. quanto em *Enterococcus* spp. (Bravo et al., 2009; Delgado & Mayo, 2004; Kahala et al., 2008; Psoni et al., 2007).

Referências

- Achemchem, F., Abrini, J., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., & Maqueda, M., 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in goat's milk and goat's jben by the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 strain. *Journal of Food Protection* 69:2370-2376.

- Achemchem, F., Cebrian, R., Abrini, J., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., & Maqueda, M., 2012. Antimicrobial characterization and safety aspects of the bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* F420 isolated from Moroccan raw goat milk. *Canadian Journal of Microbiology* 58:596-604.
- Achemchem, F., Martinez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E., & Maqueda, M., 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *Journal Applied of Microbiology* 99:141-150.
- Asteri, I.A., Kittaki, N., & Tsakalidou, E., 2010. The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. *International Journal of Dairy Technology* 63:234-242.
- Aucher, W., Lacombe, C., Hequet, A., Frere, J., & Berjeaud, J.M., 2005. Influence of amino acid substitutions in the leader peptide on maturation and secretion of mesentericin Y105 by *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bacteriology* 187:2218-2223.
- Balciunas, E.M., Martinez, F.A.C., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M., Converti, A., & Oliveira, R.P.D., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32:134-142.
- Bravo, D., Rodriguez, E., & Medina, M., 2009. Nisin and lactacin 481 coproduction by *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk. *Journal of Dairy Science* 92:4805-4811.
- Carpentier, B. & Cerf, O., 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* 145:1-8.
- Carr, F.J., Chill, D., & Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28:281-370.

- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G., 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science* 79:483-499.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., & Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71:1-20.
- Cocolin, L., Dolci, P., & Rantsiou, K., 2011. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Science* 89:296-302.
- Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3:777-788.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P.D., & Hill, C., 2012. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology* 153:58-65.
- Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., & Cocolin, L., 2010. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT-Food Science and Technology* 43:1151-1159.
- de Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G., & Penna, T.C.V., 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20:146-154.
- de Martinis, E.C.P., Alves, V.F., & Franco, B.D.G.M., 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria in meat products. *Food Reviews International* 18:191-208.

- de Martinis, E.C.P. & Freitas, F.Z., 2003. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control* 14:197-200.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16:1058-1071.
- Delgado, S. & Mayo, B., 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 90:309-319.
- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Zeppa, G., & Cocolin, L., 2008. Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *International Journal of Food Microbiology* 122:302-311.
- Dykes, G.A. & Moorhead, S.M., 2000. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *International Journal of Food Microbiology* 56:161-166.
- Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Holo, H., & Nes, I.F., 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81:639-654.
- FAO, 2010. Country Pasture/Forage Resource Profiles – Brazil, Disponível em: 06/01/2014
- FAO, 2011. <http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569>, Disponível em: 06/01/2014
- Franz, C.M.A.P., van Belkum, M.J., Holzappel, W.H., Abriouel, H., & Galvez, A., 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews* 31:293-310.

- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., & Ben Omar, N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120:51-70.
- Galvez, A., Lopez, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E., & Omar, N.B., 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 28:125-152.
- Goering, R.V., 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution* 10:866-875.
- Gong, H.S., Meng, X.C., & Wang, H., 2010. Mode of action of plantaricin MG, a bacteriocin active against *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Basic Microbiology* 50:S37-S45.
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, R.P., 2006. Spontaneous resistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lactacin 3147. *FEMS Microbiology Letters* 260:77-83.
- Haenlein, G.F.W., 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* 51:155-163.
- Heng, N.C.K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W., & Tagg, J.R., 2007. The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria, p. 45-83. In: Riley, M.A. and Chavan, M.A. (Eds.), *Bacteriocins: ecology and evolution*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Herreros, M.A., Sandoval, H., Gonzalez, L., Castro, J.M., Fresno, J.M., & Tornadijo, M.E., 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology* 22:455-459.

- Jandal, J.M., 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 22:177-185.
- Javed, A., Masud, T., ul Ain, Q., Imran, M., & Maqsood, S., 2011. Enterocins of *Enterococcus faecium*, emerging natural food preservatives. *Annals of Microbiology* 61:699-708.
- Jenness, R., 1980. Composition and Characteristics of Goat Milk - Review 1968-1979. *Journal of Dairy Science* 63:1605-1630.
- Kahala, M., Maki, M., Lehtovaara, A., Tapanainen, J.M., Katiska, R., Juuruskorpi, M., Juhola, J., & Joutsjoki, V., 2008. Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product viili. *Journal of Applied Microbiology* 105:1929-1938.
- Leroy, F. & de Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15:67-78.
- Lôbo, R.N.B., Facó, O., Lôbo, A.M.B.O., & Villela, L.C.V., 2010. Brazilian goat breeding programs. *Small Ruminant Research* 89:149-154.
- Macwana, S. & Muriana, P.M., 2012. Spontaneous bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* as a susceptibility screen for identifying different mechanisms of resistance and modes of action by bacteriocins of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 88:7-13.
- Madrau, M.A., Mangia, N.P., Murgia, M.A., Sanna, M.G., Garau, G., Leccis, L., Caredda, M., & Deiana, P., 2006. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *International Dairy Journal* 16:876-885.
- Medina, R.B., Oliszewski, R., Abeijón Mukdsi, M.C., Van Nieuwenhove, C.P., & González, S.N., 2011. Sheep and goat's dairy products from South America: Microbiota and its metabolic activity. *Small Ruminant Research* 101:84-91.

- Morgan, F., Bonnin, V., Mallereau, M.P., & Perrin, G., 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology* 64:217-221.
- Motarjemi, Y., Moy, G.G., Jooste, P.J., & Anelich, L.E., 2014. Milk and Dairy Products, p. 83-117. In: Motarjemi, Y. and Lelieveld, H. (Eds.), *Food Safety Management*. Academic Press, San Diego.
- Nagao, J., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., & Sonomoto, K., 2006. Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. *Journal of Bioscience and Bioenergy* 102:139-149.
- Nes, I.F., Kjos, M., & Diep, D.B., 2012. Antimicrobial Components of Lactic Acid Bacteria, p. 285-331. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., and von Wright, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N., & Topisirovic, L., 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 122:162-170.
- O'Sullivan, L., Ross, R.P., & Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84:593-604.
- O'Sullivan, L., Ross, R.P., & Hill, C., 2003. A lactacin 481-producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. *Journal of Applied Microbiology* 95:1235-1241.
- Oliveira, C.J.B., Hisrich, E.R., Moura, J.F.P., Givisiez, P.E.N., R.G.Costa, & Gebreyes, W.A., 2011. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. *Small Ruminant Research* 98:64-69.
- Ortolani, M.B.T., Yamazi, A.K., Moraes, P.M., Vicoso, G.N., & Nero, L.A., 2010. Microbiological quality and safety of saw milk and soft cheese and detection of autochthonous Lactic Acid Bacteria with antagonistic activity against *Listeria*

- monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease* 7:175-180.
- Park, Y.W., 2007. Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68:73-87.
- Psoni, L., Kotzamanidis, C., Yiangou, M., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E., 2007. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 114:211-220.
- Randazzo, C.L., Caggia, C., & Neviani, E., 2009. Application of molecular approaches to study Lactic Acid Bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods* 78:1-9.
- Ribeiro, A.C. & Ribeiro, S.D.A., 2010. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research* 89:225-233.
- Rodriguez, E., Arques, J.L., Gaya, P., Nunez, 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* 68:131-137.
- Rodriguez, E., Gonzalez, B., Gaya, P., Nunez, M., & Medina, M., 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 10:7-15.
- Samelis, J., Lianou, A., Kakouri, A., Delbes, C., Rogelj, I., Bogovic-Matijasic, B., & Montel, M.C., 2009. Changes in the microbial composition of raw milk Induced by thermization treatments applied prior to traditional Greek hard cheese processing. *Journal of Food Protection* 72:783-790.
- Scintu, M.F. & Piredda, G., 2007. Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Ruminant Research* 68:221-231.

- Settanni, L., Guarcello, R., Gaglio, R., Francesca, N., Aleo, A., Felis, G.E., & Moschetti, G., 2014. Production, stability, gene sequencing and in situ anti-*Listeria* activity of mundticin KS expressed by three *Enterococcus mundtii* strains. *Food Control* 35:311-322.
- Swaminathan, B. & Gerner-Smidt, P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9:1236-1243.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J., 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14:584-640.
- von Wright, A. & Axelsson, L., 2012. Lactic Acid Bacteria: An Introduction, p. 2-14. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., and von Wright, A. (Eds.), Lactic Acid Bacteria - Microbiological and Functional Aspects. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., & Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 12:91-109.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar a atividade antimicrobiana de isolados de leite de cabra identificados como bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a diversidade genética de BAL bacteriocinogênicas através de macrorrestrição com a enzima *SmaI* e PFGE,
- ✓ Determinar o espectro de ação antimicrobiano sobre BAL, micro-organismos deteriorantes e patógenos
- ✓ Verificar a atividade bacteriocinogênica contra *Listeria monocytogenes* obtidas de diferentes regiões e pertencentes a diferentes sorotipos;
- ✓ Testar a estabilidade das bacteriocinas em diferentes temperaturas e valores de pH;

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO. Diferenciação genética e potencial bacteriocinogênico de Bactérias Láticas isoladas de leite de cabra

Resumo

Cinquenta e sete isolados de Bactérias Ácido Láticas (BAL) autóctones de leite de cabra cru, previamente caracterizados como bacteriocinogênicos, foram avaliados quanto a diversidade genética por PFGE com a enzima *SmaI*. O espectro de ação antimicrobiana dos isolados e a atividade bacteriocinogênica contra *Listeria monocytogenes* foram caracterizados, bem como a estabilidade das bacteriocinas em diferentes condições. A enzima *SmaI* gerou perfis suficientes para a comparação dos isolados, demonstrando grande diversidade entre *Lactococcus* spp. e *Enterococcus* spp., porém os perfis não apresentaram correlação com genes de bacteriocinas previamente pesquisados em ambos os gêneros. *Lactococcus* spp. e *Enterococcus* spp. demonstraram amplo espectro de ação sobre os micro-organismos alvo, com destaque para a atividade contra os patógenos *L. monocytogenes* e *Clostridium* spp. Seis isolados (quatro de *Enterococcus* e dois de *Lactococcus*) apresentaram atividade bacteriocinogênica contra as quatro cepas de *L. monocytogenes* pertencentes a diferentes sorotipos utilizadas como alvo. As bacteriocinas produzidas por estes isolados apresentaram estabilidade térmica e ampla faixa de estabilidade a pH, com redução da atividade somente em pHs próximos a 12.0. Os dados obtidos demonstraram que o leite de cabra pode conter uma microbiota diversa, capaz de inibir micro-organismos de interesse à indústria de alimentos e que pode ser potencialmente empregada na biopreservação de alimentos produzidos sob diferentes condições de processamento.

