

INÊS HELENA TRISTÃO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE COCOS GRAM-POSITIVOS
ISOLADOS DE SALAME TIPO ITALIANO PARA USO COMO CULTURAS
STARTER: ATIVIDADE ANTAGONISTA, ATIVIDADE DE CATALASE E
DE NITRATO REDUTASE E PRODUÇÃO E DEGRADAÇÃO DE AMINAS
BIOGÊNICAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

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

T

O48c
2006

Oliveira, Inês Helena Tristão de, 1972-

Caracterização bioquímica de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano para uso como culturas starter : atividade antagonista, atividade de catalase e de nitrato redutase e produção e degradação de aminas biogênicas / Inês Helena Tristão de Oliveira. – Viçosa : UFV, 2006.

xii, 100f. : il. ; 29cm.

Orientador: Célia Alencar de Moraes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Embutidos (Alimentos) - Bacteriologia. 2. Bactéria Gram-positiva. 3. Regulação de expressão gênica. 4. Enterotoxinas. 5. Aminas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.001579

INÊS HELENA TRISTÃO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE COCOS GRAM-POSITIVOS
ISOLADOS DE SALAME TIPO ITALIANO PARA USO COMO CULTURAS
STARTER: ATIVIDADE ANTAGONISTA, ATIVIDADE DE CATALASE E
DE NITRATO REDUTASE E PRODUÇÃO E DEGRADAÇÃO DE AMINAS
BIOGÊNICAS**

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

APROVADA: 8 de dezembro de 2006.

Prof^a. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Co-orientadora)

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Co-orientador)

Prof^a. Maria Beatriz Abreu Glória

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani

Prof^a. Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

Com carinho, dedico este trabalho

A Deus e a Nossa Senhora das Graças, minha intercessora de sempre.

Ao meu esposo Antônio Marcos e à minha filha Isabela, meus amores.

Aos meus pais Braz e Maria Auxiliadora.

Aos meus irmãos Filogônio, Carmina, Teodolindo (*in memoriam*), Rita e
Cícero.

Aos meus cunhados, cunhadas e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Deus, e a Maria Santíssima, por serem meu sustento, minha fortaleza e minha esperança, sempre me iluminando e mostrando como agir.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia e ao Bioagro pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, professora Célia Alencar de Moraes, pela valiosa orientação e confiança no meu trabalho.

Aos meus conselheiros, professora Maria Goreti de Almeida Oliveira e professor Arnaldo Chaer Borges, pelas valiosas sugestões e críticas na execução deste trabalho.

À professora Maria Beatriz Abreu Glória, da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo carinho com que me recebeu em seu laboratório e pela imensa disponibilidade em me atender sempre que precisei.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pelas valiosas sugestões.

Aos professores Flávia Maria Lopes Passos, Maria Cristina Dantas Vanetti e Sebastião Tavares de Rezende, pelas relevantes contribuições e pronta disponibilidade em participarem da qualificação.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação profissional.

Às secretárias D. Aparecida e Nilcéa, pela simpatia e disponibilidade em nos atender. Em especial à Laura, pela amizade e imensa boa vontade em me ajudar sempre que precisei.

Aos funcionários Danilo, Evandro, Sr. Toninho, Sr. Paulo, José Reinaldo, José Carlos (Esquilo) pela convivência agradável e ajuda imprescindível.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial ainda presentes e os que já tomaram outros rumos, Alessandra, Ana Paula, Carla, Daniele, Eliana, Elisângela, Emiliane, Fernanda, Gustavo, Iara, José Carlos,

Léo, Manoela, Marcelo, Marta, Maurício, Murilo, Sílvia, Thiago, Tiago, pela amizade, colaboração e apoio nos momentos difíceis; pela troca de experiências; pela alegria e descontração que tornavam o nosso convívio tão agradável e já saudoso.

Em especial ao Rodrigo pela disponibilidade e imprescindível colaboração na execução da parte final dos meus experimentos.

Aos amigos dos Laboratórios de Fisiologia, Microbiologia de Alimentos, Anaeróbios, Micorrizas, Genética de Microrganismos, Biotecnologia Ambiental e Biodiversidade pela convivência agradável e disponibilidade de empréstimo de materiais e equipamentos.

Às amigas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG, Renata, Tássia, Tarliane e Sílvia, pelo carinho com que me receberam, pela enorme disponibilidade e imprescindível ajuda na execução das análises de aminas biogênicas.

Às amigas do Cetec, Christiane, Carla, Karyne e Mércia pelo incentivo na reta final.

Às minhas amigas do coração, Bete e Néia, pela amizade verdadeira, pelos muitos momentos alegres e pelo apoio nos vários momentos difíceis.

Aos meus pais, Braz e Maria Auxiliadora, pelo exemplo de vida, de fé, de perseverança, pela presença tão importante na minha vida, pelo amor sem medidas e por me incentivarem sempre a vencer na vida.

Aos meus irmãos Filogônio e Cícero, e em especial Carmina e Rita, pela amizade e carinho, pela preocupação comigo e pelo apoio constante.

Ao meu esposo Antônio Marcos, companheiro de todas as horas, pelo carinho sem igual, por muitas vezes deixar tudo para estar comigo nos momentos em que eu mais precisava, por não me deixar desistir quando o desânimo tentava me abater, pela paciência e compreensão.

À minha linda filhinha Isabela, meu maior tesouro, pelo seu sorriso tão lindo, aquele abraço gostoso e um beijo estalado que compensam todas as chateações e cansaço do dia a dia e me dão forças para seguir adiante.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço de coração.

BIOGRAFIA

Inês Helena Tristão de Oliveira, filha de Braz Tristão da Silva e Maria Auxiliadora Araújo Tristão, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, onde realizou os estudos básicos.

Em fevereiro de 1995, diplomou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 1995, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, sendo concluído em dezembro de 1997.

Em abril de 2000, foi aprovada em concurso público e contratada como Professora Substituta das disciplinas Microbiologia Geral e Microbiologia de Alimentos no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, cargo que ocupou até abril de 2002.

Em abril de 2002, iniciou o Programa de Doutorado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos para obtenção do título de *Doctor Scientiae* no dia 8 de dezembro de 2006, com defesa da tese.

Em julho de 2006, foi contratada, mediante realização de concurso público, como Pesquisadora em Ciência e Tecnologia - área de Biotecnologia, na Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais - CETEC em Belo Horizonte, Minas Gerais.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	
Cocos Gram-positivos na fermentação de embutidos cárneos.....	3
1. Culturas <i>starter</i> na fermentação de salames.....	4
2. Estafilococos coagulase negativos.....	6
3. Atividades bioquímicas de cocos Gram-positivos catalase-positivos relevantes na fermentação de salames.....	7
4. Aspectos de segurança relacionados a estafilococos coagulase negativos.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 2	
Atividade antagonista de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano sobre <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	22
RESUMO.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Microrganismos.....	25
2.2. Atividade antagonista em meio sólido.....	25
2.3. Atividade antagonista em meio líquido.....	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
Atividade antagonista de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos e de outros cocos Gram-positivos sobre <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	27
4. CONCLUSÃO.....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

CAPÍTULO 3

Atividade de nitrato redutase e catalase de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano.....	56
RESUMO.....	57
1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1. Microrganismos.....	59
2.2. Atividade de nitrato redutase.....	59
2.3. Atividade de catalase.....	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1. Atividade de nitrato redutase.....	61
3.2. Atividade de catalase.....	65
4. CONCLUSÃO.....	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

CAPÍTULO 4

Aspectos de segurança em cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano.....	72
RESUMO.....	73
1. INTRODUÇÃO.....	73
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1. Microrganismos.....	76
2.2. Detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas em cocos Gram-positivos isolados de salame italiano.....	77
2.2.1. Extração de DNA.....	77
2.2.2. Amplificação de segmentos de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.....	77
2.3. Formação e degradação de aminas biogênicas por cocos Gram-positivos isolados de salame italiano.....	80
2.3.1. Produção de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina...	80
2.3.2 Degradação de histamina e tiramina.....	82
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
3.1. Detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas em	

cocos Gram-positivos isolados de salame italiano.....	83
3.2. Formação e degradação de aminas biogênicas por cocos Gram-positivos isolados de salame italiano.....	86
3.2.1. Produção de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina.....	86
3.2.2. Degradação de tiramina e de histamina.....	91
4. CONCLUSÃO.....	94
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
CONCLUSÕES GERAIS.....	100

RESUMO

OLIVEIRA, Inês Helena Tristão de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. **Caracterização bioquímica de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano para uso como culturas *starter*: atividade antagonista, atividade de catalase e de nitrato redutase e produção e degradação de aminas biogênicas.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes, Co-orientadores: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Arnaldo Chaer Borges.

Noventa e oito estirpes de bactérias Gram-positivas, em sua maioria estafilococos coagulase negativos, oriundas de salames tipo italiano produzidos por fermentação artesanal e por fermentação industrial, foram caracterizadas quanto a aspectos relacionados ao seu uso em culturas *starter*. Foi avaliada a atividade antagonista contra bactérias patogênicas e a provável natureza protéica das substâncias inibidoras foi evidenciada pela redução da inibição na presença de protease. Cinquenta e um isolados apresentaram atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes*, dos quais 27 com ação por substância de natureza protéica. Trinta e sete isolados demonstraram atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus*, dos quais 30 com ação por substância de natureza protéica. Dezesesseis estirpes de estafilococos, pertencentes às espécies *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. caprae*, *S. arlettae* e *S. delphini*, tiveram ação antagonista por substância de natureza protéica sobre ambas as bactérias indicadoras. Todos os 98 isolados exibiram atividade de catalase, verificada pelo consumo de peróxido de hidrogênio, sendo 46% com níveis altos de degradação de H₂O₂, com valores acima de 28,32 µmoles de H₂O₂ degradado.min⁻¹.mL⁻¹ de suspensão de células com D.O_{630 nm} = 1,0. Sessenta e oito isolados reduziram nitrato a nitrito em ensaio em ágar contendo KNO₃, dos quais 44% com atividade de nitrato redutase elevada, com halos característicos de redução de nitrato acima de 12 mm. Onze isolados oriundos dos salames artesanais, pertencentes às espécies *S. xylosus*, *S. arlettae* e *S. equorum*, exibiram elevadas atividades de nitrato redutase e catalase simultaneamente, podendo ser importantes componentes de consórcios para produção de salame. Observou-se uma baixa incidência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, detectados por reação em cadeia de

polimerase (PCR), com exceção do gene *see* presente em 23,5% dos isolados. Quatro isolados apresentaram os genes *seb* e *seh* simultaneamente; dois isolados, apenas o gene *seh*; e um isolado, o gene *sej*. Os genes *sea*, *sec* e *sed* não foram encontrados em nenhum dos 98 isolados. O gene *see* foi detectado em nove dos onze isolados com elevadas atividades de nitrato redutase e catalase; os outros dois, as estirpes de *S. xylosus* CIL 28 e de *S. arlettae* CIL 24, não apresentaram nenhum gene de enterotoxina. A produção e degradação de aminas biogênicas foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa por pareamento de íons. Poucos isolados foram capazes de produzir níveis relevantes de tiramina, histamina, putrescina ou cadaverina, mas um grande número foi capaz de degradar histamina e/ou tiramina. Onze isolados produziram entre 2 e 70 mg.L⁻¹ de uma ou mais das aminas e um isolado produziu 720,35 mg.L⁻¹ de tiramina. Sessenta por cento das 98 estirpes conseguiram degradar histamina e/ou tiramina em diferentes intensidades. Trinta e nove por cento das estirpes que não mostraram atividade de aminoácido descarboxilase sobre tirosina, histidina, ornitina ou lisina, exibiram capacidade de degradar tiramina e histamina, sendo, portanto as mais recomendadas para a composição de consórcios de culturas *starter* para a fermentação de embutidos cárneos. A relevância deste trabalho consiste na seleção de cocos Gram-positivos oriundos de salames artesanais com características bioquímicas desejáveis para uso na fermentação de embutidos cárneos. A coleção caracterizada possibilita inúmeras combinações de estirpes no desenvolvimento de culturas *starter*. Estirpes com características desejáveis como boa atividade antagonista, não produção de aminas e bom potencial para degradação de histamina ou tiramina, porém com baixa atividade de catalase e nitrato redutase, podem ser usadas em conjunto com outras estirpes que complementam estas características. Até mesmo estirpes com atividade antagonista, não produção e/ou degradação de aminas e boa atividade de nitrato redutase e catalase, mas que apresentam genes de enterotoxina, podem ser usadas como *starters*, desde que os respectivos genes de enterotoxina sejam deletados.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Inês Helena Tristão de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2006. **Biochemical characterization of Gram-positive cocci isolated from Italian type sausage for use as starter culture: antagonism, catalase and nitrate reductase activities and production and degradation of biogenic amines.** Adviser: Célia Alencar de Moraes, Co-Advisers: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Arnaldo Chaer Borges.

Ninety eight strains of Gram-positive bacteria, most of them coagulase- negative staphylococci, originated from Italian type sausages made by artisanal fermentation and industrial fermentation, were characterized in relation to their use as starter cultures. Antagonism to pathogens was evaluated and the possible protein nature of the inhibitory substance was evidenced by reduction of inhibition in presence of protease. Fifty one isolates showed antagonism to *Listeria monocytogenes*, and 27 of them had their antagonistic action attributed to proteinaceous substance. Thirty seven isolates showed antagonism to *Staphylococcus aureus*, and 30 of them with antagonistic action related to substance of protein nature. Sixteen strains of staphylococci, from *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. caprae*, *S. arlettae* and *S. delphini* species exhibited antagonism due to proteinaceous substance against both indicators. All 98 isolates exhibited catalase activity, measured by hydrogen peroxide consumption. Forty six percent of those had high levels of H₂O₂ degradation, showing values above 28,32 µmoles of degraded H₂O₂.min⁻¹.mL⁻¹ of cels with OD_{630nm} = 1,0. Sixty eight isolates reduced nitrate in agar with KNO₃. Forty four percent of those had high nitrate reductase activity, showing haloes of nitrate reduction bigger than 12 mm. Eleven isolates originated from artisanal sausages, from *S. xylosum*, *S. arlettae* and *S. equorum* species, presented simultaneously high nitrate reductase and catalase activities, being good candidates as cultures for fermented sausage production. There was a low incidence of genes coding for staphylococcal enterotoxins, detected by PCR, except for the *see* gene, found in 23,5% of the isolates. Four isolates had both *seb* and *seh* genes; two isolates had *seh* gene; and one isolate had *sej* gene. The *sea*, *sec* and *sed* genes were not detected in any of the 98 isolates. The *see* gene was

detected in nine of eleven isolates with high nitrate reductase and catalase activities; the others, *S. xylosus* CIL 28 and *S. arlettae* CIL 24, had no enterotoxin gene. Biogenic amine production and degradation were quantified by reversed phase ion pair HPLC. Few isolates were found to produce relevant levels of tyramine, histamine, putrescine and cadaverine, and a great number was able to degrade histamine and/or tyramine. Eleven isolates produced values between 2 and 70 mg.L⁻¹ of one or more of the amines and one isolate produced 720,35 mg.L⁻¹ of tyramine. Sixty percent from 98 strains could degrade histamine or tyramine in different degrees. Thirty nine percent of the strains that did not show aminoacid decarboxylase activity on tyrosine, histidine, ornithine or lysine, had the ability to degrade tyramine and histamine. These strains are the most suitable to be used as starter cultures for sausage fermentation. The relevance of this work is the selection of Gram-positive cocci of artisanal origin with biochemical characteristics desired in sausage fermentation. The characterized collection enables a number of combinations between the strains to develop starter cultures. Strains with desired characteristics as good antagonistic activity, no production of amines and potential to degrade histamine or tyramine, but low nitrate reductase and catalase activities, can be used together with other strains that complete these characteristics. Even those strains with antagonistic action, which do not produce and/or degrade amines, and have good nitrate reductase and catalase activities, but present enterotoxin genes, can be used as starters if these genes are deleted.

INTRODUÇÃO

A fermentação do salame tipo italiano pode ocorrer de forma natural, quando é promovida pelos microrganismos presentes na própria carne e nos ingredientes, ou pela adição de culturas *starter* de bactérias e leveduras especialmente selecionadas para determinadas características funcionais. A adição de cultura *starter* gera produtos com qualidade sensorial e microbiológica definidas, visto que a fermentação é mais rápida, com produção suficiente de ácido e de outras substâncias que conferem o sabor típico, e com padronização e homogeneidade entre os lotes do produto.

As culturas *starter* são compostas principalmente por bactérias lácticas e estafilococos coagulase negativos. As bactérias lácticas têm como principal função a produção de ácidos e de substâncias aromáticas, sendo que algumas espécies ainda produzem bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, compostos que contribuem para reduzir a carga microbiana contaminante. Os estafilococos coagulase negativos atuam no desenvolvimento e estabilização da cor do produto curado, limitam a oxidação de lipídeos, evitando a rancidez, e produzem substâncias aromáticas específicas que contribuem para o sabor do salame.

A indústria de embutidos fermentados está sempre em busca de novas estirpes de bactérias ou de estirpes melhoradas que possam acrescentar um diferencial no seu produto. Daí a importância do estudo de bactérias para a composição de novas misturas de culturas *starter*. As bactérias isoladas de salames de boa qualidade, fermentados de forma natural, apresentam uma vantagem adicional para comporem as formulações de *starter*, a de serem naturalmente adaptadas a este ambiente.

Neste trabalho, foram estudados 98 isolados de bactérias Gram-positivas originadas de salame tipo italiano, sendo 72 provenientes de salame artesanal, produzido por fermentação natural, e as demais oriundas de salame industrial. A maioria destas bactérias são estafilococos coagulase negativos com representantes das espécies *Staphylococcus xylosus*, *S. capitis*, *S. arlettae*, *S. equorum*, *S. warneri*, *S. chromogenes*, *S. ayersii*, *S. caprae* e *S. delphini*. Uma vantagem adicional apresentada por estas bactérias consiste em terem sido isoladas em condições que permitiriam

também o isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, dois dos mais importantes patógenos associados a salames fermentados. Esse fato as qualifica como potencialmente boas competidoras em relação a *S. aureus* e *L. monocytogenes* e, dessa forma, como uma barreira ao desenvolvimento desses patógenos quando presentes em número elevado nos embutidos.

A importância deste trabalho consiste na seleção de bactérias oriundas de salames artesanais de boa qualidade, com potencial promissor para a composição de novas formulações de culturas *starter* para a fermentação de embutidos cárneos. A aplicação destas bactérias pode levar à obtenção de salames fermentados com melhor qualidade, ao mesmo tempo em que permitem preservar as características originais do produto.