Palavras-chave: leite de cabra, bactérias lácticas, bacteriocinas, PFGE, inibição

Abstract

Fifty-seven isolates of lactic acid bacteria (LAB) from indigenous raw goat milk, previously characterized as bacteriocinogenic were evaluated for genetic diversity by PFGE with enzyme *SmaI*. The antimicrobial activity range of the strains and the bacteriocinogenic activity against *Listeria monocytogenes* were characterized and also the stability of bacteriocins in different conditions. *SmaI* was sufficient for comparing profiles of isolates demonstrating high genetic diversity among *Lactococcus* spp. and *Enterococcus* spp., but the profiles were not correlated with genes of bacteriocins previously identified in both genders. *Lactococcus* spp. and *Enterococcus* spp. showed a wide antimicrobial activity on the target microorganisms, and showed strong activity against pathogens like *L. monocytogenes* and *Clostridium* spp. Six isolates (four *Enterococcus* spp. and two *Lactococcus* spp.) showed bacteriocinogenic activity against all *L. monocytogenes* strains tested, belonging to different serotypes. The bacteriocins produced by these isolates showed thermostability and wide range stability of pH, with reduction of activity only in pH near to 12.0. These data showed that goat milk can contain a diverse microbiota able to inhibit microorganisms of interest to the food industry and can be potentially employed in biopreservation of food produced at different processing conditions.

Key words: goat milk, lactic acid bacteria, bacteriocins, PFGE, inhibition

1. Introdução

Assim como o leite de vaca, o leite de cabra possui uma microbiota autóctone extremamente rica e complexa, que garante uma grande diversidade de micro-organismos com diferentes características que podem ser potencialmente exploradas pela indústria de laticínios. Bactérias Ácido Láticas (BAL) são naturalmente encontradas nesse produto e possuem a capacidade de produzir diversas substâncias antimicrobianas, dentre as quais destacam-se as bacteriocinas.

Considerando essa capacidade de interferir no desenvolvimento microbiano, culturas de BAL bacteriocinogênicas estão sendo amplamente utilizadas na indústria de alimentos, inclusive na produção de derivados do leite de cabra, visando o controle de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (Centeno et al., 2004; Dal Bello et al., 2010; Nikolic et al., 2008; Psoni et al., 2007; Schirru et al., 2012). Essa aplicação tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas que visam o isolamento e identificação de micro-organismos com grande potencial antimicrobiano naturalmente presentes no leite de cabra, como uma fonte alternativa para biopreservação de alimentos.

Contudo, a escolha de uma cultura láctica apropriada para aplicação como biopreservante de alimentos demanda atenção crítica à sua identificação e avaliação da diversidade genética intraespecífica, uma vez que atributos antimicrobianos e sensoriais são usualmente cepa-específicos. Portanto, é necessário utilizar metodologias adequadas para a seleção de cepas que possam ser empregadas na produção de alimentos (Park, 2007). Dessa forma, o PFGE tem sido usualmente empregado como metodologia para determinação de perfis genéticos de isolados, assim como testes fenotípicos e genéticos são empregados para caracterizar o potencial antimicrobiano de cepas bacteriocinogênicas (Dal Bello et al., 2010; Randazzo et al., 2009; Todorov et al., 2010).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a diversidade genética e o espectro de ação de cepas de BAL antagonistas autóctones de leite de cabra que podem ser potencialmente utilizados como biopreservantes de produtos lácteos. A atividade bacteriocinogênica contra *L. monocytogenes* e estabilidade das bacteriocinas em diferentes condições ambientais também são alvo deste trabalho.

2. Material e Métodos

2.1. Micro-organismos e condições de cultura

O presente estudo foi conduzido com uma coleção de BAL composta por 57 isolados, todos obtidos de leite de cabra e caracterizados como bacteriocinogênicos por Perin & Nero (2014). Os isolados foram identificados por sequenciamento de regiões dos genes 16S rDNA e *pheS*, e caracterizados como bacteriocinogênicos pela metodologia spot-on-the-lawn e sensibilidade enzimática, além da pesquisa de genes relacionados a produção de bacteriocinas: lantibióticos (*lanB*, *lanC* e *lanM*), nisina (*nis*), e enterocinas (A, P, B, L50B, e AS-48). Os códigos utilizados para denominação dos isolados, assim como as suas identificações, são apresentados na Tabela 1. Os isolados foram mantidos em caldo de Man, Rogosa & Sharpe (MRS, BD - Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA), suplementados com 20% de glicerol e mantidos a temperatura de -20°C. Para utilização nos ensaios, as culturas foram recuperadas em caldo MRS e incubadas overnight a 37°C.

Para a avaliação do espectro de ação antimicrobiano, foram utilizados 46 micro-organismos alvo, incluindo cepas de referência e isolados de campo (Tabela 1). Nos testes de potencial bacteriocinogênico foram utilizadas três cepas de campo de *L. monocytogenes* e nos testes de estabilidade das bacteriocinas, a cepa alvo foi *L. monocytogenes* ATCC 7644. BAL foram cultivadas em caldo MRS, *Listeria* spp., em

caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) os demais microorganismos em infusão de cérebro e coração (BHI, Oxoid), overnight, a 37°C.

Tabela 1. Identificação dos micro-organismos utilizados no presente estudo e detalhamento de suas origens e aplicações

Gênero	Espécie	n		Utilização
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>	3	GLc01, GLc02, GLc03 - Isolados de leite de cabra cru (Perin & Nero, 2014)	Culturas bacteriocinogênicas
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	1	CNRZ 481/45	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	24	ATCC 11007	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			ATCC 7962 DPC 3147 GLc04, GLc05, GLc06, GLc07, GLc08, GLc09, GLc10, GLc11, GLc12, GLc13, GLc14, GLc15, GLc16, GLc17, GLc18, GLc19, GLc20, GLc21, GLc22, GLc23, GLc24 - Isolados de leite de cabra cru (Perin & Nero, 2014)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
<i>Latobacillus</i>	<i>L. sakei</i>	2	ATCC 15521	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			2a - Isolado de linguiça suína (de Martinis & Franco, 1998)	Controle positivo de ação antimicrobiana
	<i>L. plantarum</i>	2	ATCC 8014 INRA-CNRZ73	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	11	ATCC 19433	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			FAIR-E177 FAIR-E179 GEn18, GEn19, GEn20, GEn21, GEn22, GEn23, Gen24, Gen25 - Isolados de leite de cabra cru (Perin & Nero, 2014)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana Culturas bacteriocinogênicas
	<i>E. faecium</i>	9	BFE 1072 - Isolados de fezes de suínos (du Toit et al., 2000) FAIR-E178 GEn26, GEn27, GEn28, Gen29, GEn30, GEn31, GEn32 (Perin & Nero, 2014)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana Culturas bacteriocinogênicas

Cont. Tabela 1

Gênero	Espécie	n		Utilização
<i>Enterococcus</i>	<i>E. durans</i>	17	GEn01, GEn02, GEn03, GEn04, GEn05, GEn06, GEn07, GEn08, GEn09, GEn10, GEn11, GEn12, GEn13, GEn14, GEn15, GEn16, GEn17 - Isolados de leite de cabra cru (Perin & Nero, 2014)	Culturas bacteriocinogênicas
	<i>E. hirae</i>	1	GEn33 - Isolado de leite de cabra cru (Perin & Nero, 2014)	Cultura bacteriocinogênica
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	5	ATCC 12600	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			ATCC 29213	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			ATCC 14458	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			ATCC 8095	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
<i>S. aureus</i>	2	ATCC 12598	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana	
		26BP6 - Isolado de leite cru (Viçosa et al., 2010)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana	
<i>Listeria</i>	<i>L. innocua</i>	2	23St1 - Isolado de queijo (Viçosa et al., 2010)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			ATCC 23235	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			ATCC 33090	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			Li76 - Isolado de produtos cárneos (Barros et al., 2007)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
<i>L. welshimeri</i>	1	Lw47 - Isolado de produtos cárneos (Barros et al., 2007)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana	
		8	ATCC 7644	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana e potencial bacteriocinogênico
			ATCC 19112	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
<i>L. monocytogenes</i>	8	ATCC 13117	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana	
		ATCC 15313	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana	
		Lm55 - Isolado de produtos cárneos (Barros et al., 2007)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana	

Cont. Tabela 1

Gênero	Espécie	n		Utilização
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>		L10 - Isolado de cortes cárneos (Camargo, 2013)	Alvo nos testes de potencial bacteriocinogênico
			L11 - Isolado de cortes cárneos (Camargo, 2013)	Alvo nos testes de potencial bacteriocinogênico
			537 - Isolado de cortes cárneos (Camargo, 2013)	Alvo nos testes de potencial bacteriocinogênico
<i>Clostridium</i>	<i>C. sporogenes</i>	1	ATCC 3584	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>C. perfringens</i>	1	ATCC 3626	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>C. botulinum</i>	1	ATCC 17786	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>C. novyi</i>	1	ATCC 19402	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	1	Bs - Isolado de leite pasteurizado (Montanhini et al., 2013)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>B. cereus</i>	1	LP56 - Isolado de leite pasteurizado (Montanhini et al., 2013)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
<i>Salmonella</i>	<i>S. Typhimurium</i>	2	ATCC 14028	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			84 - Isolado de corte cárneo (Cossi et al., 2014)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>S. Dublin</i>	1	45 - Isolado de corte cárneo (Cossi et al., 2014)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>S. Cholerasuis</i>	1	Isolado de corte cárneo (Cossi et al., 2014)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>S. Enteritidis</i>	1	Isolado de corte cárneo (Cossi et al., 2014)	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	1	ATCC 27853	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>P. alcaligenes</i>	1	ATCC 14909	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>P. putida</i>	1	ATCC 15175	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
	<i>P. fluorescens</i>	1	NCTC 10038	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	1	ATCC 9610	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	2	ATCC 00171	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana
			ATCC 11229	Alvo nos testes de espectro de ação antimicrobiana

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA; CNRZ: National Centre for Zootechnical Research, Rennes, França; DPC: Dairy Products Research Centre, Fermoy, Irlanda
 FAIR-E: Enterococcus pertencentes à coleção FAIR-E, do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Gent, Gent, Bélgica; NCTC: National Collection of Type Cultures, Salisbury, Inglaterra

2.2. PFGE

Os isolados foram submetidos à caracterização molecular pela técnica de PFGE. O preparo de DNA genômico em blocos de agarose foi realizado de acordo com o método descrito por Graves & Swaminathan (2001) com pequenas modificações. A macrorrestrição do DNA foi feita com a endonuclease de restrição *SmaI* (5'-CCC GGG-3') (Promega, Madison, WI, EUA). Para a macrorrestrição dos isolados de *Lactococcus* spp. foram utilizadas 30 unidades da enzima diluídas em 300 µL de Restriction Enzyme Buffer (Promega) 1X a 25°C por 18 horas em banho-maria. Os isolados de *Enterococcus* spp. foram submetidos à macrorrestrição com 25 unidades da enzima *SmaI* diluídas em 150 µL Restriction Enzyme Buffer 1X (Promega) a 30°C por 18 horas em banho-maria.

Os fragmentos de DNA obtidos foram inseridos em gel de agarose a 1% e submetidos à eletroforese em campo pulsado no sistema CHEF-DRII (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Para obter a separação dos fragmentos, a eletroforese dos géis de *Lactococcus* spp. foi conduzida em pulsos de 5-25 segundos, durante 24 horas a 14°C, com voltagem de 6V/cm (Okuklu, 2005), enquanto a eletroforese dos géis de *Enterococcus* spp. foi conduzida em dois blocos, com pulsos de 3,5-25 segundos durante 12 horas no bloco inicial e 1-5 segundos durante oito horas no bloco final, ambos a 14°C com voltagem de 6V/cm (Turabelidze et al., 2000). Os géis de agarose foram corados em banho de gelRed (Biotium, Hayward, CA, EUA) durante uma hora, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em transiluminador. O marcador PulseMarker (50-1.000kb) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, EUA) foi incluído em todos os géis como marcador de peso molecular para normalização das posições de referência.

Os perfis gerados pela macrorrestrição com a enzima *SmaI* foram analisados e comparados no software Bionumerics 6.6 (Applied Maths, Gand, Belgium), com base no coeficiente Dice de 5% para similaridade de bandas. O algoritmo UPGMA foi

utilizado para o agrupamento e construção dos dendrogramas. Os perfis genéticos obtidos foram analisados para verificação de similaridade e verificação de possíveis associações relacionadas aos genes de bacteriocinas previamente identificados (Perin & Nero, 2014).

2.3. Espectro de ação antimicrobiano

Após a interpretação dos perfis gerados pelo PFGE, isolados representativos dos pulsotipos obtidos de cada gênero foram selecionados para avaliação do espectro de ação antimicrobiano. Estes isolados tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada pela metodologia spot-on-the-lawn (Leroy & de Vuyst, 2004; Stern et al., 2006) contra 46 micro-organismos alvo (Tabela 1), incluindo BAL, micro-organismos deteriorantes e patógenos. Alíquotas de 1 µL de cada cultura bacteriocinogênica foram semeadas pontualmente na superfície de placas contendo ágar MRS modificado (MRSm, contendo 0,5% de dextrose) e incubadas a 25°C por 24 horas em anaerobiose. Após incubação, cada placa recebeu uma sobrecamada de 8 mL de um meio de cultura suplementado com ágar (0.8% m/v) e inoculado com aproximadamente 10⁵ UFC/mL de um dos micro-organismos indicadores. MRS (BD) foi utilizado como meio de cultura para BAL, tripticase de soja (TSB, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para *Listeria* spp. e infusão de cérebro e coração (BHI, Oxoid) para os demais micro-organismos.

Após a solidificação, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e avaliadas quanto à formação de halo de inibição ao redor da cultura de BAL semeada. A presença de halos de inibição com diâmetros maiores que 2 mm foi considerada como resultado positivo para atividade antimicrobiana contra o micro-organismo alvo testado. Para todos os testes de inibição, a cepa 2a (*Lactobacillus sakei* 1) foi utilizada como controle positivo.

2.4. Potencial bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes*

Considerando os resultados previamente obtidos, os isolados de *Lactococcus* spp. (GLc03 e GLc05) e *Enterococcus* spp. (GEn09, GEn12, GEn14 e GEn17) que apresentaram amplo espectro inibitório em relação aos micro-organismos alvo testados foram selecionados para esta etapa. A quantificação do potencial bacteriocinogênico foi avaliada pelo método de diluição crítica (Bromberg et al., 2006; Mayr-Harting et al., 1972) contra três isolados de campo de *L. monocytogenes* (pertencentes aos sorotipos 1/2c, 4b e 4b novo padrão - Camargo, 2013) e a cepa de referência *L. monocytogenes* ATCC 7644 (sorotipo 1/2a) (Tabela 1). Os isolados bacteriocinogênicos foram cultivados em caldo MRS durante 12 horas a 37°C. Posteriormente, os tubos contendo os inóculos foram submetidos à centrifugação a 6.800 g por 20 minutos a 4°C.

O sobrenadante obtido das culturas foi neutralizado com solução de NaOH 1N até atingir o pH de 6,0, para eliminação da atividade antimicrobiana devido à produção de ácidos. Em seguida, foi esterilizado por meio de filtros de 0,22 µm de baixa afinidade a proteínas (Merck Millipore, Ltd., Cork, Irlanda), acondicionado em tubos estéreis e aquecidos a 80°C por 10 minutos para eliminação da atividade inibitória remanescente por ácidos e peróxido de hidrogênio. Após estes tratamentos, o sobrenadante foi diluído em escala seriada na proporção de 1:2 (v/v) até 1:64 em solução tampão de sódio (PBS) a 10mM, pH 7,0.

Posteriormente, foram preparadas placas contendo TSB suplementado com 1,5% ágar inoculado individualmente com as cepas-alvo de *L. monocytogenes*, na concentração de 10⁵ UFC/mL padronizados pela escala de McFarland. Após solidificação, 10µL de cada diluição dos sobrenadantes tratados, foi semeada pontualmente nas placas, de acordo com o método ágar-spot (Todorov et al., 2008). com

incubação a 37°C por 24 horas. A formação de halos de inibição ao redor dos poços foi avaliada após o período de incubação. A atividade antimicrobiana foi expressa como Unidades Arbitrárias (UA/mL), calculada como $a^b \times 100$, onde “a” representa o fator de diluição e “b”, a última diluição que produziu halos de inibição de no mínimo 2 mm de diâmetro (Schirru et al., 2012).

2.5. Estabilidade de bacteriocinas em diferentes valores de pH e temperatura

Os seis isolados selecionados (GLc03, GLc05, GEn09, GEn12, GEn14 e GEn17) foram utilizados também nesta etapa. Alíquotas dessas culturas foram transferidas para caldo MRS, incubadas e tratadas para obtenção de sobrenadantes, como descrito anteriormente.

Para a avaliação da estabilidade a diferentes valores de pH, alíquotas de 1mL de cada sobrenadante foram distribuídas em microtubos, o pH ajustado a 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 e 12.0 com HCl (1 mol/L) ou NaOH (1 mol/L) e incubados a 30°C por 1 h. Após a incubação, o pH dos sobrenadantes foi reajustados para 6.0

Para a avaliação da estabilidade a diferentes temperaturas, alíquotas de 1mL de cada sobrenadante foram distribuídas em microtubos, o pH ajustado a 6.0 com NaOH (1 mol/L), e submetidas a 7°C, 40°C, 60°C, 80°C por 2 horas e a 121°C por 20 minutos.

Em ambos os testes, a atividade bacteriocinogênica foi avaliada pelo método de diluição crítica, conforme descrito previamente, utilizando *L. monocytogenes* ATCC 7644 como micro-organismo alvo. Após incubação, a interpretação dos resultados foi realizada conforme descrita previamente.

3. Resultados e Discussão

3.1. PFGE

A Figura 1 apresenta o aspecto do padrão de bandas obtidos após macrorrestrrição com *SmaI* em 12 isolados identificados como *Lactococcus* spp. De maneira geral, *SmaI* determinou a clivagem do DNA cromossomal dos isolados identificados como *Lactococcus* spp. em 10 a 15 fragmentos. Em relação a *Enterococcus* spp., a digestão do DNA por *SmaI* gerou padrões de bandas com 14 a 18 fragmentos (Figura 2).