As propostas delineadas para este trabalho estão apresentadas em quatro capítulos. Inicialmente, apresenta-se a Revisão de Literatura, Capítulo I, sobre os aspectos que envolvem a utilização de cocos Gram-positivos na fermentação de embutidos cárneos. Em seguida, características bioquímicas foram estudadas com focalizando a atividade antagonista de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano sobre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, Capítulo II; atividade de nitrato redutase e catalase nessas bactérias, Capítulo III; e, finalmente, o estudo de aspectos de segurança relacionados a essas bactérias, representados pela produção e degradação de aminas biogênicas e pela presença de genes codificadores de enteroxinas, Capítulo IV.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

Cocos Gram-positivos na fermentação de embutidos cárneos

1. Culturas *starter* na fermentação de salames

A necessidade da indústria fabricar produtos seguros, com propriedades tecnológicas desejáveis e padronizadas, resultou no uso de culturas *starter* para a produção de salames fermentados, por processo em que há o controle da fermentação, da maturação e, ainda, a inibição do crescimento e da atividade de microrganismos indesejáveis (Drosinos et al., 2005). A adição de culturas *starter* compostas de bactérias do ácido láctico e cocos Gram-positivos catalase-positivos selecionados melhora a qualidade e segurança do produto final e padroniza as suas características (Lücke, 2000). Salames fermentados artesanalmente, também chamados tradicionais, são produzidos em várias pequenas unidades processadoras na Europa (Ammor et al., 2005) e também no Brasil. Neste caso, a fermentação ocorre como resultado da atividade da microbiota introduzida por processo de contaminação natural durante a desossa e processamento da carne, sendo, portanto, uma fermentação não controlada. O inóculo pode também ser uma porção de salame de boa qualidade fabricado anteriormente. De qualquer forma, cada unidade processadora se caracteriza por possuir uma microbiota nativa específica, composta de microrganismos úteis para a fermentação e geração do aroma típico do salame, bem como de microrganismos deterioradores e patogênicos (Ammor et al., 2005; Chevallier et al., 2006). Portanto, a caracterização da microbiota nativa é crucial porque a segurança, a aceitabilidade e a qualidade sensorial do produto são dadas em função das microbiotas patogênica, contaminante e tecnológica, respectivamente (Chevallier et al., 2006).

A adição de microrganismos desejáveis em produtos cárneos pode ter quatro propósitos diferentes: (1) melhorar a segurança, pela inativação de patógenos; (2) melhorar a estabilidade e aumentar a vida de prateleira, pela inibição de mudanças indesejáveis causadas por microrganismos deterioradores ou por reações abióticas; (3) modificar a matéria-prima para obter produtos com novas propriedades sensoriais; e (4) beneficiar a saúde do consumidor, como resultado dos efeitos positivos desses microrganismos sobre a microbiota intestinal (Lücke, 2000). Em fermentações de embutidos as bactérias do ácido láctico geralmente são as responsáveis por estas

funções, mas outras bactérias, principalmente os cocos Gram-positivos catalase-positivos (*Staphylococcus*, *Kocuria*), leveduras (*Debaromyces*) e fungos (*Penicillium*) estão envolvidos na geração e estabilidade das propriedades sensoriais desejadas (Lücke, 2000). Estafilococos coagulase negativos e outros cocos Gram-positivos podem atuar também no controle de microrganismos indesejáveis em salames fermentados, uma vez que produzem ácidos e outras substâncias antimicrobianas (Villani et al., 1997; Simonová et al., 2006).

Salames fermentados artesanalmente geralmente são tidos como de qualidade superior, comparados aos obtidos por fermentação industrial (Leroy et al., 2006). Estes possuem características peculiares distintas e que são conferidas durante o processo tecnológico utilizado e composição da microbiota nativa específica da unidade processadora (García-Varona et al., 2000; Ammor et al., 2005).

A indústria de produtos cárneos está sempre em busca de novas estirpes de bactérias para a composição de culturas *starter* que promovam uma melhoria na fermentação do salame em relação ao sabor, a segurança, a tecnologia de processamento ou saúde do consumidor, gerando um produto com características diferenciadas. Neste contexto, surgem as chamadas culturas *starter* funcionais que oferecem vantagens adicionais, comparadas às culturas *starter* clássicas. Elas representam uma forma de melhorar e otimizar o processo de fermentação para gerar produtos mais saborosos, saudáveis e seguros microbiologicamente. As vantagens destas culturas incluem a formação de compostos de aroma, substâncias benéficas à saúde, bacteriocinas ou outras substâncias antimicrobianas, o desenvolvimento adequado da cor de curado, qualidades probióticas, e ausência de propriedades negativas, tais como a produção de aminas biogênicas e compostos tóxicos (Leroy et al., 2006).

As bactérias mais promissoras para a composição de culturas *starter* funcionais são estirpes selvagens oriundas de salames artesanais que normalmente possuem melhor desempenho na fermentação quando comparadas aos *starters* industriais, pois estão mais bem adaptadas ao ambiente da carne e são capazes de dominar a microbiota do produto (Drosinos et al., 2005, Leroy et al., 2006). A enorme variedade de salames

fermentados artesanais, de diferentes origens, representa um recurso de biodiversidade que pode e deve ser explorado para desenvolver novas culturas *starter* funcionais, para introduzir as qualidades obtidas com estirpes selvagens em fermentações industriais padronizadas (Leroy et al., 2006). Além de fornecer espécies diferentes, nesses salames fermentados de origem artesanal, a diversidade genética e fisiológica entre os cocos Gram-positivos catalase-positivos isolados é geralmente maior (Martin et al., 2006), o que propicia possibilidades de combinações de microrganismos para se obterem melhores resultados na fermentação.

Culturas *starter* funcionais devem também oferecer vantagens tecnológicas. Há também interesse na redução das concentrações de nitrato e nitrito em produtos cárneos, pois estes estão associados à formação de substâncias potencialmente carcinogênicas, as nitrosaminas. Entretanto, não se pode promover uma eliminação completa destes ânions no embutido, em razão do seu papel na formação da cor característica do produto curado e no controle de microrganismos patogênicos, especialmente *Clostridium botulinum*. Estirpes produtoras de bacteriocinas podem ser usadas no controle de microrganismos patogênicos, substituindo parte do nitrato e nitrito utilizados com esta finalidade, em conjunto com estirpes capazes de gerar derivados nitrosilados da mioglobina responsáveis pela cor de curado (Leroy et al., 2006).

2. Estafilococos coagulase negativos

Estafilococos coagulase negativos são cocos Gram-positivos pertencentes à família *Micrococcaceae*; são imóveis, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose, produtores de catalase e formam aglomerados quando submetidos à coloração de Gram. A diversidade de espécies de estafilococos coagulase negativos foi registrada em 1986 como sendo de 18 espécies conhecidas (Sneath et al., 1986). Em 1999 já haviam sido diferenciadas 32 espécies de estafilococos coagulase negativos, sendo 15 espécies de ocorrência natural em humanos e as restantes não associadas ao homem (Huebner et al., 1999).

Os estafilococos coagulase negativos podem ser encontrados no solo e em outros ambientes, porém o habitat é a pele e as membranas mucosas de mamíferos onde são considerados como comensais. Ao mesmo tempo, são incluídos entre os patógenos de importância (Huebner et al., 1999), causando infecções que resultam em abscessos superficiais ou profundos, endocardite, mastite, osteomielite, pneumonia, meningite, infecção de feridas e septicemia. Além disso, podem causar intoxicações severas, incluindo intoxicação alimentar, necrose epidérmica tóxica e síndrome do choque tóxico (Novick, 1993).

Várias espécies de estafilococos coagulase negativos são comumente isoladas de salames fermentados, tais como: *Staphylococcus auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus*, entre outros (Marchesini et al., 1992, Coppola et al., 2000, Mauriello et al., 2004, Drosinos et al., 2005). Este grupo de bactérias desempenha papel fundamental na fermentação do salame, sendo responsável pela formação do aroma (Berdagué et al., 1993); prevenção da rancificação, em razão da atividade de catalase (Coppola et al., 1997); formação da cor e sabor de produto curado, em razão da atividade de nitrato redutase. As atividades proteolítica e lipolítica exercidas por estafilococos coagulase negativos desempenham um papel menor do que o atribuído ao processo de fermentação. A proteólise e a lipólise tissulares são preponderantes (Montel et al., 1998).

3. Atividades bioquímicas de cocos Gram-positivos catalase-positivos relevantes na fermentação de salames

Proteólise e lipólise

Estafilococos coagulase negativos e kocuriae são cocos Gram-positivos, catalase-positivos, que participam em reações desejáveis que ocorrem durante a maturação de salames fermentados, tais como: estabilização da cor, decomposição de peróxidos, proteólise e lipólise. Em

salame tipo italiano o sabor é gerado principalmente pelas atividades lipolítica e proteolítica de enzimas tissulares, mas culturas *starter* também têm influência, em razão de suas atividades metabólicas que geram compostos com aroma (Leroy et al., 2006). A atividade proteolítica de origem microbiana é baixa nas condições encontradas na fermentação do salame (Kennealy et al., 1999). A atuação das enzimas microbianas se dá sobre os peptídeos gerados pela proteólise muscular, produzindo aminoácidos que são convertidos em compostos com aroma. Da mesma forma, o papel principal dos estafilococos coagulase negativos não é a lipólise em si, e sim a oxidação dos ácidos graxos gerados pela lipólise tissular e liberação de alcanos, alcenos, álcoois, aldeídos, cetonas, entre outros, compostos que conferem o aroma típico ao produto (Montel et al., 1998). As características dos estafilococos coagulase negativos consideradas como de maior importância para uso como culturas *starter* na produção de salames fermentados são as atividades de nitrato redutase e catalase (Weber, 1994).

Nitrato redutase

A redução de nitrato em procariotos é feita por três tipos de enzimas que contém molibdênio: nitrato redutases respiratórias (Nar), nitrato redutases periplásmicas (Nap) e nitrato redutases assimilatórias (Nas) (González et al., 2006). As nitrato redutases respiratórias (Nar) são encontradas em várias bactérias denitrificantes e que utilizam nitrato na respiração. Em *Escherichia coli*, os genes que codificam nitrato redutase respiratória estão agrupados no operon *narGHJI*, localizado no *locus ch1C* do cromossomo. As Nap apresentam heterogeneidade na composição de genes do operon bem como na sua ordenação. Nove genes diferentes foram identificados como componentes dos operons que codificam Naps em diferentes organismos (González et al., 2006). Os genes *nas* estão agrupados em operons com composições diferentes, tal como ocorre com os genes *nap*. A expressão deste operon em *Klebsiella pneumoniae* é insensível ao oxigênio, mas induzida por nitrato e nitrito, e reprimida pela presença de amônia no meio de cultura. Em razão da localização citoplasmática da enzima, a redução do nitrato ocorre estritamente no

citoplasma, sendo necessário o seu transporte para o interior da célula. Uma vez no citoplasma, o ânion nitrato é reduzido pela Nas para nitrito e este exportado para o periplasma, onde é imediatamente reduzido a amônia (González et al., 2006).

A atividade de nitrato redutase é essencial no processamento de embutidos cárneos, pois acelera a formação e estabilização da cor através da formação de nitrosomioglobina, pigmento responsável pela cor de curado (Mauriello et al., 2004). Além do seu papel no desenvolvimento da coloração adequada, a redução do nitrato é importante para a qualidade do produto, por prevenir a formação de sabores indesejáveis (Miralles et al., 1996). Isto ocorre porque a redução do nitrato forma o nitrito, anion que pode limitar a oxidação de lipídeos por mecanismos indiretos, a exemplo de: ligação ao grupo heme e prevenção da liberação do ferro catalítico; ligação ao ferro não heme, com inibição da catálise e, ainda, a estabilização dos lipídeos olefínicos contra a oxidação (Talon et al., 1999). A importância da atividade de nitrato redutase é de tal ordem que a destaca como o primeiro critério a ser utilizado na escolha de estirpes de estafilococos coagulase negativos para comporem as culturas *starter* (Montel et al., 1996; García-Varona et al., 2000).

Catalase

O peróxido de hidrogênio é um metabólito comumente produzido por bactérias lácticas durante a fermentação do salame, e, por ser um forte agente oxidante, pode causar descoloração do pigmento nitroso heme, alterações no aroma, rancidez e redução da vida de prateleira do salame (Hammes e Knauf, 1994; Hugas e Monfort, 1997). Para a destruição do peróxido de hidrogênio formado, é necessária a presença de bactérias com atividade de catalase para transformar o peróxido de hidrogênio e prevenir assim o desenvolvimento de rancidez e alterações na coloração do produto (Coppola et al., 1997; Hammes e Hertel, 1998, Barrière et al., 2001). Pelas razões expostas, os autores recomendam para esse fim o uso de estirpes de estafilococos coagulase negativos com alta atividade de catalase, para

ajudar a prevenir o desenvolvimento de sabores estranhos gerados pela oxidação de lipídeos durante a maturação do salame (Mauriello et al., 2004).

4. Aspectos de segurança relacionados a estafilococos coagulase negativos

As espécies de cocos Gram-positivos coagulase negativos selecionadas para uso como culturas *starter* são consideradas como seguras quando não produzem enterotoxinas e aminas biogênicas. Elas podem também contribuir para a segurança do produto quando apresentam a característica de antagonismo a patógenos e pela capacidade de degradar aminas.

Atividade antagonista

A atividade antagonista da cultura *starter* a *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* é desejável por serem dois dos mais importantes microrganismos patogênicos que podem estar presentes e se multiplicar em salames fermentados. Estes microrganismos conseguem resistir a condições adversas, a exemplo de concentrações relativamente altas de sal e baixa atividade de água (Farber et al., 1993; Työppönen et al., 2003).

O principal efeito antimicrobiano da cultura *starter* no processo fermentativo é a acidificação da carne (Lücke, 2000), fator responsável pela segurança de salames fermentados. Entretanto, certos compostos antimicrobianos, como as bacteriocinas, também atuam, em produtos levemente ácidos. As bacteriocinas podem eliminar os microrganismos indesejáveis que toleram acidez, como por exemplo *L. monocytogenes* (Leroy et al., 2006). O uso como cultura *starter* de bactérias que estejam bem adaptadas às condições do salame, preferencialmente originadas de isolamentos efetuados a partir do salame, resulta em melhor desempenho e produção de bacteriocinas (Leroy et al., 2002). A seleção de culturas *starter* apropriadas a partir da microbiota nativa de salames artesanais pode

representar uma estratégia para melhorar a segurança do produto sem afetar a sua originalidade (Chevallier et al., 2006).

Bactérias do ácido láctico têm como uma de suas principais funções, no processo de fabricação de embutidos, a inibição de microrganismos patogênicos e deterioradores em produtos cárneos fermentados (Lücke, 2000; Ammor et al., 2006). Entretanto, nenhuma das estirpes de bactérias do ácido láctico ativas na fermentação do salame tem se mostrado capaz de inibir *S. aureus* eficientemente por meio de bacteriocinas ou enzimas líticas. Uma alternativa que tem sido proposta para superar esta deficiência é a introdução de genes que codificam proteínas antagonistas, como por exemplo lisostafina, em estirpes de bactérias do ácido láctico e aumento da expressão de tais genes, para atuar diretamente sobre *S. aureus* (Lücke, 2000). Entretanto, a atual preocupação dos consumidores e de órgãos fiscalizadores quanto ao uso de microrganismos geneticamente modificados em alimentos torna necessários os estudos de outras espécies de bactérias, além das bactérias do ácido láctico, que sejam preferencialmente isoladas de salames fermentados e que tenham capacidade de inibir *S. aureus*, entre outros patógenos. Neste contexto, surgem os estafilococos coagulase negativos como bactérias promissoras para ajudar no controle de microrganismos contaminantes em salames fermentados. Vários estudos têm demonstrado o potencial destes microrganismos como produtores de enzimas bacteriolíticas, antibióticos e bacteriocinas (Tagg et al., 1976; González-Fandos et al., 1996; Nascimento et al., 2005). Eles podem apresentar atividade antagonista a diversos tipos de microrganismos patogênicos e deterioradores, inclusive *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* (Villani et al., 1997; Carnio et al., 2000; Papamanoli et al., 2002; Nascimento et al., 2005; Simonová et al., 2006).

Enterotoxinas

Enterotoxinas estafilocócicas são proteínas com identidade definida e organizadas em uma família de 9 tipos sorológicos principais de toxinas termoestáveis causadoras de gastroenterite, resultante do consumo de alimentos contaminados (Balaban e Rasooly, 2000). Os nove principais tipos

antigênicos de enterotoxinas estafilocócicas compreendem os cinco tipos clássicos, SEA, SEB, SEC, SED e SEE e quatro tipos descritos recentemente, SEG, SEH, SEI e SEJ. A SEC é dividida em três subclasses, SEC₁, SEC₂ e SEC₃, de acordo com seus pontos isoelétricos (Rosec e Gigaud, 2002). São proteínas de 22 a 30 kDa divididas em grupos de homologia com base nas seqüências de aminoácidos (Stiles e Krakauer, 2005). Essas toxinas são geralmente codificadas por plasmídeos, bacteriófagos ou elementos genéticos móveis ou transponíveis e produzidas no final da fase logarítmica e início da fase estacionária (Dinges et al., 2000). Entre as enterotoxinas estafilocócicas, SEA, SED e SEE são as que apresentam a maior identidade na seqüência de aminoácidos, de 53% a 81%, enquanto SEB e as SECs possuem de 50% a 66% de identidade (Stiles e Krakauer, 2005). A enterotoxina mais comumente recuperada em casos de surtos de intoxicação alimentar é a do tipo SEA, seguida por SED e SEB (Balaban e Rasooly, 2000).

A principal responsável por surtos de intoxicações alimentares é considerada como sendo *S. aureus*, embora alguns pesquisadores ressaltem a capacidade de produção de enterotoxinas por estafilococos coagulase negativos, o que poderia, também, contribuir para a intoxicação alimentar (Cunha et al., 2006). A produção de enterotoxinas por estafilococos coagulase negativos isolados de alimentos vem sendo estudada com mais intensidade nos últimos dez anos (Rodríguez et al., 1996; Vernozy-Rozand et al., 1996; Rosec et al., 1997; Rosec e Gigaud, 2002; Carmo et al., 2002; Martin et al., 2006). Uma estirpe de estafilococo coagulase negativo isolada de leite cru associado a um surto de intoxicação alimentar envolvendo 328 pessoas demonstrou capacidade de produzir enterotoxinas SEC e SED (Carmo et al., 2002).

A ocorrência de genes de enterotoxina em cocos Gram-positivos catalase-positivos isolados de salame fermentado é muito rara (Blaiotta et al., 2004; Martin et al., 2006). Além disso, o gene pode estar presente e não ser expresso. Várias estirpes de estafilococos coagulase negativos isolados de salame seco hibridizaram com as sondas de DNA para os genes de enterotoxina SEA, SEB, SEC e SED, mas não produziram enterotoxina (Rodríguez et al., 1996). É importante lembrar que estafilococos coagulase

negativos raramente estão implicados em casos de intoxicação alimentar, porque eles não crescem rapidamente no alimento (Cunha et al., 2006). Normalmente, espécies da família *Micrococcaceae* apresentam pouca competitividade na presença de bactérias acidúricas com crescimento ativo em salames fermentados (Mauriello et al., 2004, Drosinos et al., 2005). Porém já foram encontradas contagens correspondentes a 6,2 a 7,3 log₁₀ UFC.g⁻¹ de estafilococos coagulase negativos e *Kocuria* em salames artesanais prontos para consumo (Chevallier et al., 2006). Portanto, é preciso assegurar que estirpes de estafilococos coagulase negativos selecionadas para uso como culturas *starter* não sejam capazes de produzir enterotoxinas, principalmente quando se considera que serão introduzidas em grande número nos produtos a serem fermentados e que estarão em condições favoráveis para competir com os outros microrganismos e também para a produção de toxinas.

Produção e degradação de aminas biogênicas

A capacidade de produzir ou de degradar aminas biogênicas é uma característica importante a ser considerada na escolha de microrganismos para comporem a cultura *starter*. Estas são bases orgânicas nitrogenadas de baixo peso molecular sintetizadas no metabolismo microbiano, vegetal e animal, formadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos. Estão comumente presentes em organismos vivos, nos quais são responsáveis por várias funções essenciais: promoção do crescimento, atividade metabólica, atuação no sistema imunológico do intestino e no sistema nervoso, controle da pressão sanguínea e eliminação de radicais livres. Porém, se são consumidas em altas quantidades, podem ter efeitos toxicológicos como dilatação dos vasos sanguíneos, hipotensão, dor de cabeça, diarreia e vômitos (Silla-Santos, 1996), além de outros mais severos tais como reações pseudo-alérgicas (intoxicação histamínica), enxaquecas e crises hipertensivas (Bover-Cid et al., 2001). Normalmente, não há perigo para um consumidor saudável, cujas monoamino e diamino-oxidases farão o catabolismo dessas aminas biogênicas, promovendo a sua desaminação

oxidativa com produção de aldeídos, peróxido de hidrogênio e amônia (Cooper, 1997).

Fatores adicionais, como álcool e a presença das amins putrescina e cadaverina, sensibilidade individual, inativação do mecanismo de detoxificação devido a deficiências genéticas, doenças gastrointestinais ou tratamentos com inibidores de monoaminoxidases (MAOI), potencializam os efeitos toxicológicos das amins biogênicas (Brink et al., 1990; Bover-Cid et al., 2001). Portanto, é difícil avaliar o grau de toxicidade de amins biogênicas em alimentos, e dessa forma, estabelecer níveis de limite tóxico para estes componentes dos alimentos. A formação de nitrosaminas carcinogênicas constitui um risco toxicológico adicional, especialmente em produtos cárneos que contém nitrito e nitrato como sais de cura (Bover-Cid et al., 2001).

A fermentação de salames secos oferece condições favoráveis para a formação de amins biogênicas, uma vez que os principais fatores necessários para a formação estão presentes, isto é, há crescimento de microrganismos por vários dias e, ocorre um certo grau de proteólise que resulta em aminoácidos livres, os precursores das amins biogênicas. Finalmente, a própria existência de um ambiente ácido pode favorecer a atividade de aminoácido descarboxilase de microrganismos provenientes da cultura *starter* e da microbiota autóctone (Bover-Cid et al., 1999; Suzzi e Gardini, 2003).

A produção de amins biogênicas é um fenômeno extremamente complexo, dependente de variáveis tais como composição qualitativa e quantitativa da microbiota, cinética de crescimento dos microrganismos, suas atividades proteolítica e descarboxilativa, procedimentos higiênicos adotados durante a produção, e a disponibilidade de precursores. O pH, atividade de água, potencial redox e concentração de NaCl também podem ter um efeito importante na produção de amins biogênicas em salames. Além disso, não há uma regra inequívoca unindo estas variáveis com os diferentes mecanismos metabólicos necessários para a formação de amins biogênicas (Suzzi e Gardini, 2003).

A adição de uma cultura *starter* não produtora de amins para desenvolver uma fermentação controlada é considerada como uma prática

desejável para prevenir o acúmulo excessivo de aminas. A adição de culturas *starter* pode inibir a produção de aminas biogênicas quando estas culturas se mostram capazes de sobrepor à microbiota autóctone, que geralmente é produtora de aminas (Bover-Cid et al., 2001). Além disso, o conteúdo de aminas biogênicas em alimentos depende do equilíbrio entre aminas produzidas e oxidadas, isto é, entre atividades descarboxilativas de aminoácidos e amina oxidativas (Gardini et al., 2002).

O uso de culturas *starter* não descarboxilativas, altamente competitivas e promotoras de acidificação rápida, previne o crescimento de bactérias produtoras de aminas (Bover Cid et al., 2001, González-Fernandez et al., 2003). Além disso, a introdução de estirpes que possuam atividade amina oxidase pode ser uma forma extra de diminuir a quantidade de aminas biogênicas produzidas *in situ* (Leuschner e Hammes, 1998, Gardini et al., 2002, Suzzi e Gardini, 2003). Ainda que a atividade amina oxidase *in vitro* de microrganismos não seja quantitativamente reprodutível no salame, em razão das condições mais severas e, em particular, à baixa tensão de oxigênio, baixo pH e presença de NaCl, tem-se observado a redução da histamina em salames secos na presença de culturas *starter* contendo estafilococos com atividade amina oxidase. Leuschner e Hammes (1998) mostraram que a atividade da tiramina oxidase foi baixa, mas ainda presente nas condições em que ocorre a fermentação do salame, isto é, 20 °C, 4% de NaCl e pH 5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMMOR, S., DUFOUR, E., ZAGOREC, M., CHAILLOU, S. e CHEVALLIER, I. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. Food Microbiology, v.22, p.529-538, 2005.
2. AMMOR, S., TAUVERON, G., DUFOUR, E. e CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility –

- screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, v.17, p.454-461, 2006.
3. BALABAN, N. e RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, v.61, p.1-10, 2000.
 4. BARRIÈRE, C., CENTENO, D., LEBERT, A., LEROY-SÉTRIN, S., BERDAGUÉ, J. L. e TALON, R. Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters*, v.201, p.181-185, 2001.
 5. BERDAGUÉ, J. L., MONTEIL, P., MONTEL, M. C. e TALON, R. Effects of starter cultures on the formation of flavor compounds in dry sausage. *Meat Science*, v.35, p.275-287, 1993.
 6. BLAIOTTA, G., ERCOLINI, D., PENACCHIA, C., FUSCO, V., CASABURI, A., PEPE, O. e VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus*. AB-8802. *Journal of Applied Microbiology*, v.97, p.719-730, 2004.
 7. BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., e VIDAL-CAROU, M. C. Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 46, p.95-104, 1999.
 8. BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., e VIDAL-CAROU, M. C. Effect of the interaction between a low tiramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v.65, p.113-123, 2001.
 9. BRINK, B. ten, DAMINK, C., JOOSTEN, H. M. L. J. e HUIS in't VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.11, p.73-84, 1990.
 10. CARMO, L. S., DIAS, R. S., LINARDI, V. R., SENA, M. J., SANTOS, D. A., FARIA, M. E., PENA, E. C., JETT, M. e HEINENE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in

- Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v.19, p.9-14, 2002.
11. CARNIO, M. C., HÖLTZEL, A., RUDOLF, M., HENLE, T., JUNG, G. e SCHERER, S. The macrocyclic peptide antibiotic micrococcin P₁ is secreted by the food-borne bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66(6), p.2378–2384, 2000.
 12. CHEVALLIER, I., AMMOR, S., LAGUET, A., LABAYLE, S., CASTANET, V., DUFOUR, E. e TALON, R. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Control*, v.17, p.446-453, 2006.
 13. COOPER, R. A. On the amine oxidases of *Klebsiella aerogenes* strain W70. *FEMS Microbiology Letters*, v.146, p.85-89, 1997.
 14. COPPOLA, R., IORIZZO, M., SAOTTA, R., SORRENTINO, E., e GRAZIA, L. Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiology*, v.14, p.47-53, 1997.
 15. COPPOLA, S., MAURIELLO, G., APONTE, M., MOSCHETTI, G. e VILLANI, F. Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Science*, v.56(4), p.321-329, 2000.
 16. CUNHA, M. L. R. S., PERESI, E., CALSOLARI, R. A. O., JÚNIOR, J. P. A. Detection of enterotoxin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.70-74, 2006.
 17. DINGES, M. M., ORWIN, P. M., SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13 (1), p. 16-34, 2000.
 18. DROSINOS, E. H., MATARAGAS, M., XIRAPHI, N., MOSCHONAS, G., GAITIS, F. e METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, v.69, p.307-317, 2005.
 19. FARBER, J. M., DALEY, E., HOLLEY, R. e USBORNE, W. R. Survival of *Listeria monocytogenes* during the production of uncooked German,

- American and Italian-style fermented sausages. *Food Microbiology*, v.10(2), p.123-132, 1993.
20. GARCÍA-VARONA, M., SANTOS, E. M., JAIME, I., ROVIRA, J. Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology*, v.54, p.189-195, 2000.
21. GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M. A., PAPARELLA, A. e SUZZI, G. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat Science*, v.61, p.275-283, 2002.
22. GONZÁLEZ-FANDOS, M. E., SIERRA, M. L., GARCIA-LÓPEZ, M. L., OTERO, A., SANZ, J. e MORENO, B. Staphylococcal growth and enterotoxin production in the presence of meat cultures (non LAB). *Meat Science*, v.43, n.3-4, p.255-263, 1996.
23. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., SANTOS, E. M., JAIME, I. e ROVIRA, J. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology*, v.20, p.275-284, 2003.
24. GONZÁLEZ, P. C., CORREIA, C., MOURA, I., BRONDINO, C. D. e MOURA, J. J. G. Bacterial nitrate reductases: molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 100, p.1015-1023, 2006.
25. HAMMES, W. P. e HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. *Meat Science*, v.49, n.suppl.1, p.S125-S138, 1998.
26. HAMMES, W. P. e KNAUF, H. J. Starters in the processing of meat products. *Meat Science*, v.36, p.155-168, 1994.
27. HUEBNER, J., GOLDMANN, D. A. Coagulase negative staphylococci: Role as pathogens. *Annual Review of Medicine*, v.50, p.223-236, 1999.
28. HUGAS, M. e MONFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, v.59, n.4, p.547-554, 1997.
29. KENNEALY, P. M., FRANSEN, N. G., GRAU, H. O'NEILL, E. E. e ARENDT, E. K. Effects of environmental conditions on microbial

- proteolysis in a pork myofibril model system. *Journal of Applied Microbiology*, v.87, p.794-803, 1999.
30. LEROY, F., VERLUYTEN, J., MESSENS, W. e DE VUYST, L. Modelling contributes to the understanding of the different behaviour of bacteriocin producing strains in a meat environment. *International Dairy Journal*, v.12, p.247-253, 2002.
31. LEROY, F., VERLUYTEN, J. e DE VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v.106, p.270-285, 2006.
32. LEUSCHNER, R. G. K. e HAMMES, W. P. Tyramine degradation by micrococci during ripening of fermented sausage. *Meat Science*, v.49, n.3, p.289-296, 1998.
33. LÜCKE, F. -K. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, v.56, p.105-115, 2000.
34. MARCHESINI, B. BRUTTIN, A., ROMAILLER, N., MORETON, R. S. Microbiological events during commercial meat fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, v.73(3), p.203-209, 1992.
35. MARTIN, B., GARRIGA, M., HUGAS, M., BOVER-CID, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T. e AYMERICH, T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 107, p.148-158, 2006.
36. MAURIELLO, G., CASABURI, A., BLAIOTTA, G., e VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science*, v.67, p.149-158, 2004.
37. MIRALLES, M. C., FLORES, J. e PEREZ-MARTINEZ, G. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiology*, v. 13, p.227-236, 1996.
38. MONTEL, M. C., REITZ, J., TALON, R., BERDAGUÉ, J.-L. e ROUSSET-AKRIM, S. Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology*, v.13, p.489-499, 1996.

39. MONTEL, M. C., MASSON, F. e TALON, R. Bacterial role in flavour development. *Meat Science*, v.49(1), p.S111-S123, 1998.
40. NASCIMENTO, J. S., FAGUNDES, P. C., BRITO, M. A. V. P., SANTOS, K. R. N. e BASTOS, M. C. F. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v.106, p.61-71, 2005.
41. NOVICK, R. *Staphylococcus*, p.17-33. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria - Biochemistry, physiology and molecular genetics. Editors: Abraham L. Sonenshein, James A. Hoch e Richard Losick, American Society for Microbiology, Washington, D.C, 987 p., 1993.
42. PAPAMANOLI, E., KOTZEKIDOU, P., TZANETAKIS, N. e LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Characterization of micrococccaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology*, v.19, p.441-449, 2002.
43. RODRÍGUEZ, M., NÚÑEZ, F., CÓRDOBA, J. J., BERMÚDEZ, E. e ASENSIO, M. A. Gram-positive, catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.6, p.1897-1902, 1996.
44. ROSEC, J. P., GUIRAUD, J. P., DALET, C. e RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *International Journal of Food Microbiology*, v.35, p.213-221, 1997.
45. ROSEC, J. P. e GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, v.77, p.61-70, 2002.
46. SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.29, p.213-231, 1996.
47. SIMONOVÁ, M., STROMPFOVÁ, V., MARCINÁKOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., VESTERLUND, S., MORATALLA, M.L., BOVER-CID, S. e VIDAL-CAROU, C. Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Science*, v.73, p. 559-564, 2006.
48. SNEATH, P. H. A. Editor; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E., Associate editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams e Wilkins, Baltimore, 1023 p., 1986.

49. STILES, B. G. e KRAKAUER, T. Staphylococcal enterotoxins: a purging experience in review. *Clinical Microbiology Newsletter*, v.27, n.23, p.179-186, 2005.
50. SUZZI, G. e GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.2731, p.1-14, 2003.
51. TAGG, J. R., DAJANI, A. S. e WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriology Review*, v.40, n.3, p.722-756, 1976.
52. TALON, R., WALTER, D., CHARTIER, S., BARRIERE, C. e MONTEL, M. C. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, v.52, p.47-56, 1999.
53. TYÖPPÖNEN, S., PETÄJÄ, E. e MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v.83, p.233-244, 2003.
54. VERNOZY-ROZAND, C., MAZUY, C., PREVOST, G. LAPEYRE, C., BES, M., BRUN, Y e FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v.30, p.271-280, 1996.
55. VILLANI, F., SANNINO, L., MOSCHETTI, G., MAURIELLO, G., PEPE, O., AMODIO-COCCHIERI, R., e COPPOLA, S. Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosus* 1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages. *Food Microbiology*, v.14, p.555-566, 1997.
56. WEBER, H. Dry sausage manufacture, the importance of protective cultures and their metabolic products. *Fleischwirtsch*, v.74, p.278-282, 1994.

CAPÍTULO II

Atividade antagonista de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano sobre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

RESUMO

Bactérias do gênero *Staphylococcus* produzem enzimas bacteriolíticas, antibióticos e bacteriocinas que demonstram efeito inibidor sobre espécies desse gênero e das filogeneticamente relacionadas. Neste trabalho, foi avaliada a atividade antagonista de 98 estirpes de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano pertencentes às espécies *S. xylosus*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. chromogenes*, *S. equorum*, *S. arlettae*, *S. ayersii*, *S. caprae*, *S. warneri*, *S. delphini* entre outras, sobre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Aqueles que demonstraram inibição foram avaliados quanto a natureza da substância inibidora. Os isolados foram obtidos a partir de duas marcas de salames artesanais e uma industrial. Dos 98 isolados testados, 63 apresentaram halos de inibição $\geq 1,5$ mm sobre *L. monocytogenes* ou *S. aureus*. Quarenta e um isolados, sendo 18 oriundos dos salames artesanais, sofreram redução significativa da atividade inibitória sobre *L. monocytogenes* ou *S. aureus* quando o sobrenadante foi tratado com protease, indicando a presença de substância inibidora de natureza protéica, possivelmente bacteriocina. Desses 41 isolados com atividade inibitória indicativa de bacteriocina, 16 demonstraram característica de efeito inibidor sobre ambos microrganismos indicadores.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do ácido láctico são conhecidas por sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos pela produção de ácidos orgânicos, acetaldeído, etanol, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil e bacteriocinas (Caplice e Fitzgerald, 1999). *Staphylococcus* são também capazes de produzir enzimas bacteriolíticas, antibióticos e bacteriocinas, substâncias que demonstram efeito inibitório sobre espécies desse gênero e bactérias relacionadas (Tagg et al., 1976; González-Fandos et al., 1996). Quatro estirpes de *S. xylosus*, identificadas entre 125 isolados pertencentes à família *Micrococcaceae*, originados de salame tipo italiano, exibiram antagonismo contra 5 estirpes de

L. monocytogenes (Villani et al., 1994). Um desses isolados produziu substância inibidora de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Bacillus cereus*, possivelmente uma bacteriocina (Villani et al., 1997). *S. equorum* isolado de queijo demonstrou inibição *in vitro* sobre estirpes de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, entre outras bactérias, pela ação da bacteriocina micrococina, e foi também capaz de inibir *L. monocytogenes* na superfície de queijo fresco (Carnio et al., 2000). Estirpes de *Micrococcaceae* isoladas de salame fermentado seco são também capazes de causar a inibição completa do crescimento de *L. monocytogenes*, como demonstrado com o uso dos filtrados de *S. xylosus*, enquanto a adição dos filtrados de *S. carnosus* causava 90% e o de *Kocuria varians* 80% de inibição do crescimento dessa bactéria (Papamanoli et al., 2002). Recentemente a produção de bacteriocinas por *S. saprophyticus*, *S. arlettae*, *S. hominis*, *S. epidermidis* e *S. simulans* isolados em casos de mastite bovina foi demonstrada (Nascimento et al., 2005). Estirpes de *S. xylosus* e *S. carnosus* isoladas de salame fermentado exibiram antagonismo sobre *Listeria innocua* e *Pseudomonas* sp, sendo a substância inibidora semelhante a bacteriocina (Simonová et al., 2006).

Uma vantagem das bacteriocinas sobre os antibióticos clássicos é a sua destruição por enzimas do trato digestivo (Caplice e Fitzgerald, 1999). Além da produção de substâncias inibidoras, outra forma de controlar o crescimento de microrganismos indesejáveis com a adição de culturas selecionadas é pela “interferência microbiana”, na qual ocorre a inibição do crescimento de certos microrganismos por outros membros do habitat. A inibição acontece em razão da competição por nutrientes, geração de um ambiente desfavorável e competição por sítios de ligação/adesão *in vivo* (Jay, 1997; Caplice e Fitzgerald, 1999).

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antagonista de cocos Gram-positivos isolados de salames tipo italiano artesanais de boa qualidade sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus*, comparando com a atividade antagonista de cocos Gram-positivos isolados de salame industrial que utiliza culturas *starter*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Foram utilizados neste estudo 98 estirpes de cocos Gram-positivos pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Industrial, isolados de uma marca de salame tipo italiano fermentado industrialmente (marca A) e de duas fermentadas naturalmente (marcas B e C). As bactérias foram isoladas em ágar Baird-Parker e ágar Oxford após procedimento para detecção de bactérias possivelmente competidoras de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente (Tristão, 1998).

As culturas de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram utilizadas como indicadoras.

2.2. Atividade antagonista em meio sólido

A atividade antagonista dos 98 isolados a *L. monocytogenes* e *S. aureus* foi determinada pelo método do ágar "spot" descrito por Spelhaug e Harlander (1989). Os isolados foram cultivados por 24 horas a 37 °C em 3 mL de caldo nutritivo (peptona 10 g.L⁻¹, glicose 10 g.L⁻¹, NaCl 5 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 2,5 g.L⁻¹, extrato de carne 8 g.L⁻¹, extrato de levedura 4 g.L⁻¹, pH 6,5). As culturas foram diluídas em caldo nutritivo e padronizadas para D.O_{630nm} = 0,4 em espectrofotômetro Milton Roy Spectronic 20 D. Foram feitas microgotas de 5 µL, em duplicata, na superfície de ágar nutritivo em placas de Petri. Após incubação a 37 °C por 24 horas, 300 µL das culturas indicadoras de *S. aureus* ATCC 25923 ou *L. monocytogenes* ATCC 7644, previamente cultivadas em caldo nutritivo a 37 °C por 18 horas, foram adicionados em 5 mL de ágar nutritivo semi-sólido e vertidos sobre as placas contendo as microgotas. Estas foram novamente incubadas a 37 °C por 18 horas e os halos de inibição foram medidos como a distância da borda da colônia até a borda do halo. Medidas inferiores a 1,5 mm foram consideradas como ausência de inibição.