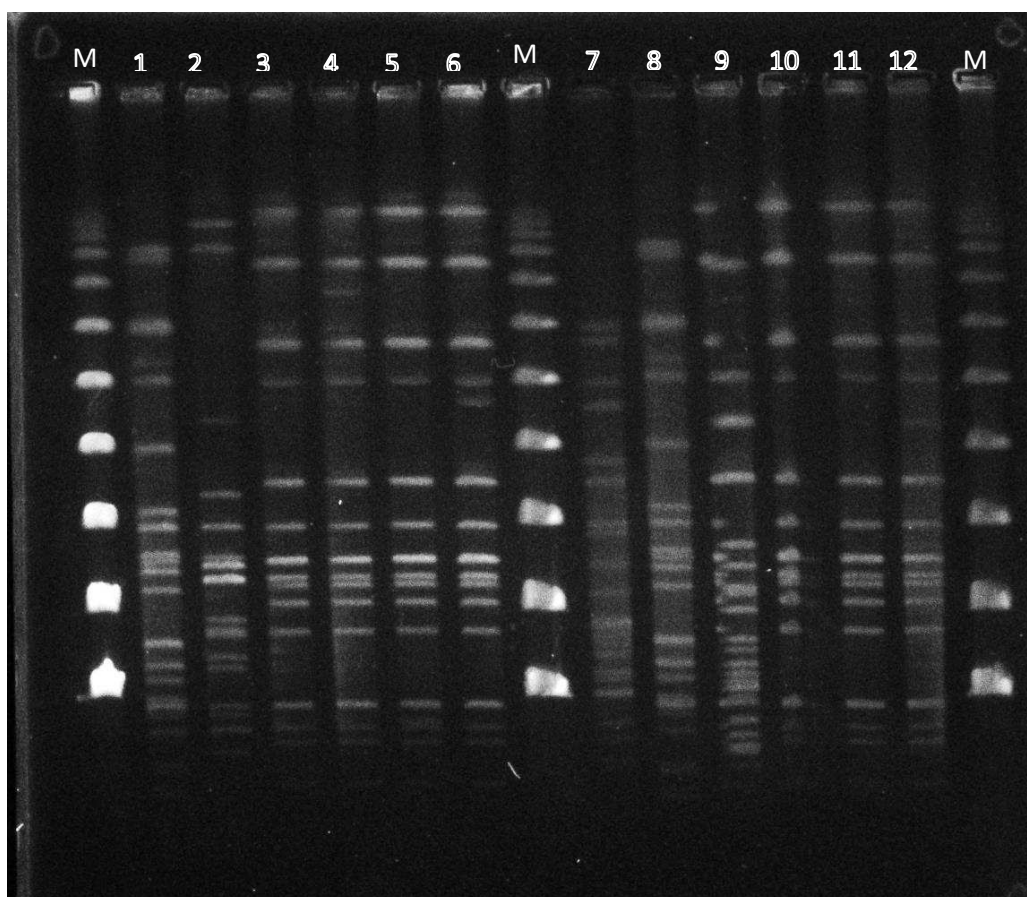


Figura 1. Eletroforese em gel de campo pulsado de isolados de *Lactococcus* spp. obtidos de leite de cabra cru – Enzima *SmaI* – Colunas 1 a 6: GLc14, GLc20, GLc13, GLc23, GLc15, GLc10. Colunas 7 a 12: GLc19, GLc22, GLc24, GLc16, GLc18, GLc06. M: Marcador de peso molecular λ ladder 50-1.000kb

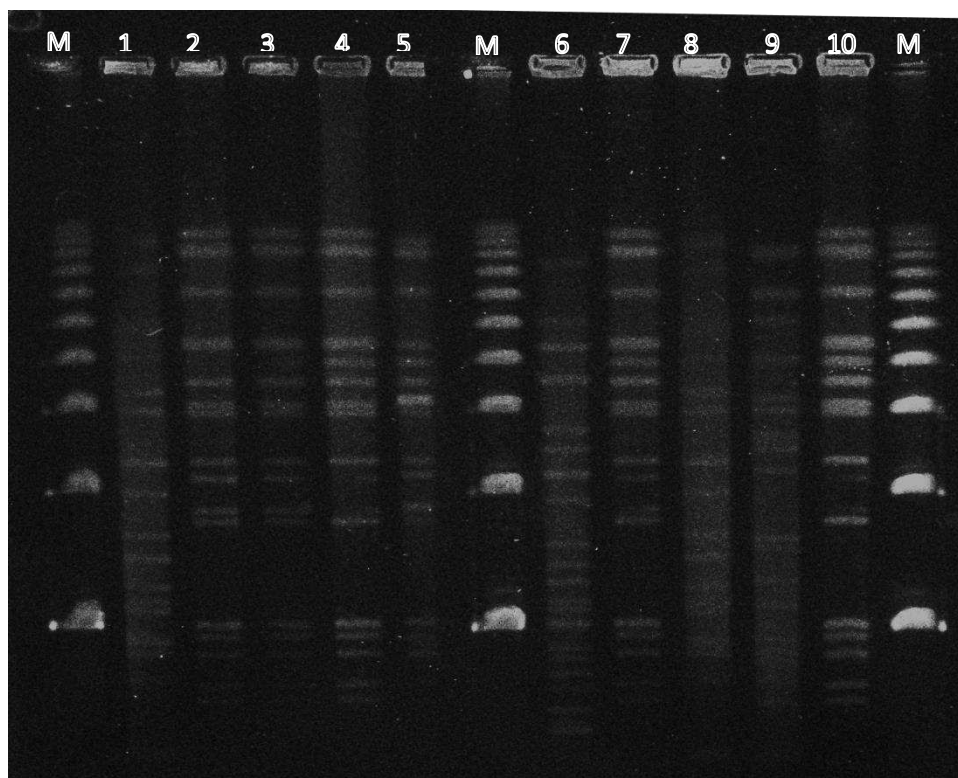


Figura 2. Eletroforese em gel de campo pulsado dos isolados de *Enterococcus* spp. obtidos de leite de cabra cru – Enzima *SmaI* – Colunas 1 a 5: GEn19, GEn13, GEn16, GEn14, GEn15. Colunas 6 a 11: GEn26, Gen09, Gen20, GEn18, Gen12. M: Marcador de peso molecular λ ladder 50-1.000kb

A escolha da enzima de restrição é um ponto crítico no PFGE. Avaliações sobre a variabilidade dos isolados são baseadas na habilidade de comparar os padrões de bandas gerados a partir dos fragmentos de restrição, por isso deve se utilizar preferencialmente uma enzima capaz de gerar um padrão interpretável, com 10 a 25-30 fragmentos no máximo (Goering, 2010; van Belkum et al., 2007).

Em estudo realizado com bactérias lácticas, (Kahala et al., 2008) comparou o uso das enzimas *SmaI* e *NotI* na restrição de isolados de *Lactococcus* spp. e *Leuconostoc* spp. A enzima *SmaI* produziu de 10 a 20 fragmentos, enquanto o uso de *NotI* permitiu a clivagem de somente 3 a 10 fragmentos. O amplo uso da enzima *SmaI* em análises de PFGE pode ser observado em outros trabalhos avaliando a diversidade de BAL (Bravo et al., 2009; Kahala et al., 2008; Kelly et al., 2010; Mannu et al., 2000;

Psoni et al., 2007), demonstrando confiabilidade nos resultados obtidos a partir da escolha desta enzima.

A comparação dos perfis de restrição dos isolados de *Lactococcus* spp. em associação com os genes de bacteriocinas previamente pesquisados por Perin & Nero (2014) é apresentada na Figura 3. Por meio do PFGE para *L. lactis* observou-se importante diversidade genética, visto que 22 isolados passíveis de restrição apresentaram 14 diferentes perfis genéticos. Os perfis foram agrupados em dois clusters principais (L1 e L2). O cluster L1 reuniu seis pulsotipos que apresentaram percentual interno mínimo de similaridade de 73%. Neste cluster, os isolados GLc14 e GLc22 apresentaram nível de similaridade maior que 90%. O cluster L2 reuniu 16 isolados distribuídos em oito pulsotipos, com percentual interno mínimo de 83% de similaridade. Nove isolados (GLc04, GLc08, GLc10, GLc11, GLc12, GLc15, GLc16, GLc17 e GLc18) apresentaram 100% de similaridade genética (Figura 3).

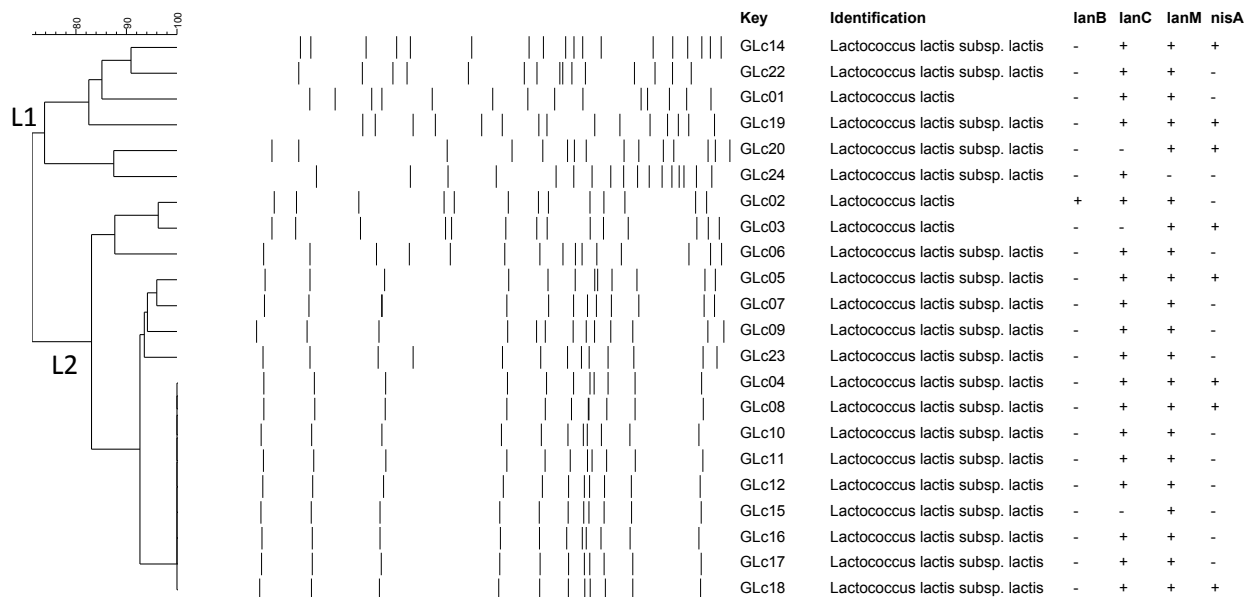


Figura 3. Perfis genéticos obtidos após macrorrestrição com a enzima *Sma*I e PFGE de *Lactococcus* spp. isolados de leite de cabra em associação com genes de bacteriocinas pesquisados por Perin & Nero (2014)

Os isolados avaliados neste estudo demonstraram alta heterogeneidade intraespecífica, como observado também por outros autores (Delgado & Mayo, 2004; Gutiérrez-Méndez et al., 2010; Passerini et al., 2010). A diversidade intraespecífica pode ser influenciada pela fonte de isolamento e as características apresentadas por esta espécie estão vinculadas ao ecossistema em que habitam (Gutiérrez-Méndez et al., 2010).