2.3. Atividade antagonista em meio líquido

Os isolados que demonstraram antagonismo sobre *L. monocytogenes* ou *S. aureus* foram avaliados quanto à natureza da substância inibidora de acordo com De Paula (2000). Os sobrenadantes dos isolados, em pH não neutralizado e em pH neutro, foram tratados com catalase e protease e adicionados a suspensões dos microrganismos indicadores, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ou *S. aureus* ATCC 25923, que tiveram seu crescimento avaliado pela determinação da densidade óptica em função do tempo.

Cada isolado foi cultivado em 12 mL de caldo nutritivo a 37°C por 18 horas. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 2400 g por 15 minutos a 4 °C em centrífuga Sorvall RC 5C. O pH dos sobrenadantes (pH não neutralizado) foi medido em pHmetro Accumet® model 15, Fischer Scientific e 6 mL de cada sobrenadante foram filtrados em membrana Schleicher & Schuell com 0,2 µm de diâmetro de poro. O restante de cada sobrenadante teve o pH corrigido para 7,0 com NaOH 0,5 M (pH neutro) e foi filtrado no mesmo tipo de filtro.

Alíquotas dos sobrenadantes com pH não neutralizado (S) e pH neutro (SN) foram tratados com catalase, C (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) e protease, P (dispase de *Bacillus polymyxa*, Sigma, St. Louis, Missouri, USA) separadamente e em conjunto, de modo a obter uma concentração final de 1 mg.mL⁻¹ de enzima. A seguir foram incubadas a 37 °C por 2 horas. As enzimas foram preparadas em solução tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 na concentração de 20 mg.mL⁻¹.

Células de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 25923 foram cultivadas em 3 mL de caldo nutritivo a 37 °C por 18 horas e centrifugadas a 2400 g por 15 minutos a 4 °C em centrífuga Sorvall RC 5C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram ressuspendidos em caldo nutritivo com componentes em dobro até D.O 0,4 a 630 nm em espectrofotômetro Milton Roy Spectronic 20 D, o que corresponde a 10⁸ UFC.mL⁻¹, aproximadamente. Foram feitas diluições em caldo nutritivo em dupla concentração de modo a obter, aproximadamente, 10⁶ UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes* ou *S. aureus*.

As suspensões de *L. monocytogenes* ou *S. aureus* foram cultivadas em placas de microtitulação na presença dos sobrenadantes tratados com as enzimas e dos sobrenadantes sem adição de enzimas. Cento e cinquenta microlitros dos sobrenadantes foram inoculadas com 150 µL de suspensão da bactéria alvo num total de 8 tratamentos aplicados a cada isolado. As placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C e leituras da absorvância foram feitas, a cada hora, em leitor de ELISA a 560 nm para construção das curvas de crescimento dos microrganismos indicadores. A partir das curvas de crescimento foram calculadas as velocidades específicas de crescimento - μ dos microrganismos indicadores para cada um dos 8 tratamentos. Os valores de μ foram apresentados em gráficos. Foi utilizado o programa DMFit 2.0 (Baranyi e Roberts, 1994) para o cálculo dos valores de k e, através da fórmula $\mu=0,693 \times k$, foi feita a conversão para expressar os valores em μ .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antagonista de *Staphylococcus* coagulase negativos e de outros cocos Gram-positivos sobre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos coagulase negativos e outros cocos Gram-positivos isolados do salame italiano, em sua maioria, mostraram-se com atividade antagonista sobre pelo menos um dos microrganismos indicadores testados (Tabelas 1 e 2), sendo a inibição mais freqüente e mais intensa sobre *L. monocytogenes*. Estudos têm demonstrado a inibição de *L. monocytogenes*, entre outras bactérias Gram-positivas, por espécies de estafilococos coagulase negativos isolados de alimentos (Villani et al., 1997, Carnio et al., 2000, Nascimento et al., 2005). *L. innocua* e *Pseudomonas* sp foram inibidas por estirpes de *S. xylosus* e *S. carnosus* isoladas de salame eslovaco artesanal (Simonová et al., 2006). Na conclusão dos autores, o efeito combinado do baixo pH, exclusão competitiva e/ou produção de

bacteriocinas seria uma forma eficiente de controlar a presença destes microrganismos em produtos cárneos.

O efeito antagonista dos cocos Gram-positivos isolados de salame italiano foi maior sobre *L. monocytogenes* do que sobre *S. aureus* (Tabelas 1 e 2), principalmente em relação aos isolados obtidos em ágar Oxford (Tabela 2). Estirpes de *S. xylosum*, *S. saprophyticus* e *S. carnosus* mostraram pouco efeito inibidor sobre o crescimento de quatro estirpes de *S. aureus*, porém reduziram os níveis de enterotoxina produzida (SEA, SEB e SED), ou preveniram completamente a produção de enterotoxina (SEC₁) (González-Fandos et al., 1996).

Os isolados obtidos em ágar Baird-Parker (Tabela 1) demonstraram maior inibição sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus* quando comparados à inibição demonstrada pelos isolados originalmente obtidos em ágar Oxford (Tabela 2). Alguns isolados do ágar Baird-Parker produziram halos de inibição de até 5 mm sobre *L. monocytogenes*, mostrando um bom potencial inibidor destas culturas em relação a este patógeno. Nos isolados provenientes do ágar Oxford, o maior halo de inibição foi de 3 mm sobre *L. monocytogenes*.

Os isolados investigados neste estudo foram obtidos por meio de metodologias utilizadas para o isolamento de bactérias capazes de crescer nas mesmas condições em que cresceriam *S. aureus* e *L. monocytogenes*. As bactérias encontradas são, portanto, competidoras em relação a estes patógenos. Este fato já é por si só relevante quanto à capacidade destas bactérias em inibir o crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* por meio de exclusão competitiva. Na primeira metodologia, os agentes inibidores da microbiota acompanhante foram o cloreto de sódio, na concentração de 10% no caldo de pré-enriquecimento, o cloreto de lítio e o telurito de potássio no ágar Baird-Parker. Na segunda, foram usados como inibidores da microbiota acompanhante o ácido nalidíxico, presente nos caldos UVM e Fraser, e ciclohexamida, sulfato de colistina, fosfomicina e cefotetano presentes no ágar Oxford. Ambas metodologias são seletivas e as diferenças na composição dos meios permitiram o crescimento de bactérias de espécies diferentes cujos perfis de atividade antagonista também foram diferentes.

Tabela 1 - Atividade antagonista de cocos Gram-positivos isolados de salame italiano em ágar Baird-Parker sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus*

Isolado	Microrganismo	Atividade antagonista	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
AIS 1	<i>Rothia dentocariosa</i>	+	-
AIS 2	<i>R. dentocariosa</i>	+++	+
AIS 3	<i>R. dentocariosa</i>	-	-
AIS 4	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-
AIS 5	<i>R. dentocariosa</i>	-	-
AIS 6	<i>Staphylococcus ayersii</i>	-	-
AIS 7	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-
AIS 8	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-
AIS 9	<i>Staphylococcus arlettae</i>	-	-
AIS 10	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-
AIS 11	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-
AIS 12	<i>R. dentocariosa</i>	++	++
AIS 13	<i>R. dentocariosa</i>	+	+
AIS 14	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	++	+
AIS 15	<i>Staphylococcus caprae</i>	-	-
AIS 16	<i>S. chromogenes</i>	-	++
AIS 17	<i>R. dentocariosa</i>	+	+
AIS 18	<i>R. dentocariosa</i>	+++	+
AIS 19	<i>R. dentocariosa</i>	+++	+
AIS 20	<i>R. dentocariosa</i>	++	-
AIS 21	<i>R. dentocariosa</i>	++	+
AIS 22	<i>S. chromogenes</i>	-	-
BIS 23	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	++
BIS 24	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+	+
BIS 25	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+	+
BIS 26	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+	++
BIS 27	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	+
BIS 28	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	++
BIS 29	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	+
BIS 30	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	++
BIS 31	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	+
BIS 32	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+	+
BIS 33	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-
BIS 34	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+	-
BIS 35	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-
BIS 36	<i>S. ayersii</i>	+++	++
BIS 37	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	+
BIS 38	<i>R. dentocariosa</i>	++	+
BIS 39	<i>R. dentocariosa</i>	++	-
BIS 41	<i>Brevibacterium acetylicum</i>	+	-
BIS 42	<i>S. chromogenes</i>	-	-
CIS 43	<i>S. arlettae</i>	-	-
CIS 44	<i>S. arlettae</i>	-	-
CIS 45	<i>S. caprae</i>	++	-
CIS 46	<i>S. arlettae</i>	-	+
CIS 47	<i>S. arlettae</i>	-	-
CIS 48	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	+
CIS 49	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	+
CIS 50	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+	+
CIS 51	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+++	+
CIS 52	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	+
CIS 53	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+++	++
CIS 54	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	-
CIS 55	<i>Staphylococcus delphini</i>	+++	+
CIS 56	<i>S. delphini</i>	+	+

CIS 57	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	+
CIS 58	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	++	++
CIS 59	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+	+
CIS 60	<i>S. arlettae</i>	-	-
CIS 61	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+	+

- ausência de inibição; + halo de inibição de 1,5 a 2,5 mm; ++ halo de 2,5 a 3,5 mm; +++ halo de 3,5 a 5,0 mm. Os halos foram medidos da borda da microgota até a borda do halo. As letras iniciais, A, B e C, dos códigos dos isolados são referentes às origens dos mesmos: A – salame industrial, B e C – salames artesanais

Tabela 2 - Atividade antagonista de cocos Gram-positivos isolados de salame italiano em ágar Oxford sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus*

Isolado	Microrganismo	Atividade antagonista	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
AIL 1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	-
AIL 2	<i>Staphylococcus equorum</i>	+	-
AIL 3	<i>S. equorum</i>	-	-
AIL 4	<i>S. equorum</i>	+	-
BIL 5	não identificado	-	-
BIL 6	<i>S. equorum</i>	+	-
BIL 7	<i>Listeria innocua</i>	-	-
BIL 8	<i>L. innocua</i>	-	-
BIL 9	<i>L. innocua</i>	+	-
BIL 10	<i>Staphylococcus warneri</i>	-	-
BIL 11	<i>Staphylococcus auricularis</i>	++	+
BIL 12	<i>Staphylococcus arlettae</i>	+	-
BIL 13	<i>Staphylococcus xylosus</i>	-	-
BIL 14	<i>S. arlettae</i>	+	-
BIL 15	<i>S. arlettae</i>	-	-
BIL 16	<i>S. arlettae</i>	-	-
BIL 17	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	-
BIL 18	<i>S. arlettae</i>	-	-
BIL 20	<i>S. equorum</i>	+	+
BIL 21	<i>S. warneri</i>	+	-
CIL 22	<i>S. xylosus</i>	+	-
CIL 23	<i>S. xylosus</i>	-	-
CIL 24	<i>S. arlettae</i>	+	-
CIL 25	<i>S. xylosus</i>	-	-
CIL 26	<i>S. arlettae</i>	-	-
CIL 27	<i>S. warneri</i>	-	-
CIL 28	<i>S. xylosus</i>	-	-
CIL 29	<i>S. arlettae</i>	-	-
CIL 30	<i>S. arlettae</i>	-	-
CIL 31	<i>S. xylosus</i>	-	-
CIL 32	<i>S. xylosus</i>	-	-
CIL 33	<i>S. xylosus</i>	+	-
CIL 34	<i>S. arlettae</i>	-	-
CIL 35	<i>S. xylosus</i>	-	-
CIL 36	<i>S. xylosus</i>	-	-
CIL 39	<i>S. warneri</i>	-	-
CIL 40	<i>S. warneri</i>	-	-
CIL 41	<i>S. arlettae</i>	-	-

- ausência de inibição; + halo de inibição de 1,5 a 2,5 mm; ++ halo de 2,5 a 3,5 mm; +++ halo de 3,5 a 5,0 mm. Os halos foram medidos da borda da microgota até a borda do halo. As letras iniciais, A, B e C, dos códigos dos isolados são referentes às origens dos mesmos: A – salame industrial, B e C – salames artesanais

Dos 98 isolados testados, 63 apresentaram halos de inibição $\geq 1,5$ mm sobre *L. monocytogenes* ou *S. aureus*, sendo 49 provenientes dos salames artesanais e 14 provenientes do salame industrial (Tabelas 1 e 2). Estes isolados foram selecionados para estudo da natureza da substância inibidora pela comparação dos valores da velocidade específica máxima de crescimento dos microrganismos indicadores cultivados em presença dos sobrenadantes dos isolados tratados com catalase ou protease em pH não neutralizado ou pH neutro. Os valores de pH dos sobrenadantes dos meios de crescimento dos isolados inicialmente obtidos em ágar Baird-Parker (Tabela 3) variaram de 4,58 a 5,52. A acidez dos sobrenadantes do meio de crescimento dos cocos Gram-positivos corrobora a afirmação de que a acidez desempenha papel relevante na inibição de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, conforme observado no ensaio em meio líquido. A produção de ácido em salames fermentados é dada principalmente pelas bactérias do ácido láctico, mas estafilococos coagulase negativos também produzem ácido láctico (Simonová et al., 2006) e, portanto, contribuem para a inibição de microrganismos patogênicos e deterioradores.

Em virtude do grande número de gráficos gerado, é apresentado como exemplo um gráfico com as curvas de crescimento de *S. aureus* cultivada na presença dos sobrenadantes do isolado *S. capitis* ss *capitis* CIS 58 (Figura 1). O comportamento dos microrganismos indicadores cultivados na presença dos sobrenadantes dos demais isolados foi, de modo geral, similar. Para facilitar a apresentação e discussão dos resultados, os dados das curvas de crescimento foram apresentados como velocidade específica máxima de crescimento (Figuras 2 a 25).

Na maioria dos casos, as curvas de crescimento do microrganismo indicador cultivado na presença dos sobrenadantes tratados com protease, catalase e ambos em conjunto, mostraram inclinação similar, donde se conclui que não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Nos casos em que ocorreu o maior crescimento quando foi adicionada a protease ao sobrenadante atribuiu-se o fato à degradação de alguma substância de natureza protéica que se encontrava presente no sobrenadante impedindo o crescimento mais acentuado do microrganismo indicador, ou,

alternativamente, a pronta disponibilização de hidrolisados de substâncias protéicas do meio.

Tabela 3 – Valores de pH dos sobrenadantes dos isolados obtidos em ágar Baird-Parker

Isolado	Microrganismo	pH do sobrenadante
AIS 1	<i>Rothia dentocariosa</i>	4,94
AIS 2	<i>R. dentocariosa</i>	4,69
AIS 12	<i>R. dentocariosa</i>	4,61
AIS 13	<i>R. dentocariosa</i>	4,58
AIS 14	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	4,70
AIS 16	<i>S. chromogenes</i>	4,68
AIS 17	<i>R. dentocariosa</i>	4,59
AIS 18	<i>R. dentocariosa</i>	4,69
AIS 19	<i>R. dentocariosa</i>	4,67
AIS 20	<i>R. dentocariosa</i>	4,58
AIS 21	<i>R. dentocariosa</i>	4,59
BIS 23	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,79
BIS 24	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,77
BIS 25	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,94
BIS 26	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,91
BIS 27	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,88
BIS 28	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	5,09
BIS 29	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,96
BIS 30	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,96
BIS 31	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	5,07
BIS 32	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	5,07
BIS 34	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	5,32
BIS 36	<i>Staphylococcus ayersii</i>	5,50
BIS 37	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	5,17
BIS 38	<i>R. dentocariosa</i>	5,50
BIS 39	<i>R. dentocariosa</i>	5,52
BIS 41	<i>Brevibacterium acetylicum</i>	5,35
CIS 45	<i>Staphylococcus caprae</i>	4,73
CIS 46	<i>Staphylococcus arlettae</i>	4,62
CIS 48	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,74
CIS 49	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,59
CIS 50	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,82
CIS 51	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	5,72
CIS 52	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,75
CIS 53	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,70
CIS 54	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,77
CIS 55	<i>Staphylococcus delphini</i>	4,90
CIS 56	<i>S. delphini</i>	4,77
CIS 57	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,76
CIS 58	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,68
CIS 59	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,83
CIS 61	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,70

A maioria dos cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos indicadores, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 25923, em meio líquido,

mesmo que de maneira discreta, sendo que alguns mostraram maior capacidade inibitória do que outros (dados não mostrados).

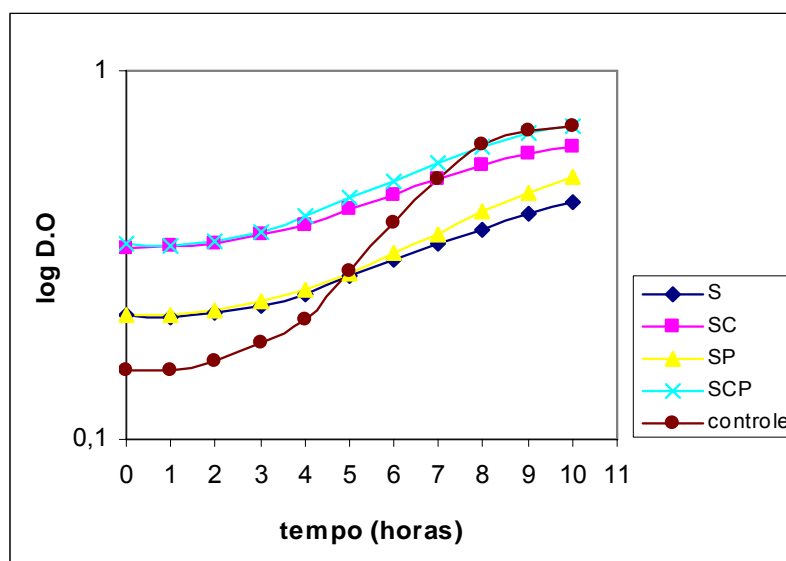


Figura 1 – Efeito do sobrenadante do isolado *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 58, pH 4,68 sobre o crescimento de *S. aureus*. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo do sobrenadante.

Aparentemente, a inibição em meio líquido foi menos evidente do que em meio sólido, pois muitos dos isolados que formaram grandes halos de inibição em meio sólido não mostraram diferenças entre as curvas de crescimento dos tratamentos e do controle. Outros autores (Villani et al., 1997) também reportaram a produção de substância inibidora por uma estirpe de *S. xylosus* em meio sólido, porém não conseguiram o mesmo resultado quando o cultivo foi em meio líquido contendo o sobrenadante filtrado do microrganismo. Esta aparente inabilidade de microrganismos isolados de salame em produzir a substância inibidora em meio líquido foi atribuída pelos autores como um possível reflexo do fato de eles existirem em contato com sólidos no seu ambiente natural (Villani et al., 1997). Além disso, muitas bacteriocinas de bactérias do ácido láctico permanecem aderidas na superfície da célula, portanto, a remoção das células do sobrenadante remove também a bacteriocina produzida (Ammor et al., 2006). Estes autores verificaram que a atividade antagonista em bactérias do ácido láctico isoladas de salame artesanal foi detectada apenas em ágar,

não sendo verificada em sobrenadantes livres de células sob condições que eliminaram inibição por ácido e peróxido de hidrogênio.

Neste estudo, não foi demonstrada a natureza da substância responsável pela inibição em cada caso (ácido, peróxido de hidrogênio ou substância de natureza protéica – bacteriocina). Na maioria das vezes, as curvas dos diferentes tratamentos foram similares (dados não mostrados), porém foi demonstrado que houve inibição em relação aos controles. Estafilococos e lactobacilos isolados de salame grego fermentado espontaneamente exibiram antagonismo contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*, mas o mecanismo exato de inibição não foi determinado (Papamanoli et al., 2002, 2003). Nem sempre é possível relacionar a atividade inibitória microbiana com metabólitos específicos, e, por isso, a atividade inibitória frequentemente permanece não especificada (Leroy et al., 2006). Ainda assim, mesmo com as curvas dos tratamentos sendo similares, houve pequenas diferenças de inclinação, ou seja, diferentes taxas de crescimento dos microrganismos indicadores na presença dos diferentes tratamentos dos sobrenadantes dos isolados.

As diferenças nas taxas de crescimento para os cocos Gram-positivos isolados em ágar Baird-Parker são apresentadas nas Figuras 2 a 17. Na maioria das vezes o crescimento de *L. monocytogenes* ou *S. aureus* na presença dos sobrenadantes dos isolados foi favorecido em pH neutro, razão pela qual se admite que uma das substâncias responsáveis pela inibição destes patógenos é um ácido orgânico. Porém os resultados demonstraram haver a presença de outras substâncias inibitórias, pois para muitos dos isolados obtidos em ágar Baird-Parker o sobrenadante tratado com protease (SP ou SNP) permitiu melhor crescimento do microrganismo indicador, comparado ao seu respectivo sobrenadante não tratado (S ou SN). Alguns isolados, como *R. dentocariosa* BIS 39 (Figura 7) e *B. acetylicum* BIS 41 (Figura 7), destacaram-se entre os demais pela diferença entre os valores de velocidade específica máxima da *L. monocytogenes* cultivada na presença do sobrenadante tratado com protease e na do sobrenadante não tratado com protease. Este efeito foi observado principalmente quando do cultivo em meio contendo os sobrenadantes com pH neutro, uma demonstração de que a acidez não foi a causa da inibição.

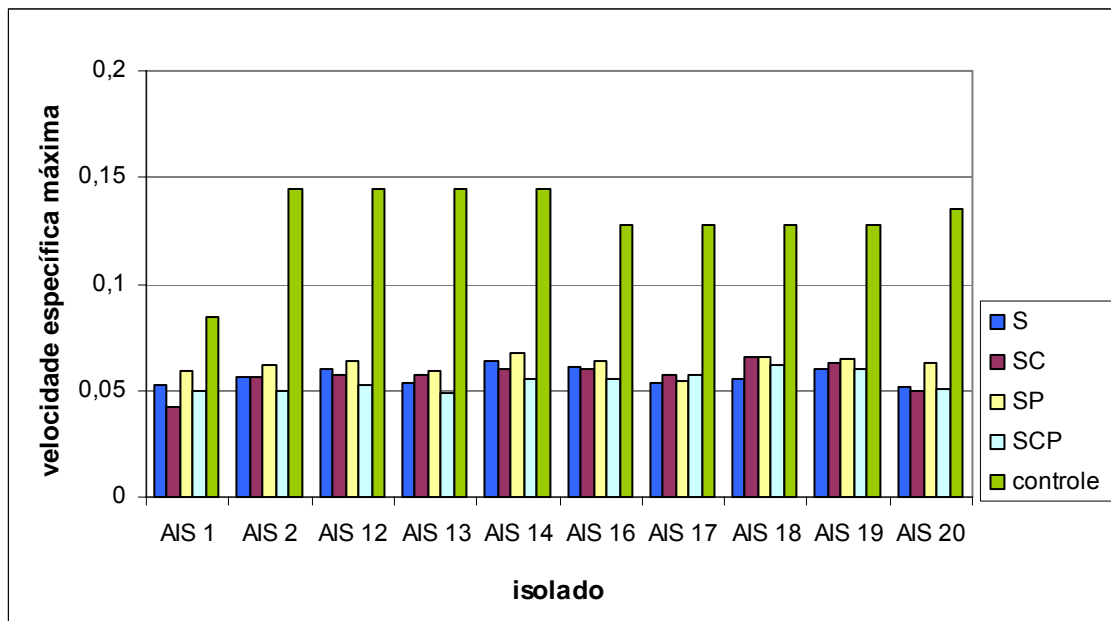


Figura 2 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *R. dentocariosa* AIS 1, *R. dentocariosa* AIS 2, *R. dentocariosa* AIS 12, *R. dentocariosa* AIS 13, *S. chromogenes* AIS 14, *S. chromogenes* AIS 16, *R. dentocariosa* AIS 17, *R. dentocariosa* AIS 18, *R. dentocariosa* AIS 19 e *R. dentocariosa* AIS 20 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

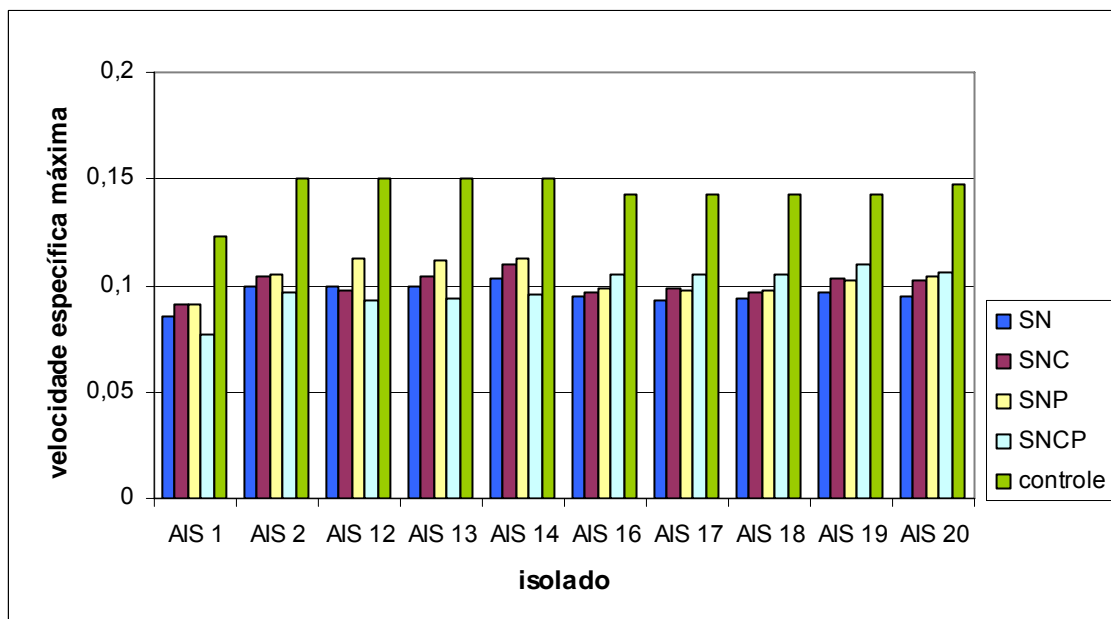


Figura 3 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *R. dentocariosa* AIS 1, *R. dentocariosa* AIS 2, *R. dentocariosa* AIS 12, *R. dentocariosa* AIS 13, *S. chromogenes* AIS 14, *S. chromogenes* AIS 16, *R. dentocariosa* AIS 17, *R. dentocariosa* AIS 18, *R. dentocariosa* AIS 19 e *R. dentocariosa* AIS 20 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante em pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

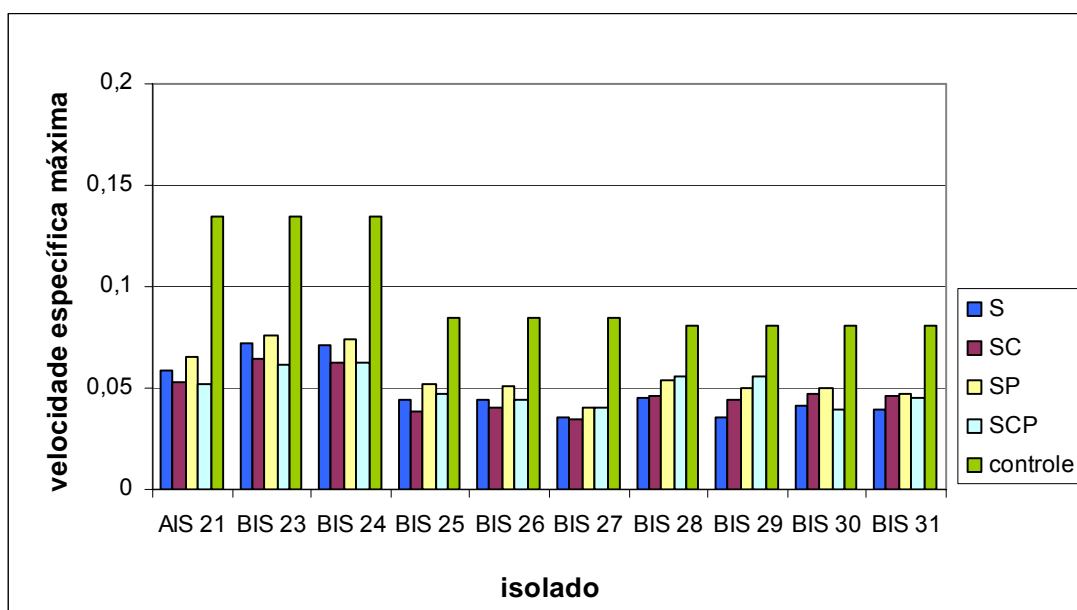


Figura 4 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *R. dentocariosa* AIS 21, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 23, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 24, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 25, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 26, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 27, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 28, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 29, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 30 e *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 31 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

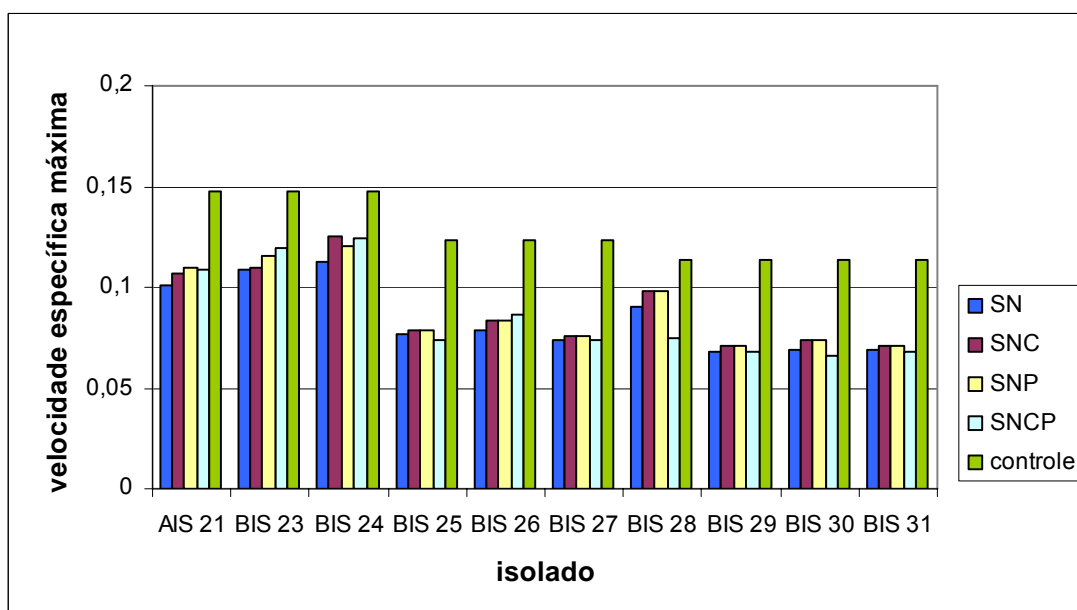


Figura 5 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *R. dentocariosa* AIS 21, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 23, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 24, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 25, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 26, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 27, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 28, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 29, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 30 e *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 31 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante em pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

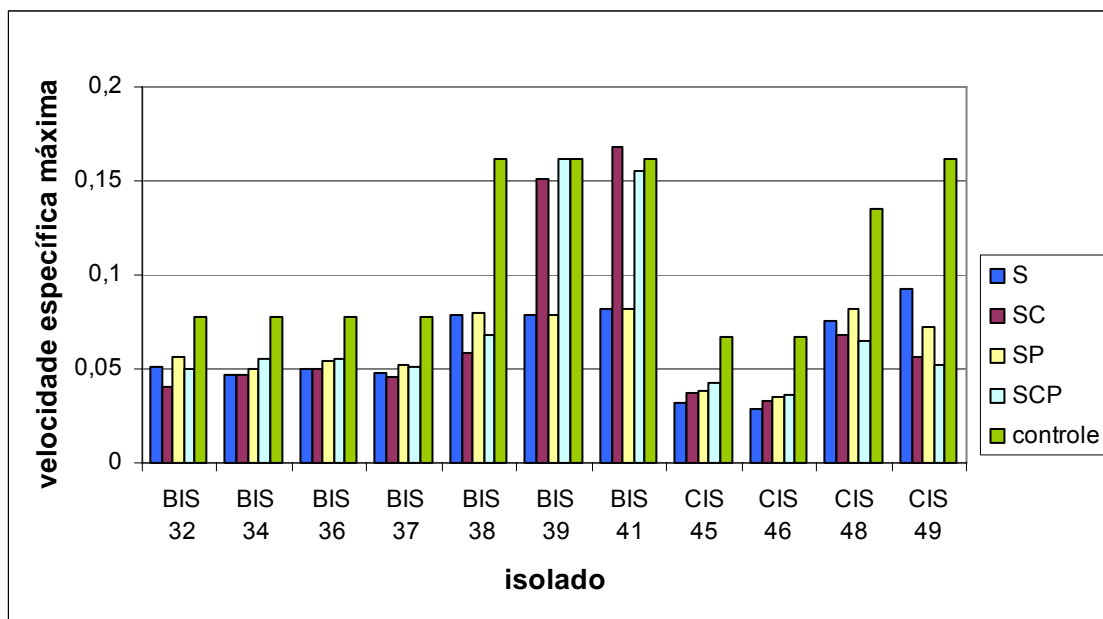


Figura 6 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 32, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 34, *S. ayersii* BIS 36, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 37, *R.dentocariosa* BIS 38, *R. dentocariosa* BIS 39, *B. acetylicum* BIS 41, *S. caprae* CIS 45, *S. arlettae* CIS 46, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 48 e *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 49 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

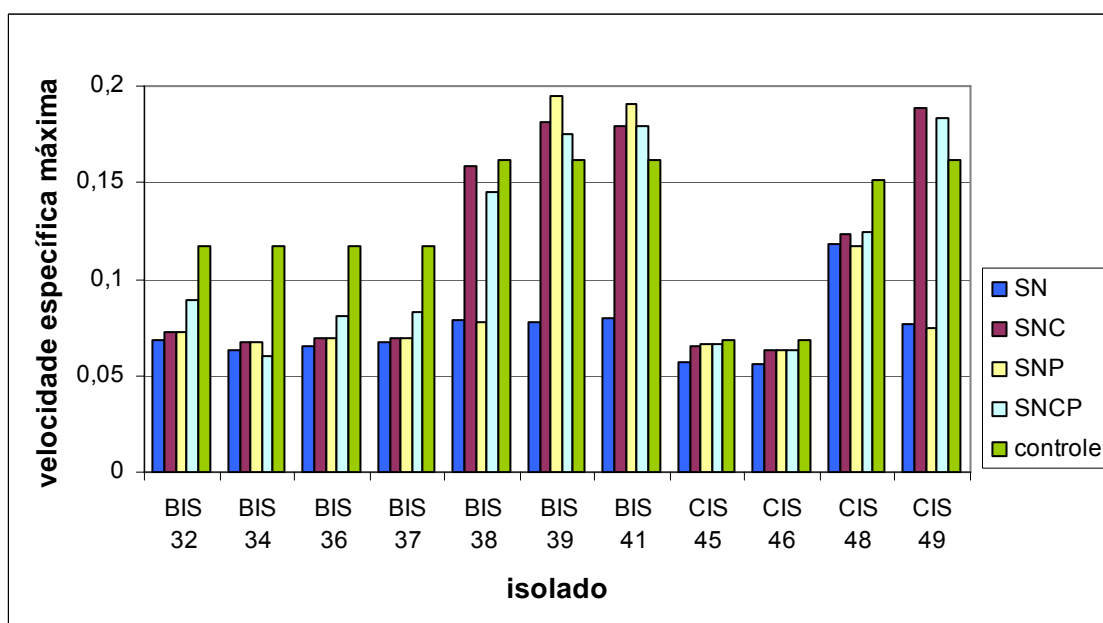


Figura 7 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 32, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 34, *S. ayersii* BIS 36, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 37, *R.dentocariosa* BIS 38, *R. dentocariosa* BIS 39, *B. acetylicum* BIS 41, *S. caprae* CIS 45, *S. arlettae* CIS 46, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 48 e *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 49 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante em pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

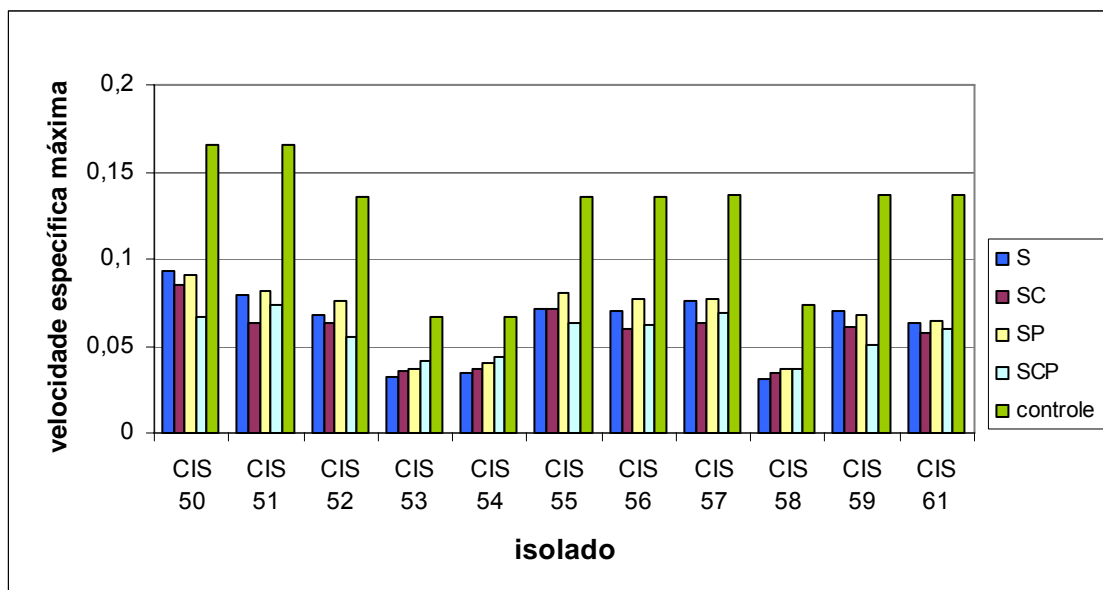


Figura 8 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 50, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 51, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 52, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 53, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 54, *S. delphini* CIS 55, *S. delphini* CIS 56, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 57, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 58, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 59 e *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 61 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