Em relação a *Enterococcus* spp., 31 isolados foram adequadamente clivados pela enzima de restrição *Sma*I. A grande variabilidade também foi observada neste gênero, pela geração de 20 perfis de restrição, agrupados em quatro clusters principais (E1, E2, E3, E4) (Figura 4). O cluster E1 reuniu somente isolados de *E. durans*, distribuídos em 5 pulsotipos, com similaridade mínima de 90%. Neste cluster, 13 amostras exibiram 100% de similaridade. O cluster E2 foi composto por apenas um isolado (*E. faecalis* – Gen23), com 80% de similaridade ao cluster E1. Os clusters E3 e E4 agruparam 11 e quatro isolados, respectivamente, apresentando os maiores percentuais de variabilidade. E3 foi composto por 9 pulsotipos, com somente quatro isolados 100% similares. Os isolados de E4 apresentaram perfis diversos, com percentual máximo de similaridade de 88%.

A técnica de PFGE tem sido amplamente utilizada na avaliação de relações epidemiológicas entre isolados clínicos de *Enterococcus* spp. Contudo, sua utilização como técnica molecular para o estabelecimento de relações genéticas entre isolados provenientes de produtos lácteos e ambientes de fabricação destes produtos também tem sido relatada, demonstrando sua utilidade sob esta perspectiva. PFGE demonstrou ser um método de tipagem eficiente e altamente reprodutivo para a microbiota do queijo artesanal Pecorino Sardo (Manu et al., 1999), assim como para caracterização de enterococos do ambiente de produção de queijo (Gelsomino et al., 2002), sendo capaz

também de evidenciar a variabilidade entre isolados de queijo Bryndza (Jurkovic et al., 2007).

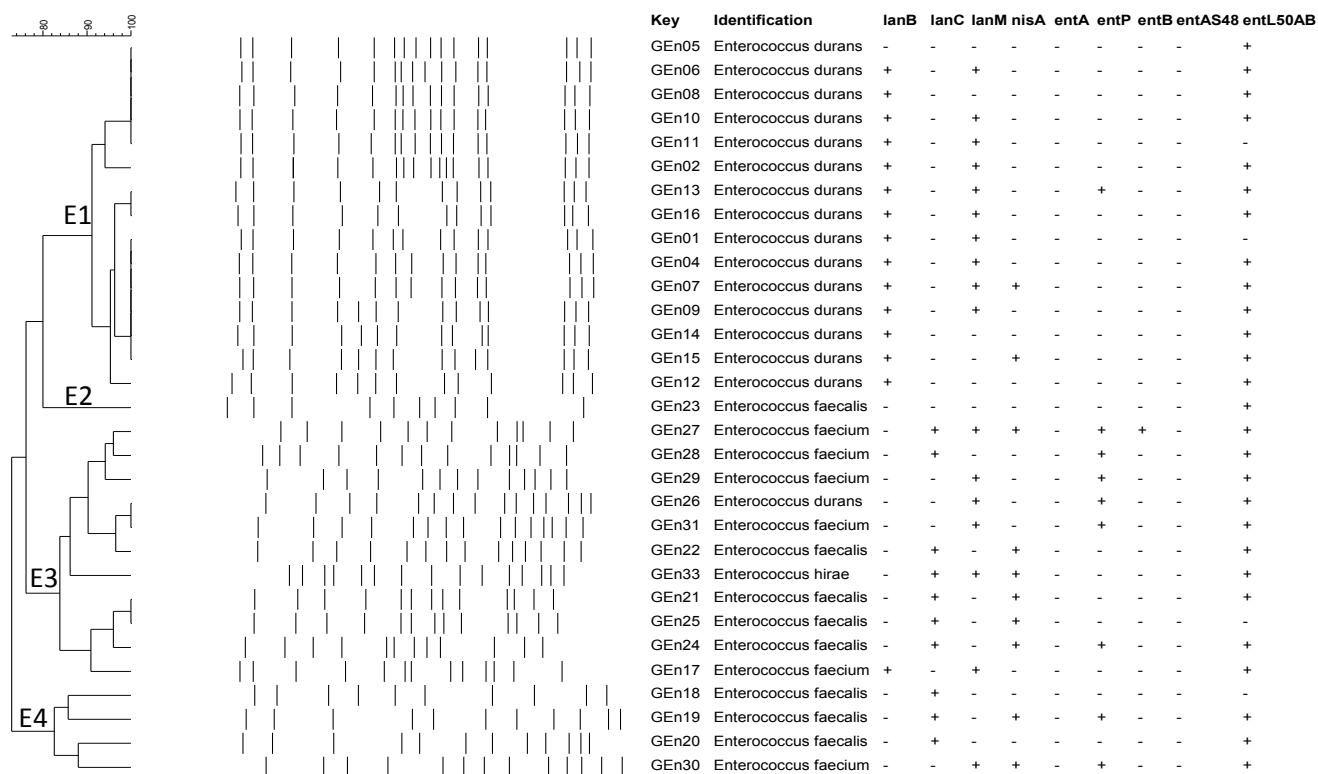


Figura 4. Perfis genéticos obtidos após macrorrestricção com a enzima *SmaI* e PFGE de *Enterococcus* spp. isolados de leite de cabra em associação com genes de bacteriocinas pesquisados por Perin & Nero (2014)

Com relação à associação entre os perfis genéticos e os genes de bacteriocinas previamente pesquisados, foi observada divergência no padrão de resultados tanto entre *Lactococcus* quanto em *Enterococcus*. Em relação a *Lactococcus* spp., observou-se que no cluster L1, as amostras GLc14 e GLc22 apresentaram nível de similaridade > 90%, porém diferentes resultados para a presença do gene *nisA* (presente e ausente, respectivamente). No cluster L2, os isolados GLc02 e GLc03 (95% de similaridade) apresentaram diferenças quanto aos genes *lanC* e *nisA*. Diferenças entre estes mesmos genes foram observadas entre os isolados GLc04, GLc08, GLc15 e GLc18.

Entre os isolados de *Enterococcus* spp., no cluster E1 houve diferenças nos padrões de resultados para genes de bacteriocinas entre isolados que apresentaram pulsotipos idênticos. Os isolados GEn08 e GEn05 apresentaram perfis genéticos e resultados para genes de bacteriocinas idênticos, porém diferentes dos demais isolados que compartilharam o mesmo pulsotipo. GEn13 teve o gene de *entP* amplificado, diferentemente de GEn16, com o qual compartilhou o mesmo perfil genético. O isolado GEn01 não teve o gene de *entL50A* amplificado, diferindo do padrão dos isolados agrupados neste perfil, assim como os isolados GEn07 e GEn15 que tiveram o gene *nisA* amplificado, diferentemente dos demais isolados. Ainda neste cluster, GEn14 não amplificou *lanM*, resultado diferente das demais amostras. Isolados de E3 identificados como *E. durans* e *E. faecium* apresentaram perfis genéticos idênticos, assim como padrões de resultados positivos para genes de bacteriocinas. Os isolados GEn25 e GEn21 que exibiram perfis clonais, demonstraram divergência na amplificação do gene *entL50A*.

Estes resultados demonstram claramente variações nos padrões de genes associados à bacteriocinas entre isolados com perfis genéticos idênticos, para ambos os gêneros. Esses resultados podem ser explicados pela ausência de relação entre os locais de restrição de *SmaI* no DNA bacteriano com os locais no qual se inserem as sequências responsáveis pela codificação dos genes de bacteriocinas. A identificação de variantes genéticas dentro de uma mesma espécie aumenta o interesse em explorar novas cepas, uma vez que atributos antimicrobianos e sensoriais são usualmente cepa-específicos. Coleções laboratoriais são principalmente constituídas a partir de caracterizações fenotípicas (Passerini et al., 2010), com isso, a caracterização molecular de isolados de BAL é importante para evitar a redundância entre cepas e otimizar estudos de caracterização da atividade antimicrobiana.

Embora a técnica de PFGE apresente alto poder discriminatório para a determinação da variabilidade genética, as divergências entre perfis genéticos e presença de genes bacteriocinogênicos indica a necessidade da utilização associada de técnicas moleculares em coleções de BAL, para identificação de isolados com potencial interesse para bioconservação. Neste estudo, PFGE foi utilizado como método para triagem de cepas com pulsotipos diferentes, para otimização do trabalho laboratorial.

3.2. Espectro de ação antimicrobiano

Os resultados obtidos utilizando a metodologia spot-on-the-lawn para verificação da atividade antagonista dos isolados de *Lactococcus* spp. são apresentados na Tabela 2. Todos os isolados avaliados foram capazes de inibir os grupos de micro-organismos indicadores testados, apresentando amplo espectro de ação antimicrobiano. Os isolados GLc24, GLc23, GLc03, GLc04, GLc15 merecem destaque pelo amplo espectro de inibição, frente a micro-organismos Gram-positivos e negativos utilizados como indicadores neste estudo.

Dentre as BAL utilizadas como indicadores, todas apresentaram algum grau de sensibilidade. Os isolados GLc24, GLc23, GLc03, GLc04, GLc15, GLc10, GLc09 e GLc05 apresentaram forte inibição sobre *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. utilizados como alvo. Já os isolados GLc01, GLc19, GLc20 e GLc02, pelo contrário, foram capazes de inibir somente a cepa *E. faecium* FAIR-E178. A atividade contra bactérias relacionadas é comum aos micro-organismos Gram-positivos que possuem algum tipo de atividade antagonista (Rodriguez et al., 2000).