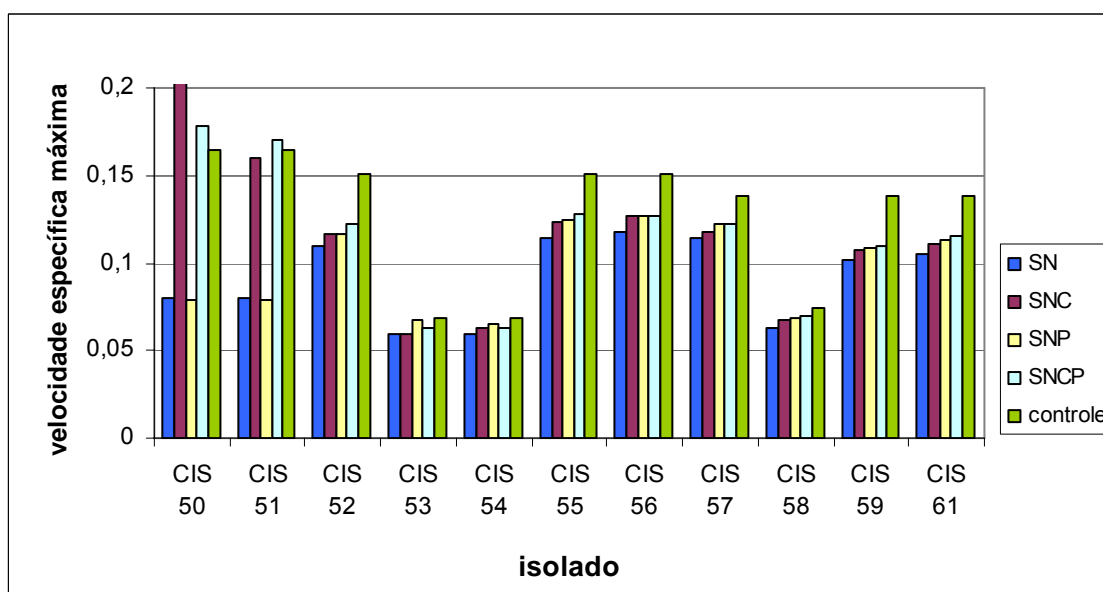


Figura 9 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 50, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 51, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 52, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 53, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 54, *S. delphini* CIS 55, *S. delphini* CIS 56, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 57, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 58, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 59 e *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 61 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante em pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

Os valores de velocidade específica máxima de *S. aureus* (Figuras 10 a 17) revelaram um maior número de cocos Gram-positivos isolados em ágar Baird-Parker cujos sobrenadantes tratados com protease permitiram melhor crescimento do microrganismo indicador, quando comparados com os sobrenadantes não tratados. Destacam-se aqui os isolados *R. dentocariosa* AIS 20 (Figura 10), *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 25, BIS 26, BIS 28, BIS 29, BIS 30 e BIS 31 (Figura 12); BIS 26 (Figura 13); *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 32, *S. caprae* CIS 45 e *S. arlettae* CIS 46 (Figura 14); e *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 52, CIS 53 e CIS 54, *S. delphini* CIS 55 e CIS 56, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 57 e CIS 61 (Figura 16). Destes, apenas o isolado AIS 20 é proveniente do salame industrial. Portanto a contribuição deste trabalho consiste no isolamento de bactérias naturalmente presentes em salames artesanais com ação promissora na inibição de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e cuja inibição foi associada a substância de natureza protéica. Há grande interesse na seleção de bactérias oriundas de salames artesanais com atividade antagonista sobre patógenos relevantes em produtos cárneos, uma vez que estas bactérias estão bem mais adaptadas às condições de fermentação do salame e devem ser, portanto, mais competitivas do que bactérias de outras fontes (Ammor et al., 2006).

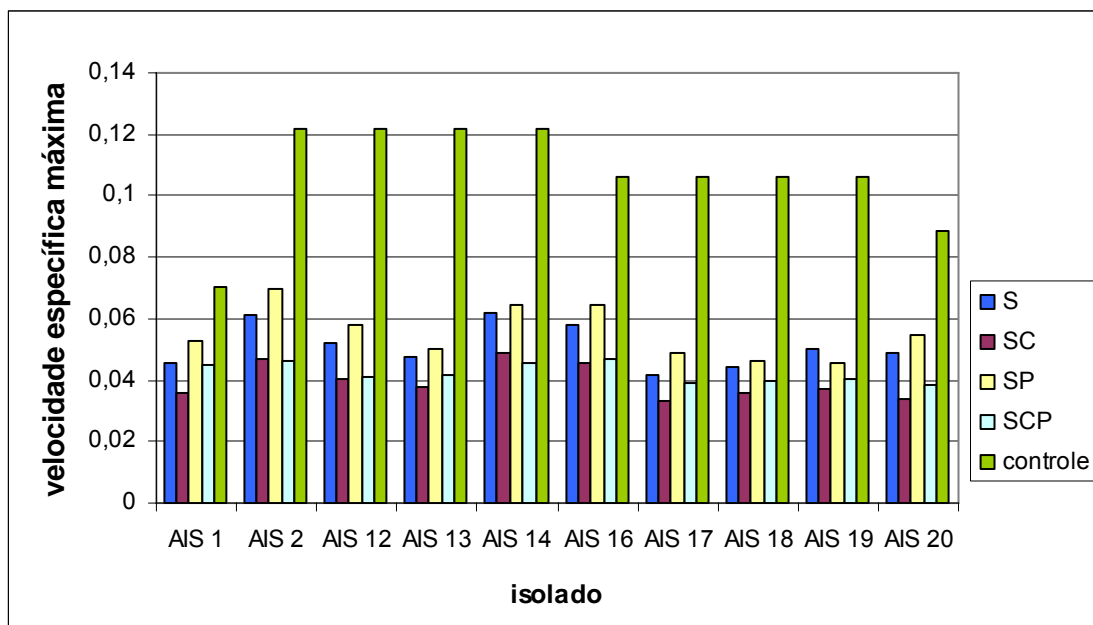


Figura 10 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *R. dentocariosa* AIS 1, *R. dentocariosa* AIS 2, *R. dentocariosa* AIS 12, *R. dentocariosa* AIS 13, *S. chromogenes* AIS 14, *S. chromogenes* AIS 16, *R. dentocariosa* AIS 17, *R. dentocariosa* AIS 18, *R. dentocariosa* AIS 19 e *R. dentocariosa* AIS 20 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

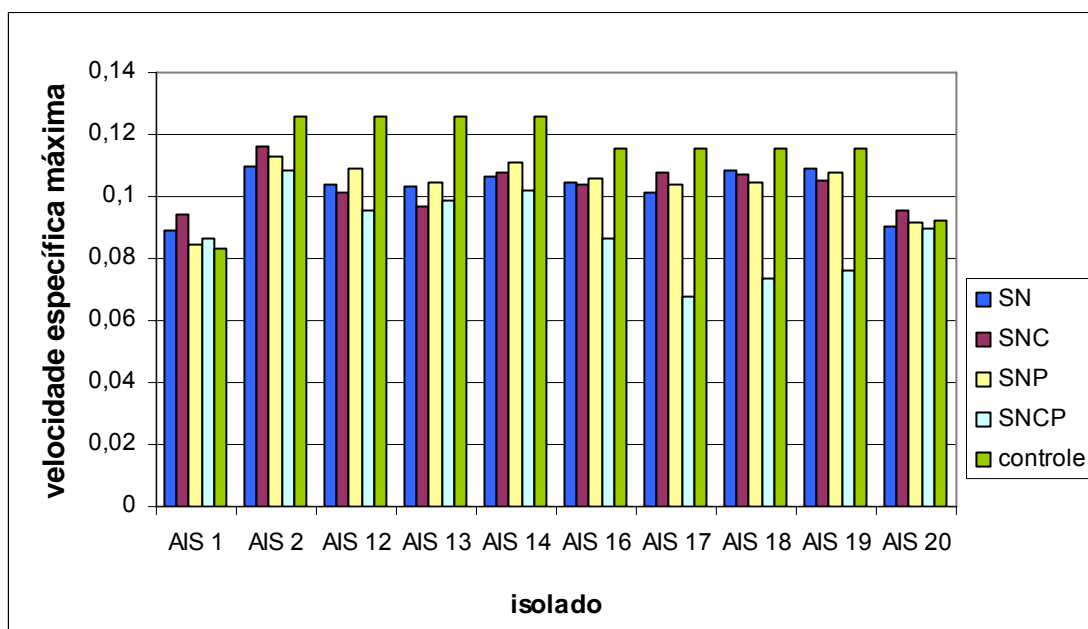


Figura 11 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *R. dentocariosa* AIS 1, *R. dentocariosa* AIS 2, *R. dentocariosa* AIS 12, *R. dentocariosa* AIS 13, *S. chromogenes* AIS 14, *S. chromogenes* AIS 16, *R. dentocariosa* AIS 17, *R. dentocariosa* AIS 18, *R. dentocariosa* AIS 19 e *R. dentocariosa* AIS 20 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante em pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

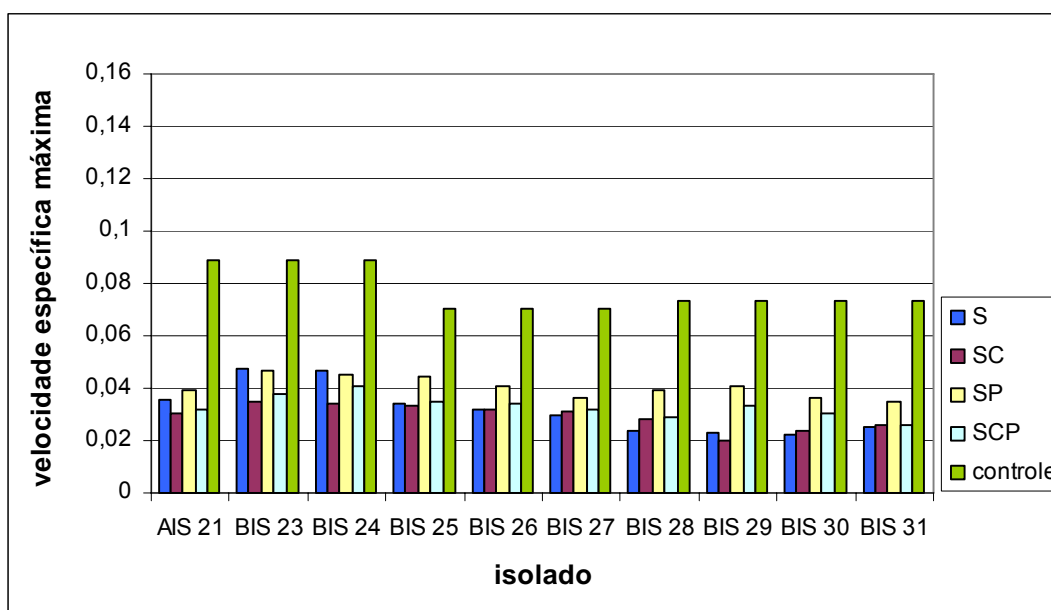


Figura 12 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *R. dentocariosa* AIS 21, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 23, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 24, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 25, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 26, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 27, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 28, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 29, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 30 e *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 31 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

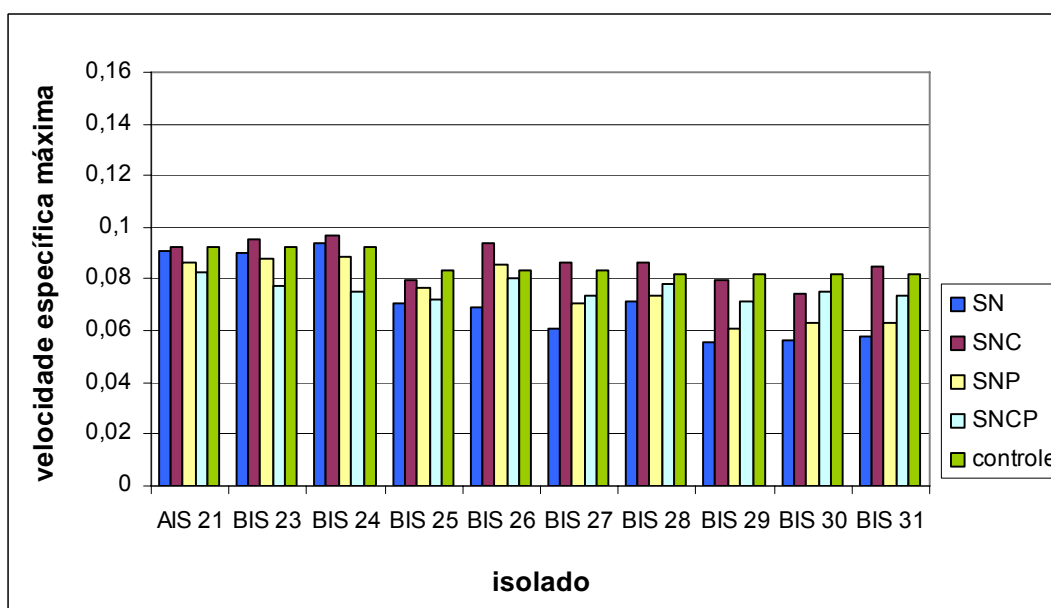


Figura 13 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *R. dentocariosa* AIS 21, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 23, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 24, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 25, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 26, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 27, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 28, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 29, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 30 e *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 31 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante em pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

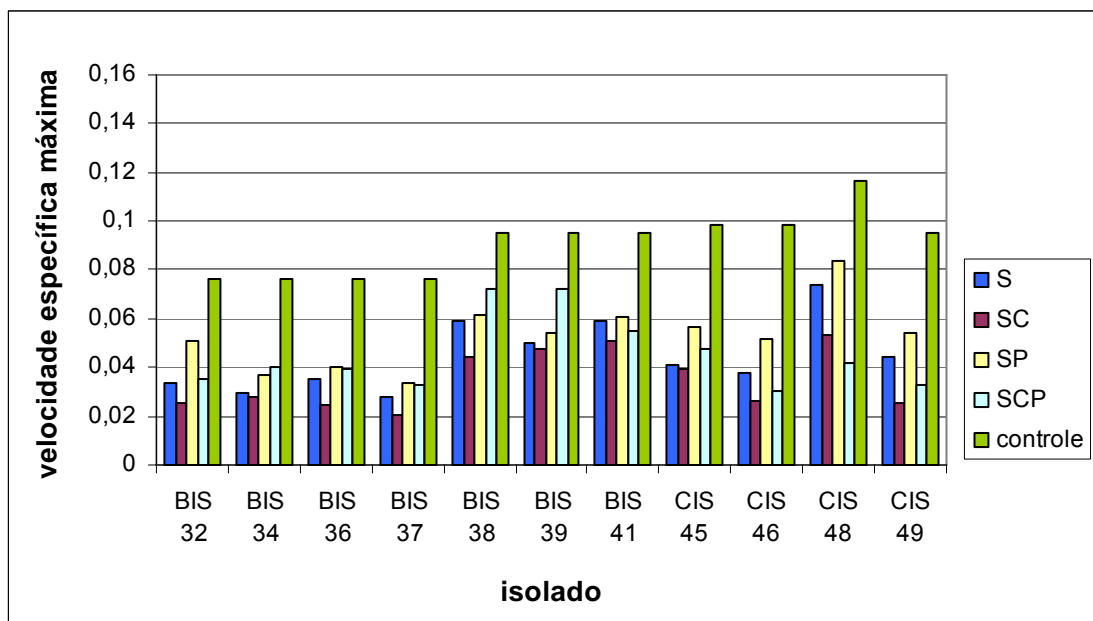


Figura 14 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 32, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 34, *S. ayersii* BIS 36, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 37, *R. dentocariosa* BIS 38, *R. dentocariosa* BIS 39, *B. acetylicum* BIS 41, *S. caprae* CIS 45, *S. arlettae* CIS 46, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 48 e *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 49 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

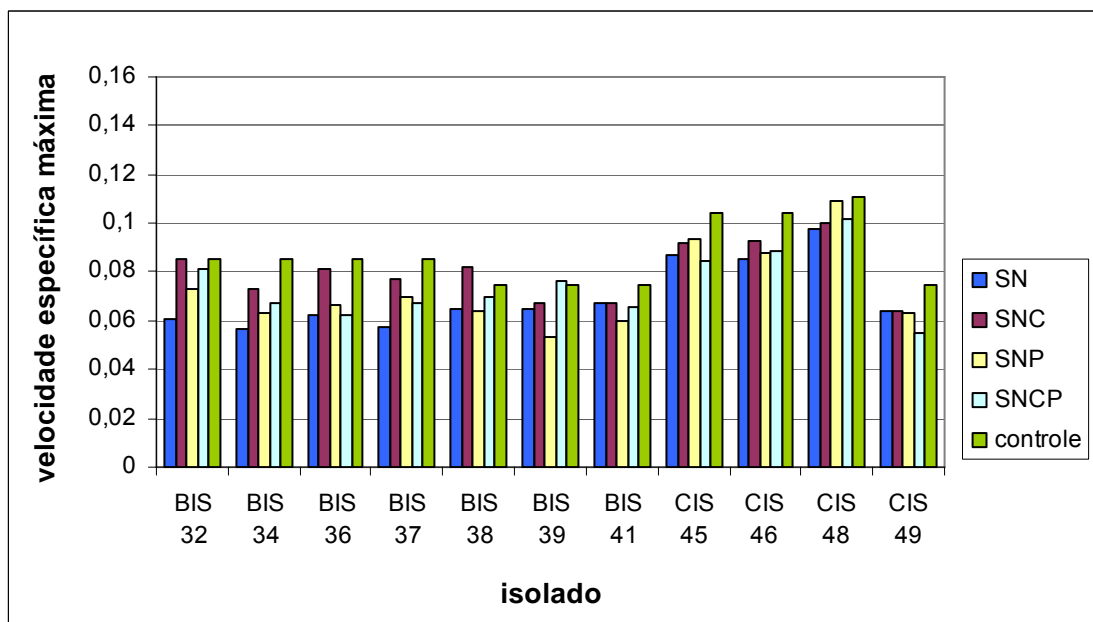


Figura 15 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 32, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 34, *S. ayersii* BIS 36, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 37, *R. dentocariosa* BIS 38, *R. dentocariosa* BIS 39, *B. acetylicum* BIS 41, *S. caprae* CIS 45, *S. arlettae* CIS 46, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 48 e *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 49 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante em pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