As cepas de referência de *Staphylococcus aureus* utilizadas como indicadores apresentaram baixa sensibilidade em geral, sendo somente ATCC 12598 inibida por praticamente todos os isolados avaliados (exceto GLc09). As cepas de campo 26BP6 e 23St1, isoladas de queijo, demonstraram perfil altamente sensível

(Tabela 2). *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de toxinfecção alimentar decorrentes da ingestão de alimentos com toxinas pré-elaboradas pela bactéria durante sua multiplicação. As toxinas, conhecidas também por enterotoxinas, são termoestáveis, e podem permanecer no alimento mesmo após o cozimento (Hennekinne et al., 2012). A atividade sobre este micro-organismo é relatada em estudos de inibição por bacteriocinas produzidas por BAL isoladas de diversas fontes (Ananou et al., 2005; Biscola et al., 2013; Ortolani et al., 2010; Perin et al., 2012b).

Tabela 2. Espectro de ação antimicrobiana de *Lactococcus* spp. isolados de leite de cabra contra 46 micro-organismos indicadores

Gênero alvo	Micro-organismo indicador	GLc01	GLc19	GLc24	GLc20	GLc23	GLc103	GLc03	GLc04	GLc15	GLc10	GLc09	GLc05
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC 3147	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CNRZ 481/45	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11007	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>L. plantarum</i> CNRZ 73/75	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>L. sakei</i> ATCC 15521	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>E. faecium</i> BFE 1072	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>E. faecalis</i> FAIR-E77	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>E. faecium</i> FAIR-E178	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. faecalis</i> FAIR-E179	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 12600	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 14458	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 8095	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
	<i>S. aureus</i> ATCC 12598	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	<i>S. aureus</i> 26BP6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i> 23St1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Staphylococcus</i> sp. ATCC 23235	+	-	+	+	+	+	-	+		+	-	+
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 13117	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>L. monocytogenes</i> LM55	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>L. innocua</i> ATCC 33090	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Cont. Tabela 2

Gênero alvo	Micro-organismo indicador	GLc01	GLc19	GLc24	GLc20	GLc23	GLc103	GLc03	GLc04	GLc15	GLc10	GLc09	GLc05
	<i>L. innocua</i> Li76	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>L. welshimeri</i> Lw47	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
	<i>B. cereus</i> LP56	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Clostridium</i>	<i>C. sporogenes</i> ATCC 3584	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	<i>C. perfringens</i> ATCC 3626	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	<i>C. botulinum</i> ATCC 17786	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>C. novyi</i> ATCC 19402	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i>	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>S. Dublin</i> 45	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. Typhimurium</i> 84	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. Cholerasuis</i> 38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. Enteritidis</i> 258	+	-		+	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>P. alcaligenes</i> ATCC 14909	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
	<i>P. putida</i> ATCC 15175	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>P. fluorescens</i> NCTC 10038	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 00171	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. coli</i> ATCC 11229	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: Atividade presente ; -: sem atividade

Com relação a *L. monocytogenes*, de modo geral os isolados apresentaram inibição contra pelo menos duas cepas utilizadas como indicadores, sendo LM55 e ATCC 15313 as que apresentaram maior sensibilidade. Os isolados GLc24, GLc23, GLc04, GLc15 e GLc03 foram fortemente inibitórias. Cepas de campo, provenientes de produtos cárneos também foram incluídas neste teste, demonstrando sensibilidade à maioria dos isolados antagonistas. *L. monocytogenes* é uma bactéria de ampla distribuição, resistente a diversos estresses ambientais e responsável por causar a listeriose. Esta doença acomete indivíduos de grupos de risco, como idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos e pacientes imunocomprometidos. A atividade antimicrobiana contra esta bactéria é muito atrativa industrialmente, devido a sua persistência em ambientes de processamento de alimentos, destacando-a entre os principais micro-organismos utilizados como alvo em estudos de antagonismo (Ahmadova et al., 2013; Cosentino et al., 2012; Dal Bello et al., 2012; Han et al., 2013; Perin et al., 2013; Schirru et al., 2012; Settanni et al., 2014; Todorov et al., 2010).

Somente quatro isolados (GLc04, GLc15, GLc09 e GLc05) demonstraram atividade inibitória sobre *Bacillus cereus* utilizado como indicador, enquanto contra *B. subtilis* seis isolados demonstraram atividade antimicrobiana (GLc24, GLc23, GLc03, GLc04 e GLc15) (Tabela 2). *B. cereus* é um micro-organismo amplamente distribuído no ambiente devido a sua capacidade de formar esporos, que também dificulta a sua eliminação em ambientes industriais. Este micro-organismo produz enzimas proteolíticas que afetam a qualidade do leite, gerando prejuízos à produção de derivados. Adicionalmente, são capazes de produzir uma grande variedade de toxinas, responsáveis por quadros de toxinfecções alimentares, que se manifestam de duas maneiras: a síndrome emética e a síndrome diarreica (Stenfors et al., 2008). A inibição de *Bacillus* spp. por bacteriocinas já foi relatada na literatura (Achemchem et al., 2012; Achemchem et al., 2005; de Kwaadsteniet et al., 2005).

Os isolados de BAL apresentaram grande capacidade inibitória frente às cepas do gênero *Clostridium*: *C. perfringens* tipo B ATCC 3626, *C. sporogenes* ATCC 3584 e *C. novyi* ATCC 19402 foram sensíveis a quase todos os isolados, enquanto *C. botulinum* tipo E ATCC 17786 foi sensível apenas ao isolado GLc24 (Tabela 2). *Clostridium* spp. são micro-organismos extremamente preocupantes em termos de saúde pública. Por serem formadores de esporos, possuem a característica de persistir em ambientes de processamento de alimentos e são dificilmente eliminados pelos métodos convencionais de conservação. Além disso, *C. perfringens* é responsável por inúmeros casos de toxinfecção alimentar, dada a sua capacidade de produzir toxinas (Lindstrom et al., 2011). Achemchem et al. (2005) também obteve inibição de cepas de *Clostridium* spp. utilizando uma cepa de BAL proveniente de queijo de cabra no Marrocos.

Micro-organismos Gram-negativos também foram incluídos como indicadores. *Yersinia enterocolitica* foi inibida por quatro isolados (GLc01, GLc19, GLc24 e GLc23) enquanto todos os isolados de BAL antagonistas foram capazes de inibir cepas dos gêneros *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Escherichia* (Tabela 2). Devido à presença da membrana externa em bactérias Gram-negativas, a ação das bacteriocinas é restrita (Deegan et al., 2006; Ortolani et al., 2010; Rodriguez et al., 2000). A atividade inibitória observada, neste caso, deve ser atribuída a outras substâncias antimicrobianas produzidas por BAL, como ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (Ortolani et al., 2010).

Enterococcus spp. exibiram ampla atividade contra as BAL utilizadas como micro-organismos alvo, bem como para *B. subtilis*, porém demonstraram menor potencial antagonista sobre as cepas de *S. aureus* quando comparado aos isolados de *Lactococcus* (Tabela 3). Igualmente, maior sensibilidade foi observada sobre as cepas de campo 26BP6 e 23St1.

Tabela 3. Espectro de ação antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados de leite de cabra contra 46 micro-organismos indicadores

Gênero alvo	Micro-organismo indicador	GEN12	GEN14	GEN23	2En5	11St4	11Lc2	12Lc2	11Lc5	GEN09	11Ba2	GEN22	GEN30	11En8	12En9	GEN19	GEN20	1En10	13Lc6
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC 3147	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CNRZ 481/45	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11007	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
	<i>L. plantarum</i> CNRZ 73/75	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>L. sakei</i> ATCC 15521	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. faecium</i> BFE 1072	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. faecalis</i> FAIR-E77	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. faecium</i> FAIR-E178	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. faecalis</i> FAIR-E179	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 12600	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cont. Tabela 7

Gênero alvo	Micro-organismo indicador	GEn12	GEn14	GEn23	2En5	11St4	11Lc2	12Lc2	11Lc5	GEn09	11Ba2	GEn22	GEn30	11En8	12En9	GEn19	GEn20	1En10	13Lc6
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 14458	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 8095	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 12598	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i> 26BP6	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
	<i>S. aureus</i> 23St1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
	<i>Staphylococcus</i> sp. ATCC 23235	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 13117	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>L. monocytogenes</i> LM55	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	<i>L. innocua</i> ATCC 33090	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
	<i>L. innocua</i> Li76	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>L. welshimeri</i> Lw47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i> LP56	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Clostridium</i>	<i>C. sporogenes</i> ATCC 3584	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Cont. Tabela 7

Gênero alvo	Micro-organismo indicador	GEN12	GEN14	GEN23	2En5	11St4	11Lc2	12Lc2	11Lc5	GEN09	11Ba2	GEN22	GEN30	11En8	12En9	GEN19	GEN20	1En10	13Lc6
<i>Clostridium</i>	<i>C. perfringens</i> ATCC 3626	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	<i>C. botulinum</i> ATCC 17786	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	<i>C. novyi</i> ATCC 19402	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. Dublin</i> 45	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i> 84	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. Cholerasuis</i> 38	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. Enteritidis</i> 258	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	<i>P. alcaligenes</i> ATCC 14909	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. putida</i> ATCC 15175	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	<i>P. fluorescens</i> NCTC 10038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 00171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Atividade presente ; -: sem atividade

De modo geral, todos os isolados apresentaram atividade antagonista contra pelo menos quatro das oito cepas indicadoras de *Listeria* spp. GEn12, GEn14, GEn23, GEn09, GEn30, GEn19 e GEn20 foram capazes de inibir no mínimo sete cepas deste gênero. *L. monocytogenes* ATCC 19112 e ATCC 15313 demonstraram maior sensibilidade diante de *Enterococcus* spp. Somente cinco isolados demonstraram inibição sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644. Esta cepa foi selecionada como alvo por sua susceptibilidade a substâncias antimicrobianas produzidas, sendo geralmente utilizada como indicadora de atividade antagonista em diversos trabalhos (Cosentino et al., 2012; Moraes et al., 2010; Ortolani et al., 2010; Perin et al., 2012a; Perin et al., 2012b).

A atividade antagonista sobre as cepas de *Clostridium* spp. foi bastante reduzida em comparação aos isolados de *Lactococcus* spp., assim como em relação a *E. coli* e *Pseudomonas* spp. Contudo, *S. Enteritidis* foi sensível a 13 isolados, enquanto *Y. enterocolitica* foi inibida por todos (Tabela 3).

É importante ressaltar o método spot-on-the-lawn foi utilizado como teste de triagem, para verificação da atividade antagonista de isolados de BAL contra microorganismos indicadores. O emprego desta metodologia associada a condições de incubação em ambiente anaeróbico otimizam a atividade inibitória ligada à produção de bacteriocinas, uma vez que podem inibir a produção de peróxido de hidrogênio por BAL (Stern et al., 2006). Adicionalmente, a utilização de MRSm sob condições anaeróbicas restringe a produção de outras substâncias antimicrobianas naturalmente produzidas por BAL como ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (Leroy & de Vuyst, 2004). Contudo, estas condições de incubação não impedem totalmente a possibilidade de produção de tais compostos. Neste caso, a atividade inibitória não pode ser diretamente atribuída à produção de bacteriocinas, justificando a utilização de testes confirmatórios da natureza bacteriocinogênica dos isolados.

3.3. Potencial bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes*

A atividade bacteriocinogênica do sobrenadante de seis isolados de BAL selecionados foi testada e quantificada mediante a inibição de cepas de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos e com diferentes perfis de virulência. O número de Unidades Arbitrárias/mL de atividade bacteriocinogênica obtido para cada cepa testada é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Atividade bacteriocinogênica (UA/mL) do sobrenadante de BAL isoladas de leite de cabra contra diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*.

<i>L. monocytogenes</i> (Sorotipo)	<i>Lactococcus</i> spp.		<i>Enterococcus</i> spp.			
	GLc03	GLc05	GEn09	GEn12	GEn14	GEn17
ATCC 7644 (1/2a)	6.400	6.400	6.400	6.400	6.400	6.400
L11 (1/2c)	3.200	3.200	6.400	6.400	3.200	3.200
L10 (4b)	3.200	3.200	6.400	6.400	1.600	3.200
537 (4b – novo padrão)	3.200	1.600	6.400	6.400	3.200	3.200

Todos os sobrenadantes testados foram capazes de inibir os diferentes sorotipos de *L. monocytogenes* utilizados como alvo, demonstrando que a atividade inibitória produzida pode ser atribuída à ação de bacteriocinas. As cepas de *L. monocytogenes* utilizadas nesta avaliação pertencem a diferentes sorotipos e foram obtidas de ambiente de processamento de carne bovina em diferentes locais (Camargo, 2013). A cepa L11 pertence ao sorotipo 1/2a, L10 ao sorotipo 4b e 537 ao sorotipo 4b novo padrão, que vem sendo isolado atualmente, em trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Estas cepas possuem ainda positividade a diferentes genes associados à virulência (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap*). A cepa de referência *L. monocytogenes* ATCC 7644 é classificada como pertencente ao sorotipo 1/2c. De acordo com (Doumith et al., 2004), os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b estão envolvidos em mais de 95% dos casos de listeriose,

sendo o sorotipo 4b o mais frequentemente associado a casos clínicos, levando aos quadros mais severos da doença (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Já os sorotipos 1/2a e 1/2c são mais frequentes em alimentos e amostras ambientais (Doumith et al., 2004).

Schirru et al. (2012) em um estudo com isolados de *Enterococcus* spp. de leite de cabra também testaram a atividade bacteriocinogênica contra diversas cepas de *L. monocytogenes* dos sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, obtendo atividade contra todas elas, corroborando os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 4). As bacteriocinas produzidas por BAL geralmente são ativas contra micro-organismos Gram-positivos relacionados e a atividade contra cepas de campo de diferentes sorotipos reforça as perspectivas de utilização no controle de *L. monocytogenes* em alimentos.

3.4. Estabilidade de bacteriocinas em diferentes valores de pH e temperatura

As bacteriocinas produzidas pelos isolados avaliados apresentaram atividade em uma ampla variação de pH. Sete dos oito isolados avaliados mantiveram sua atividade após incubação por uma hora a pH de 2.0 a 10.0 (Tabela 5). Batdorj et al. (2006) avaliaram as características de bacteriocinas produzidas por uma cepa identificada como *E. durans* isolada de *kumys* - um produto lácteo fermentado produzido na Mongólia - e encontraram resultados similares de atividade antimicrobiana na mesma faixa de pH.

A estabilidade de bacteriocinas em ampla faixa de pH é descrita em diversos trabalhos para *Lactococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (Cocolin et al., 2007; Hadji-Sfafi et al., 2011; Rehaïem et al., 2010). A nisina geralmente mantém sua atividade antimicrobiana quando exposta a uma variedade de pHs e é capaz de exibir maior atividade inibitória em baixo pH (Campos et al., 2006; Castro et al., 2011; Dal Bello et al., 2012; de Arauz et al., 2009; Deegan et al., 2006; Olasupo et al., 1999). Quando o pH

é reduzido, a solubilidade e estabilidade da nisina tendem a aumentar. Para o isolado de *E. durans* GEn17, a maior atividade de bacteriocina foi atingida com pH entre 6.0 e 8.0. Stropfová & Lauková (2007) obtiveram resultados que corroboram este estudo, avaliando a estabilidade ao pH da bacteriocina obtida de *E. faecium* EF55.

Tabela 5. Efeito do pH e temperatura na atividade bacteriocinogênica dos isolados de BAL selecionados contra a cepa de referência *L. monocytogenes* ATCC 7644. Atividade bacteriocinogênica expressa em UA/mL.

	<i>Lactococcus</i> spp.		<i>Enterococcus</i> spp.			
	GLc03	GLc05	GEn09	GEn12	GEn14	GEn17
pH						
2.0	800	200	400	400	400	800
4.0	400	100	200	400	400	400
6.0	400	100	800	400	400	800
8.0	800	100	800	800	800	800
10.0	<100	100	800	800	400	100
12.0	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Temperatura (°C)						
7	6.400	6.400	6.400	6.400	6.400	6.400
20	6.400	6.400	6.400	6.400	6.400	6.400
40	6.400	6.400	6.400	6.400	6.400	6.400
60	6.400	6.400	6.400	6.400	6.400	6.400
80	1.600	1.600	6.400	3.200	3.200	3.200
100	200	200	200	200	200	200
121	200	400	1.600	200	200	200

Contudo, após a exposição a pH 10.0, a atividade da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* GLc03 foi ausente, e a pH 12.0 foi observada perda da atividade de todas as bacteriocinas testadas (Tabela 5). A solubilidade das bacteriocinas pode ser prejudicada sob condições alcalinas (de Arauz et al., 2009) e alguns trabalhos demonstram redução da atividade inibitória da nisina em altos valores de pH (de Arauz et al., 2009; Deegan et al., 2006; Olasupo et al., 1999). A perda ou redução da atividade bacteriocinogênica pode ser atribuída à degradação proteolítica, agregação proteica ou

instabilidade das proteínas a extremos de pH (Aasen et al., 2000; de Vuyst et al., 1996; Parente & Ricciardi, 1994; Parente & Ricciardi, 1999; Todorov et al., 2010).

Quando expostas a diferentes temperaturas, as bacteriocinas avaliadas apresentaram atividade após duas horas de incubação em temperaturas de 20°C a 60°C (Tabela 5). A atividade foi parcialmente reduzida a partir da incubação a 80°C. Para GLc05 e Gen09 a atividade bacteriocinogênica sofreu redução a 100°C, contudo a 121°C, houve uma recuperação. Provavelmente, mesmo à alta temperatura, o tempo de exposição (20 minutos) não foi longo o suficiente para causar perda total da atividade. A persistência da atividade em temperaturas elevadas é uma característica desejável para a utilização de bacteriocinas em alimentos e estes resultados são similares aos encontrados para bacteriocinas produzidas por BAL (Schirru et al., 2012; Ahmadova et al., 2013; Pinto et al., 2009).

A atividade bacteriocinogênica foi testada também a 7°C, para simular condições de refrigeração (Tabela 5). As bacteriocinas de *Enterococcus* spp. e *Lactococcus* spp. mantiveram a atividade a esta temperatura, demonstrando que produtos refrigerados podem ser potencialmente conservados através do uso de bacteriocinas. A estabilidade das bacteriocinas sob diferentes condições pode ser um bom critério para seu uso como biopreservantes de alimentos sob diferentes condições de processamento, incluindo pasteurização, tratamentos térmicos, adição de ácidos, congelamento ou longo período de estocagem (Batdorj et al., 2006).

4. Conclusões

O presente estudo demonstrou a diversidade de BAL autóctones de leite de cabra cru, que representam uma fonte de novos isolados com potencial antimicrobiano para utilização como biopreservantes de alimentos.

A atividade bacteriocinogênica foi demonstrada em isolados de *Lactococcus* spp. e *Enterococcus* spp. sobre *L. monocytogenes* de diferentes origens e sorotipos, destacando a possibilidade de utilização destes isolados para o controle deste micro-organismo. Além disso, as bacteriocinas produzidas por estes isolados mantiveram sua atividade mesmo após diferentes condições ambientais, oportunizando seu emprego em produtos que sofram diferentes condições de processamento.

Referências

- Aasen, I.M., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., & Storro, I., 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:159-166.
- Achemchem, F., Cebrian, R., Abrini, J., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., & Maqueda, M., 2012. Antimicrobial characterization and safety aspects of the bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* F420 isolated from Moroccan raw goat milk. *Canadian Journal of Microbiology* 58:596-604.
- Achemchem, F., Martinez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E., & Maqueda, M., 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *Journal Applied of Microbiology* 99:141-150.
- Ahmadova, A., Todorov, S.D., Choiset, Y., Rabesona, H., Tannaz, M.Z., Kuliyeu, A., Franco, B.D.G.M., Chobert, J.M., & Haertlé, T., 2013. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control* 30:631-641.