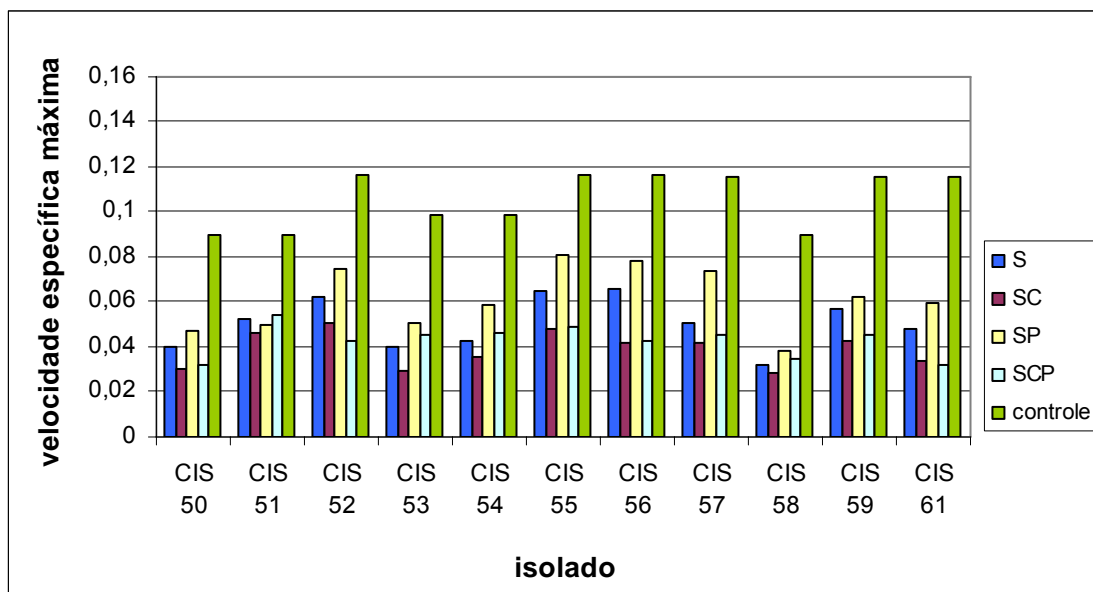


Figura 16 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 50, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 51, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 52, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 53, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 54, *S. delphini* CIS 55, *S. delphini* CIS 56, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 57, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 58, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 59 e *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 61 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

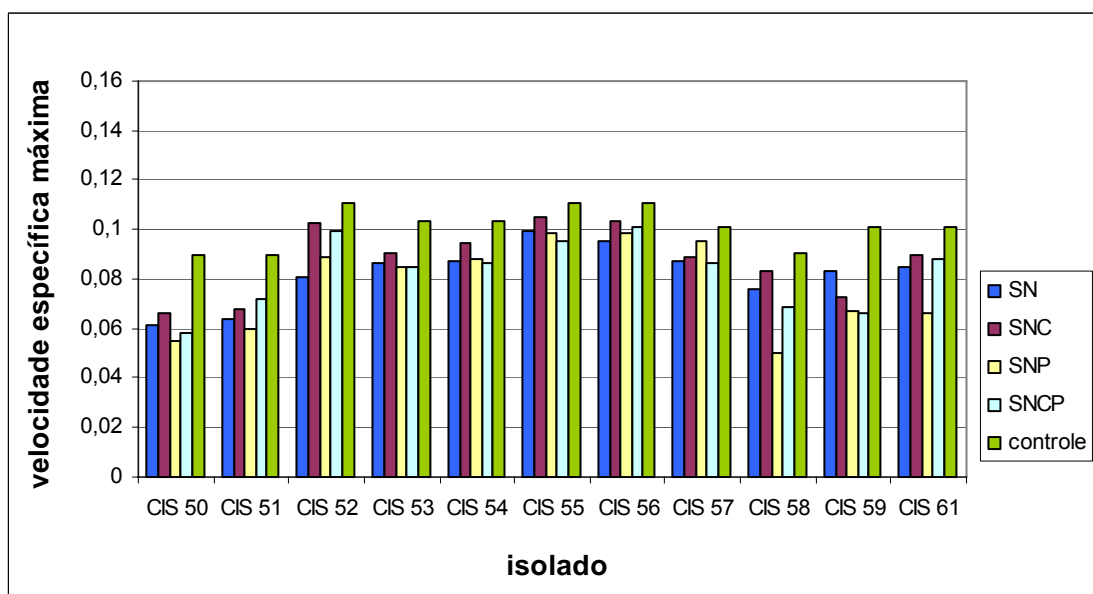


Figura 17 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 50, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 51, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 52, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 53, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 54, *S. delphini* CIS 55, *S. delphini* CIS 56, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 57, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 58, *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 59 e *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 61 oriundos do ágar Baird-Parker. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante em pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

Vários isolados apresentaram diferença considerável entre os valores de velocidade específica máxima nos sobrenadantes tratados com protease e os não tratados, em pH não neutralizado e em pH neutro (Figuras 2, 3, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16). Este fato é indicativo da presença de substância de natureza protéica, que pode ou não ser uma bacteriocina, no sobrenadante destes isolados. A comparação entre os isolados, calculada pela diferença percentual entre os valores de velocidade específica máxima destes tratamentos para *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Tabela 4), resulta em valores de diferença percentual entre o sobrenadante tratado com protease (SP ou SNP) e o sobrenadante não tratado com protease (S ou SN) acima de 10%, um valor estipulado arbitrariamente para indicar uma possível presença de substância de natureza protéica no sobrenadante. O sobrenadante em pH não neutralizado do isolado *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 29 tratado com protease foi 28,18% mais eficiente na inibição de *L. monocytogenes* e 43,8% mais eficiente na inibição de *S. aureus* do que o respectivo sobrenadante não tratado com protease (Tabela 4). Além deste, os isolados *S. caprae* CIS 45 e *S. arlettae* CIS 46 foram também eficientes na inibição de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, demonstrando a produção de substâncias protéicas, possivelmente bacteriocinas. Em razão desses resultados, podem ser consideradas como boas candidatas para a composição de *starters* com efeito antagonista sobre estes patógenos. Além da vantagem óbvia, bactérias produtoras de bacteriocinas são mais competitivas do que bactérias da mesma espécie não produtoras. Com isso, o uso desses isolados pode melhorar a competitividade da cultura *starter*, levando a uma fermentação mais controlada e padronizada conforme também sugerido por Leroy et al. (2006).

Os valores de pH dos sobrenadantes das culturas dos isolados originados do isolamento em ágar Oxford variaram entre 4,18 e 5,61 (Tabela 5). A acidez produzida por estes microrganismos foi responsável por parte da inibição observada sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Entretanto, a existência de outras substâncias inibidoras nesses sobrenadantes não pode ser desconsiderada, pois a maioria dos isolados manteve sua ação antagonista mesmo quando o pH do sobrenadante foi neutralizado (Figuras 18 a 25).

Tabela 4 – Diferença percentual entre valores de velocidade específica máxima obtidos para *L. monocytogenes* e *S. aureus* cultivados em presença dos sobrenadantes dos cocos Gram-positivos isolados em ágar Baird-Parker tratados com protease e sobrenadantes não tratados com protease

Isolado	Microrganismo	Diferença percentual entre o sobrenadante tratado com protease e o sobrenadante não tratado com protease			
		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. aureus</i>	
		pH normal*	pH neutro	pH normal*	pH neutro
AIS 1	<i>R. dentocariosa</i>	11,03	6,05	13,39	-5,27
AIS 2	<i>R. dentocariosa</i>	9,24	5,59	12,32	2,53
AIS 12	<i>R. dentocariosa</i>	6,86	11,76	9,71	4,89
AIS 13	<i>R. dentocariosa</i>	9,21	11,04	5,83	1,20
AIS 14	<i>S. chromogenes</i>	6,44	8,37	3,78	4,51
AIS 16	<i>S. chromogenes</i>	5,79	4,00	9,89	1,47
AIS 17	<i>R. dentocariosa</i>	1,85	4,84	14,81	2,24
AIS 18	<i>R. dentocariosa</i>	14,89	4,00	2,94	-3,54
AIS 19	<i>R. dentocariosa</i>	7,42	6,05	-11,22	-1,09
AIS 20	<i>R. dentocariosa</i>	17,43	9,76	10,18	1,29
AIS 21	<i>R. dentocariosa</i>	9,50	7,99	9,15	-4,53
BIS 23	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,99	6,38	-1,48	-2,57
BIS 24	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	5,09	6,08	-4,04	-6,24
BIS 25	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	14,81	2,13	23,35	8,11
BIS 26	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	12,24	5,93	22,48	18,65
BIS 27	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,97	2,59	18,29	13,35
BIS 28	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	15,41	8,59	39,78	2,92
BIS 29	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	28,18	4,10	43,80	8,66
BIS 30	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	16,38	6,84	39,47	10,14
BIS 31	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	15,60	2,80	28,58	7,86
BIS 32	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	8,96	5,57	33,97	16,40
BIS 34	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	7,47	6,06	19,84	10,44
BIS 36	<i>S. ayersii</i>	8,02	5,37	12,06	6,23
BIS 37	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	8,04	2,73	18,42	17,45
BIS 38	<i>R. dentocariosa</i>	1,57	-1,22	3,93	-2,21
BIS 39	<i>R. dentocariosa</i>	-0,57	60,08	7,82	-22,08
BIS 41	<i>B. acetylicum</i>	-0,38	58,16	3,46	-11,17
CIS 45	<i>S. caprae</i>	16,93	15,01	28,32	7,18
CIS 46	<i>S. arlettae</i>	18,73	11,32	25,81	3,14
CIS 48	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	7,68	-0,63	12,42	10,19
CIS 49	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-28,31	-3,43	19,05	-2,23
CIS 50	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-2,32	-0,90	13,96	-11,77
CIS 51	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	2,37	-2,18	-4,93	-7,75
CIS 52	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,66	5,69	15,82	9,43
CIS 53	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	13,21	11,14	21,73	-1,48
CIS 54	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	14,01	8,88	26,59	1,22
CIS 55	<i>S. delphini</i>	10,63	8,75	19,74	-1,34
CIS 56	<i>S. delphini</i>	7,83	6,79	15,90	3,17
CIS 57	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	1,53	6,20	31,42	8,95
CIS 58	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	14,30	8,80	18,00	-50,66
CIS 59	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-3,41	6,11	8,13	-23,17
CIS 61	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	1,91	7,62	19,52	-27,62

*pH normal é o pH do sobrenadante não neutralizado (variando de 4,58 a 5,52).

São mostrados em negrito microrganismos que apresentaram valores de diferença percentual acima de 10% entre o sobrenadante tratado com protease e o sobrenadante não tratado com protease sobre *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus*.

Tabela 5 - Valores de pH dos sobrenadantes dos isolados obtidos em ágar Oxford

Isolado	Microrganismo	pH do sobrenadante
AIL 1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5,28
AIL 2	<i>Staphylococcus equorum</i>	5,23
AIL 4	<i>S. equorum</i>	5,26
BIL 6	<i>S. equorum</i>	5,24
BIL 9	<i>Listeria innocua</i>	4,48
BIL 11	<i>Staphylococcus auricularis</i>	5,33
BIL 12	<i>Staphylococcus arlettae</i>	5,32
BIL 13	<i>Staphylococcus xylosus</i>	5,40
BIL 14	<i>S. arlettae</i>	5,29
BIL 20	<i>S. equorum</i>	4,40
BIL 21	<i>Staphylococcus warneri</i>	5,31
CIL 22	<i>S. xylosus</i>	4,20
CIL 23	<i>S. xylosus</i>	4,18
CIL 24	<i>S. arlettae</i>	5,24
CIL 25	<i>S. xylosus</i>	5,31
CIL 28	<i>S. xylosus</i>	5,35
CIL 31	<i>S. xylosus</i>	5,30
CIL 32	<i>S. xylosus</i>	5,36
CIL 33	<i>S. xylosus</i>	5,45
CIL 35	<i>S. xylosus</i>	5,28
CIL 36	<i>S. xylosus</i>	5,61

Os isolados obtidos por isolamento em ágar Oxford foram menos eficientes na inibição de *L. monocytogenes* e *S. aureus* do que os isolados obtidos em ágar Baird-Parker. Contudo, alguns deles como, *S. equorum* AIL 2 (Figuras 18 e 19), *S. equorum* BIL 20 (Figura 19), *S. xylosus* CIL 22 e CIL 23 e *S. arlettae* CIL 24 (Figura 20) podem ser considerados como tendo um bom potencial inibidor sobre *L. monocytogenes*.

O sobrenadante em pH não neutralizado tratado com protease dos isolados CIL 22, CIL 23 e CIL 24 (Figura 20) foi notadamente menos eficiente na inibição de *L. monocytogenes* do que os respectivos sobrenadantes não tratados com protease, ou seja, a protease adicionada degradou a substância responsável por grande parte da inibição exercida sobre *L. monocytogenes*. Estes mesmos isolados quando crescidos em meio com pH neutro não mostraram o mesmo efeito (Figura 21). Este fato foi considerado como indício da presença de uma substância de natureza protéica que exerce o efeito inibidor maior quando em pH ácido.

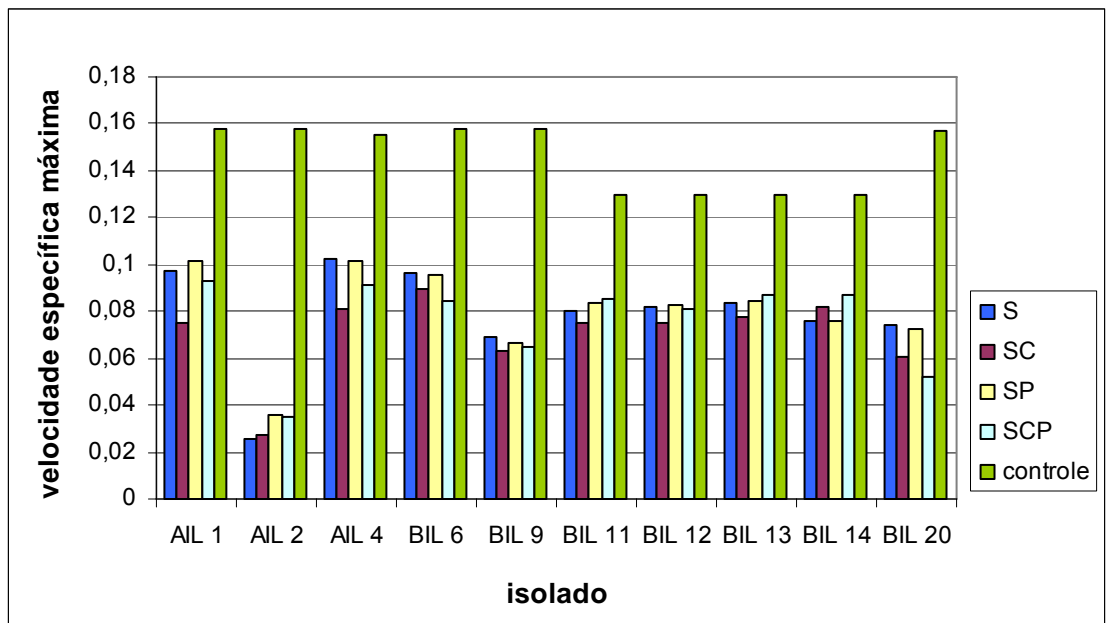


Figura 18 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *S. saprophyticus* AIL 1, *S. equorum* AIL 2, *S. equorum* AIL 4, *S. equorum* BIL 6, *L. innocua* BIL 9, *S. auricularis* BIL 11, *S. arlettae* BIL 12, *S. xylosus* BIL 13, *S. arlettae* BIL 14 e *S. equorum* BIL 20 oriundos do ágar Oxford. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

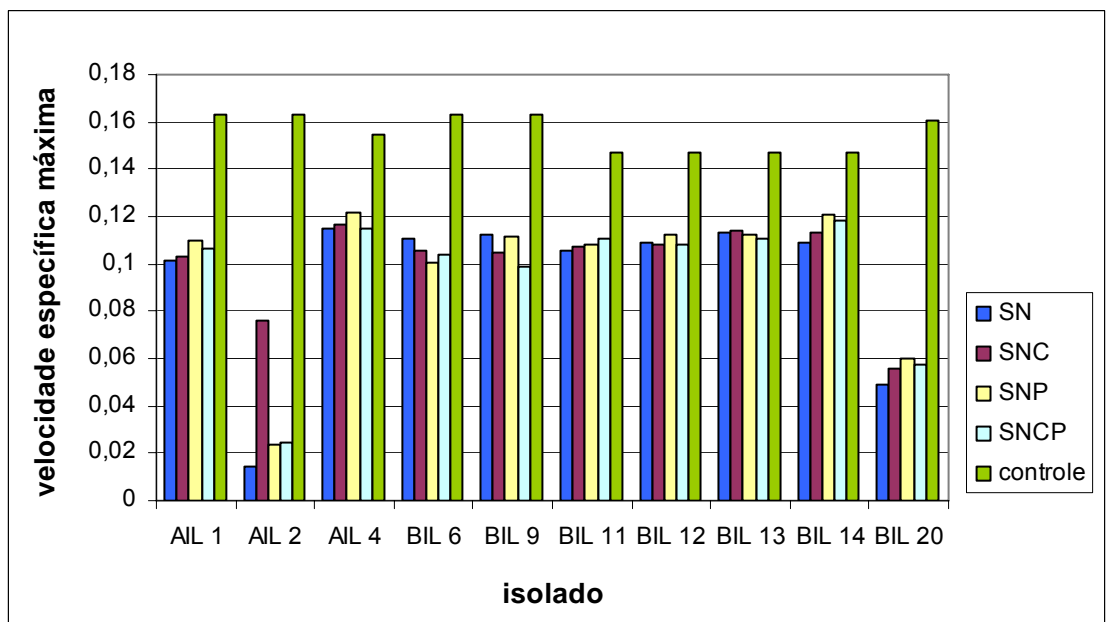


Figura 19 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *S. saprophyticus* AIL 1, *S. equorum* AIL 2, *S. equorum* AIL 4, *S. equorum* BIL 6, *L. innocua* BIL 9, *S. auricularis* BIL 11, *S. arlettae* BIL 12, *S. xylosus* BIL 13, *S. arlettae* BIL 14 e *S. equorum* BIL 20 oriundos do ágar Oxford. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante com pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

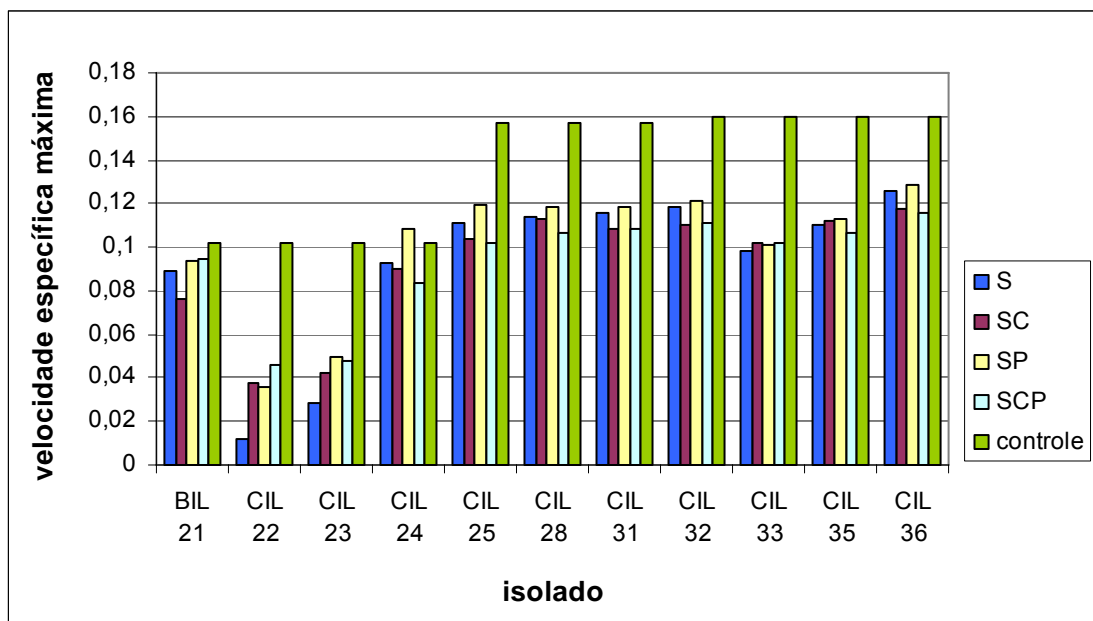


Figura 20 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *S. warneri* BIL 21, *S. xylosus* CIL 22, *S. xylosus* CIL 23, *S. arlettae* CIL 24, *S. xylosus* CIL 25, *S. xylosus* CIL 28, *S. xylosus* CIL 31, *S. xylosus* CIL 32, *S. xylosus* CIL 33, *S. xylosus* CIL 35 e *S. xylosus* CIL 36 oriundos do ágar Oxford. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