- Ananou, S., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A., & Valdivia, E., 2005. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Science* 71:549-556.
- Barros, M.A.F., Nero, L.A., Silva, L.C., d'Ovidio, L., Monteiro, F.A., Tamanini, R., Fagnani, R., Hofer, E., & Beloti, V., 2007. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science* 76:591-596.
- Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Metro, F., Prevost, H., Chobert, J.M., & Haertle, T., 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology* 101:837-848.
- Biscola, V., Todorov, S.D., Capuano, V.S., Abriouel, H., Galvez, A., & Franco, B.D., 2013. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Meat Science* 93:607-613.
- Bravo, D., Rodriguez, E., & Medina, M., 2009. Nisin and lactacin 481 coproduction by *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk. *Journal of Dairy Science* 92:4805-4811.
- Bromberg, R., Moreno, I., Delboni, R.R., & Cintra, H.C., 2006. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. *Food Science and Technology (Campinas)* 26:135-144.
- Camargo, A.C., 2013. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Listeria monocytogenes* obtidos em uma planta de processamento de carne bovina. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

- Campos, C.A., Rodriguez, O., Calo-Meta, P., Prado, M., & Barros-Velazquez, J., 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International* 39:356-364.
- Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A., & Campos, C.A., 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science* 87:321-329.
- Centeno, J.A., Fernandez-Garcia, E., Gaya, P., Tomillo, J., Medina, M., & Nunez, M., 2004. Volatile compounds in cheeses made from raw ewes' milk ripened with a lactic culture. *Journal of Dairy Research* 71:380-384.
- Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G., & Grazia Fortina, M., 2007. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiology* 24:752-758.
- Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Melis, R., Pomata, R., & Pisano, M.B., 2012. Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012:376428.
- Cossi, M.V.C., Burin, R.C.K., Camargo, A.C., Dias, M.R., Lanna, F.G.P.A., Pinto, P.S.A., & Nero, L.A., 2014. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. *Food Control* 40:320-323.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P.D., & Hill, C., 2012. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology* 153:58-65.

- Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., & Cocolin, L., 2010. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT-Food Science and Technology* 43:1151-1159.
- de Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G., & Penna, T.C.V., 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20:146-154.
- de Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H., & Dicks, L.M., 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 105:433-444.
- de Martinis, E.C.P. & Franco, B.D.G.M., 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. *International Journal of Food Microbiology* 42:119-126.
- de Vuyst, L., Callewaert, R., & Crabbé, K., 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 142:817-827.
- du Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., Holzappel, 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces *Journal of Applied Microbiology* 88:482-494.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16:1058-1071.

- Delgado, S. & Mayo, B., 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 90:309-319.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P., & Buchrieser, C., 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infection and Immunity* 72:1072-1083.
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T.M., Condon, S., & Swings, J., 2002. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied Environmental Microbiology* 68:3560-3565.
- Goering, R.V., 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution* 10:866-875.
- Graves, L.M. & Swaminathan, B., 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 65:55-62.
- Gutiérrez-Méndez, N., Rodríguez-Figueroa, J.C., González-Córdova, A.F., Nevárez-Moorillón, G.V., Rivera-Chavira, B., & Vallejo-Cordoba, B., 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Canadian Journal of Microbiology* 56:432-439.
- Hadji-Sfahi, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., le Blay-Laliberté, G., Barbier, G., Haertlé, T., & Chobert, J.M., 2011. Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control* 22:2020-2027.

- Han, E.J., Lee, N.K., Choi, S.Y., & Paik, H.D., 2013. Short communication: Bacteriocin KC24 produced by *Lactococcus lactis* KC24 from kimchi and its antilisterial effect in UHT milk. *Journal of Dairy Science* 96:101-104.
- Hennekinne, J.A., De Buyser, M.L., & Dragacci, S., 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews* 36:815-836.
- Jurkovic, D., Krizkova, L., Sojka, M., Takacova, M., Dusinsky, R., Krajcovic, J., Vandamme, P., & Vancanneyt, M., 2007. Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology* 116:82-87.
- Kahala, M., Maki, M., Lehtovaara, A., Tapanainen, J.M., Katiska, R., Juuruskorpi, M., Juhola, J., & Joutsjoki, V., 2008. Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product viili. *Journal of Applied Microbiology* 105:1929-1938.
- Kelly, W.J., Ward, L.J., & Leahy, S.C., 2010. Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biol Evol* 2:729-744.
- Leroy, F. & de Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15:67-78.
- Lindstrom, M., Heikinheimo, A., Lahti, P., & Korkeala, H., 2011. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiology* 28:192-198.
- Mannu, L., Paba, A., Pes, M., Floris, R., Scintu, M.F., & Morelli, L., 1999. Strain typing among enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo cheese. *FEMS Microbiology Letters* 170:25-30.

- Mannu, L., Paba, A., Pes, M., & Scintu, M.F., 2000. Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *Journal of Applied Microbiology* 89:191-197.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., & Berkeley, R.C.W., 1972. Methods for Studying Bacteriocins, p. 315-422. In: Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (Eds.), *Methods in Microbiology*. Academic Press.
- Montanhini, M.T.M., Colombo, M., Nero, L.A., & Bersot, L.S., 2013. Presence of neutral metalloproteinase (npr) gene and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from dairy products. *Journal of Dairy Science* 96: 5641-5643.
- Moraes, P.M., Perin, L.M., Ortolani, M.B.T., Yamazi, A.K., Viçosa, G.N., & Nero, L.A., 2010. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT - Food Science and Technology* 43:1320-1324.
- Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovicic, B., Begovic, J., Golic, N., Topisirovic, L., 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 122:162-170.
- Okuklu, B., 2005 Investigation of Chromosomal and plasmid DNA profiles of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Dissertation of School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology.
- Olasupo, N.A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H., & Holzapfel, W.H., 1999. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. *International Journal of Food Microbiology* 53:141-152.
- Ortolani, M.B.T., Yamazi, A.K., Moraes, P.M., Vicoso, G.N., & Nero, L.A., 2010. Microbiological quality and safety of saw milk and soft cheese and detection of autochthonous Lactic Acid Bacteria with antagonistic activity against *Listeria*

- monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease* 7:175-180.
- Parente, E. & Ricciardi, A., 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Letters in Applied Microbiology* 19:12-15.
- Parente, E. & Ricciardi, A., 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52:628-638.
- Park, Y.W., 2007. Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68:73-87.
- Passerini, D., Beltramo, C., Coddeville, M., Quentin, Y., Ritzenthaler, P., Daveran-Mingot, M.L., & Le Bourgeois, P., 2010. Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus Lactis*. *PLoS ONE* 5:1-12.
- Perin, L.M., Miranda, R.O., Camargo, A.C., Colombo, M., Carvalho, A.F., & Nero, L.A., 2013. Antimicrobial activity of the Nisin Z producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc08 against *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 65:1554-1560.
- Perin, L.M., Moraes, P.M., Silva, A., Jr., & Nero, L.A., 2012a. Lantibiotics biosynthesis genes and bacteriocinogenic activity of *Lactobacillus* spp. isolated from raw milk and cheese. *Folia Microbiologica (Praha)* 57:183-190.
- Perin, L.M., Moraes, P.M., Viçosa, G.N., Silva, A.J., & Nero, L.A., 2012b. Identification of bacteriocinogenic *Lactococcus* isolates from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. *International Dairy Journal* 25:46-51.
- Perin, L.M. & Nero, L.A., 2014. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiology* 14:2-9.
- Pinto, A. L., Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P., Gibbs, P. A. Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential

- antimicrobials to control non-fermented seafood. *International Journal of Food Microbiology* 129: 50-58.
- Psoni, L., Kotzamanidis, C., Yiangou, M., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E., 2007. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 114:211-220.
- Randazzo, C.L., Caggia, C., & Neviani, E., 2009. Application of molecular approaches to study Lactic Acid Bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods* 78:1-9.
- Rehaiem, A., Martinez, B., Manai, M., & Rodriguez, A., 2010. Production of enterocin A by *Enterococcus faecium* MMRA isolated from 'Rayeb', a traditional Tunisian dairy beverage. *Journal of Applied Microbiology* 108:1685-1693.
- Rodriguez, E., Gonzalez, B., Gaya, P., Nunez, M., & Medina, M., 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 10:7-15.
- Schirru, S., Todorov, S.D., Favaro, L., Mangia, N.P., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., Franco, B.D.G.D., & Deiana, P., 2012. Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. *Food Control* 25:309-320.
- Settanni, L., Guarcello, R., Gaglio, R., Francesca, N., Aleo, A., Felis, G.E., & Moschetti, G., 2014. Production, stability, gene sequencing and in situ anti-*Listeria* activity of mundticin KS expressed by three *Enterococcus mundtii* strains. *Food Control* 35:311-322.
- Stenfors, L.P.A., Fagerlund, A., & Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews* 32:579-606.
- Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., & Seal, B.S., 2006.

- Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:3111-3116.
- Strompfová, V. & Lauková, A., 2007. In vitro study on bacteriocin production of Enterococci associated with chickens. *Anaerobe* 13:228-237.
- Swaminathan, B. & Gerner-Smidt, P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9:1236-1243.
- Todorov, S. D., 2008. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* spp. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 178-187.
- Todorov, S.D., Wachsman, M., Tome, E., Dousset, X., Destro, M.T., Dicks, L.M., Franco, B.D., Vaz-Velho, M., & Drider, D., 2010. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology* 27:869-879.
- Turabelidze, D., Kotetishvili, M., Kreger, A., Morris Jr., J.G., Sulakvelidze, A., 2000. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 4242-4245.
- van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., Escmid, & Esgem, 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* 13:1-46.
- Viçosa, G.N., Moraes, P.M., Yamazi, A.K., & Nero, L.A., 2010. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. *Food Microbiology* 27:447-452.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho procurou contribuir para a caracterização da atividade antimicrobiana de isolados de leite de cabra identificados como produtores de bacteriocinas, indicando que o leite de cabra pode ser uma boa fonte BAL a serem utilizadas como biopreservantes de alimentos. Os resultados obtidos demonstram boas perspectivas para a potencial utilização destas substâncias no controle de micro-organismos patogênicos em alimentos.

A complementação desse estudo será realizada visando:

- ✓ Avaliação do efeito citotóxico de bacteriocinas semi-purificadas
- ✓ Avaliação da atividade antiviral de bacteriocinas semi-purificadas