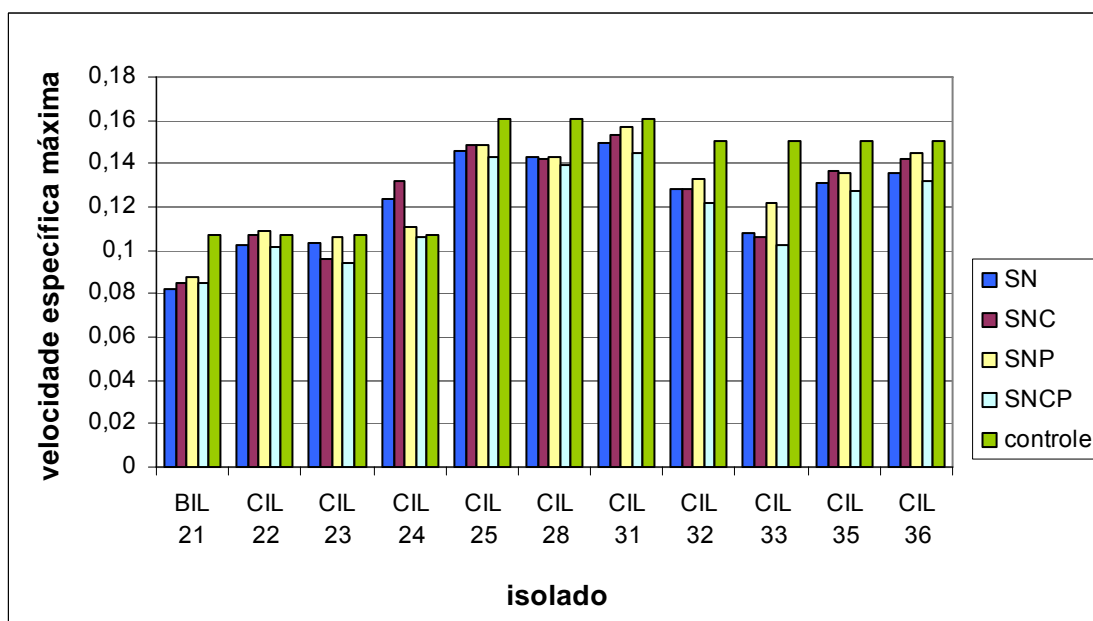


Figura 21 – Velocidade específica máxima de *Listeria monocytogenes* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *S. warneri* BIL 21, *S. xylosus* CIL 22, *S. xylosus* CIL 23, *S. arlettae* CIL 24, *S. xylosus* CIL 25, *S. xylosus* CIL 28, *S. xylosus* CIL 31, *S. xylosus* CIL 32, *S. xylosus* CIL 33, *S. xylosus* CIL 35 e *S. xylosus* CIL 36 oriundos do ágar Oxford. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante com pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

Não foram observadas grandes diferenças no antagonismo exercido sobre *S. aureus* para os cocos Gram-positivos isolados em ágar Oxford quando crescidos em meio contendo os sobrenadantes tratados ou não com protease (Figuras 22 a 25). Apenas nos isolados *S. saprophyticus* AIL 1, *L. innocua* BIL 9 e *S. arlettae* BIL 14 (Figura 22) e *S. warneri* BIL 21 (Figura 25) ocorreram reduções no potencial inibidor quando os sobrenadantes de seus meios de crescimento foram submetidos à ação da protease.

As diferenças percentuais observadas entre os valores de velocidade específica máxima obtidas para *L. monocytogenes* e *S. aureus* cultivados em presença dos sobrenadantes oriundos do crescimento dos isolados, tratados ou não com protease (Tabela 6), de modo geral, mostram que foram poucas as diferenças percentuais que situaram-se acima de 10%. Excetuando-se os isolados *S. equorum* AIL 2, *S. xylosus* CIL 22 e CIL 23, para os quais as diferenças calculadas variaram de 28,6 a 65,9% entre o sobrenadante tratado com protease e o não tratado sobre *L. monocytogenes*. Conclui-se por esses dados tratar-se de bactérias com um potencial promissor em termos de produção de substâncias protéicas para inibição deste patógeno. Vale ressaltar que os isolados CIL 22 e CIL 23 são oriundos de salame artesanal.

Embora a produção de bacteriocinas não seja uma característica encontrada na maioria das estirpes de *Staphylococcus*, ela pode conferir uma vantagem competitiva para a estirpe produtora com relação à captação de nutrientes ao seu redor, ajudando na ocupação de determinados nichos ecológicos (Nascimento et al., 2005). Essa característica é de grande importância especialmente em alimentos como o salame fermentado que é composto por uma enorme variedade de espécies diferentes. Neste caso, o uso de bactérias produtoras de bacteriocinas na formulação de culturas *starter* seria uma forma a mais de garantir o estabelecimento adequado das bactérias desejadas durante a fermentação.

Portanto, ressalta-se mais uma vez a contribuição deste trabalho no sentido de ter isolado bactérias, em sua maioria pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e provenientes de salames artesanais, com características de produção de substância de natureza protéica com atividade inibitória sobre patógenos importantes em embutidos fermentados.

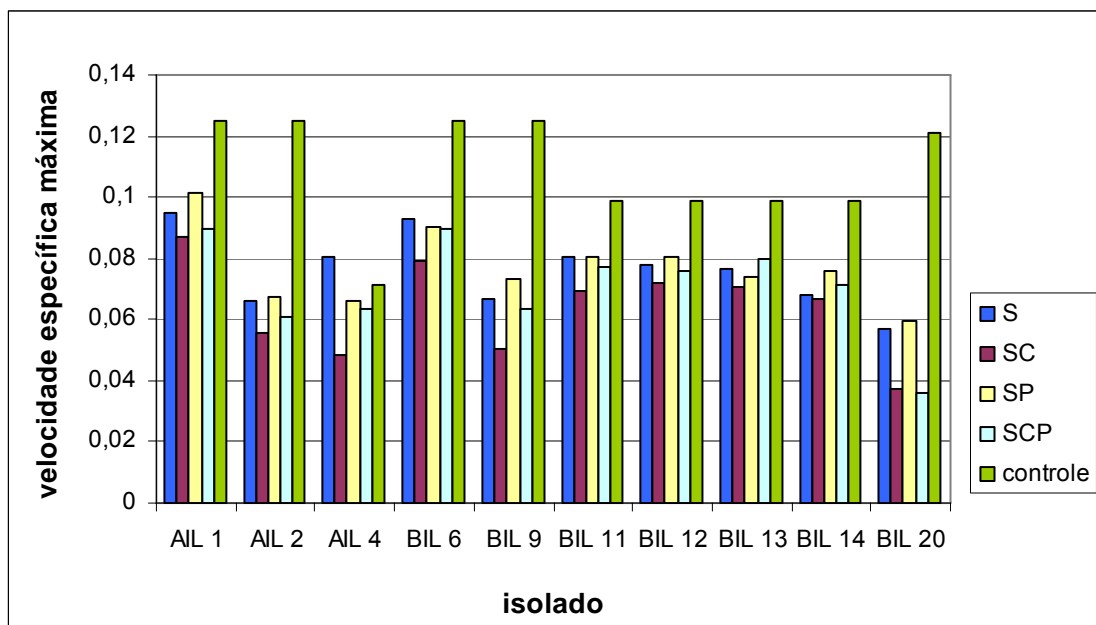


Figura 22 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *S. saprophyticus* AIL 1, *S. equorum* AIL 2, *S. equorum* AIL 4, *S. equorum* BIL 6, *L. innocua* BIL 9, *S. auricularis* BIL 11, *S. arlettae* BIL 12, *S. xylosus* BIL 13, *S. arlettae* BIL 14 e *S. equorum* BIL 20 oriundos do ágar Oxford. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

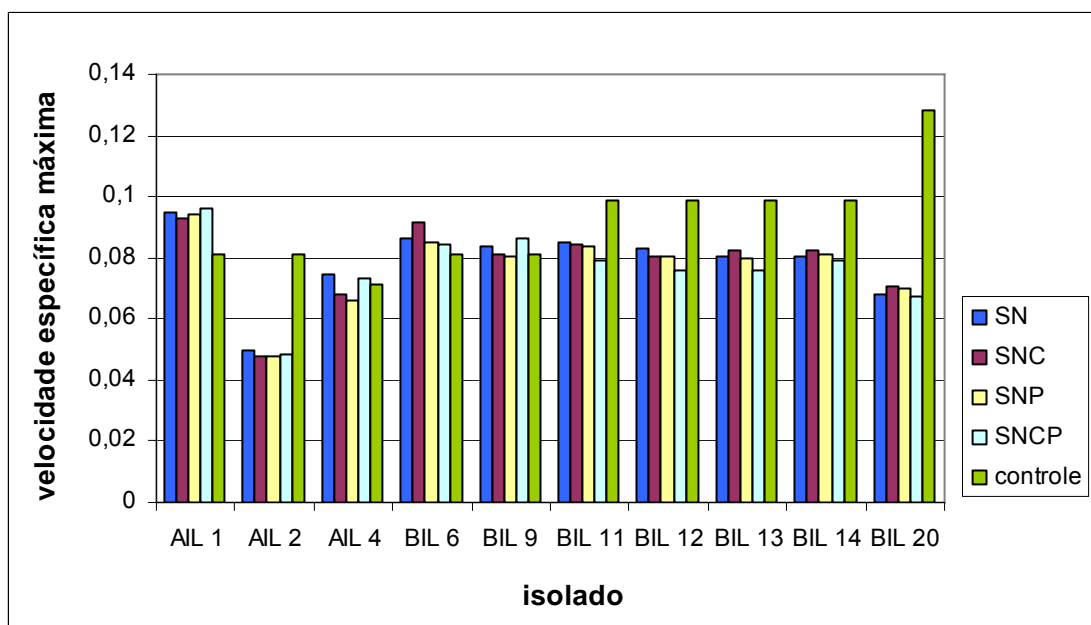


Figura 23 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *S. saprophyticus* AIL 1, *S. equorum* AIL 2, *S. equorum* AIL 4, *S. equorum* BIL 6, *L. innocua* BIL 9, *S. auricularis* BIL 11, *S. arlettae* BIL 12, *S. xylosus* BIL 13, *S. arlettae* BIL 14 e *S. equorum* BIL 20 oriundos do ágar Oxford. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante com pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

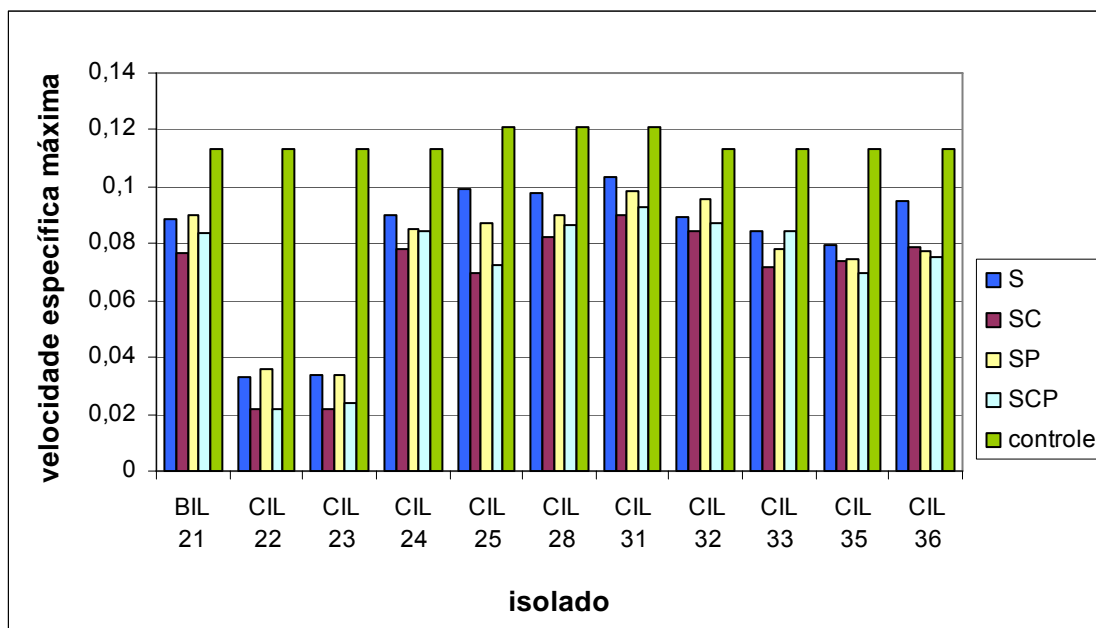


Figura 24 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes dos isolados *S. warneri* BIL 21, *S. xylosus* CIL 22, *S. xylosus* CIL 23, *S. arlettae* CIL 24, *S. xylosus* CIL 25, *S. xylosus* CIL 28, *S. xylosus* CIL 31, *S. xylosus* CIL 32, *S. xylosus* CIL 33, *S. xylosus* CIL 35 e *S. xylosus* CIL 36 oriundos do ágar Oxford. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. S – sobrenadante; SC – S com catalase; SP – S com protease; SCP – S com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

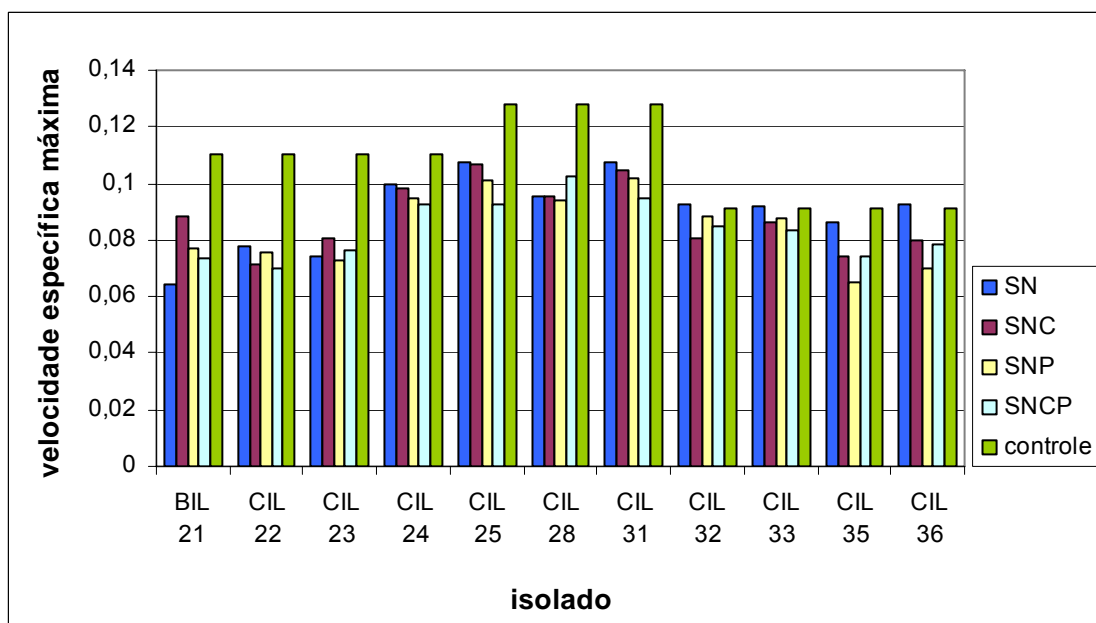


Figura 25 – Velocidade específica máxima de *Staphylococcus aureus* em meio contendo sobrenadantes em pH neutro dos isolados *S. warneri* BIL 21, *S. xylosus* CIL 22, *S. xylosus* CIL 23, *S. arlettae* CIL 24, *S. xylosus* CIL 25, *S. xylosus* CIL 28, *S. xylosus* CIL 31, *S. xylosus* CIL 32, *S. xylosus* CIL 33, *S. xylosus* CIL 35 e *S. xylosus* CIL 36 oriundos do ágar Oxford. Os sobrenadantes tratados foram acrescentados a caldo nutritivo e usados como meio de cultivo. SN – sobrenadante com pH neutro; SNC – SN com catalase; SNP – SN com protease; SNCP – SN com catalase e protease; controle – caldo nutritivo sem acréscimo.

Tabela 6 – Diferença percentual entre valores de velocidade específica máxima obtidos para *L. monocytogenes* e *S. aureus* cultivados em presença dos sobrenadantes dos cocos Gram-positivos isolados em ágar Oxford tratados com protease e sobrenadantes não tratados com protease

Isolado	Microrganismo	Diferença percentual entre o sobrenadante tratado com protease e o sobrenadante não tratado com protease			
		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. aureus</i>	
		pH normal*	pH neutro	pH normal*	pH neutro
AIL 1	<i>S. saprophyticus</i>	4,90	7,51	6,63	-0,72
AIL 2	<i>S. equorum</i>	28,61	40,24	1,95	-3,97
AIL 4	<i>S. equorum</i>	-0,84	5,17	-22,27	-13,56
BIL 6	<i>S. equorum</i>	-0,17	-10,81	-2,87	-1,48
BIL 9	<i>L. innocua</i>	-4,52	-0,76	9,23	-3,91
BIL 11	<i>S. auricularis</i>	3,76	2,50	0,22	-1,30
BIL 12	<i>S. arlettae</i>	1,06	2,90	2,70	-3,10
BIL 13	<i>S. xylosus</i>	1,25	-0,75	3,21	-1,48
BIL 14	<i>S. arlettae</i>	-0,47	9,90	10,44	0,61
BIL 20	<i>S. equorum</i>	-2,35	19,27	4,35	2,96
BIL 21	<i>S. warneri</i>	5,04	7,03	1,20	17,13
CIL 22	<i>S. xylosus</i>	65,90	5,83	7,94	-2,59
CIL 23	<i>S. xylosus</i>	41,58	2,74	-0,49	-1,78
CIL 24	<i>S. arlettae</i>	14,22	-12,25	-5,87	-5,66
CIL 25	<i>S. xylosus</i>	6,28	1,36	-13,79	-6,21
CIL 28	<i>S. xylosus</i>	3,97	0,02	-8,19	-1,33
CIL 31	<i>S. xylosus</i>	2,56	4,69	-4,48	-5,48
CIL 32	<i>S. xylosus</i>	2,39	3,71	6,56	-4,89
CIL 33	<i>S. xylosus</i>	2,44	11,19	-8,91	-5,30
CIL 35	<i>S. xylosus</i>	2,01	3,25	-6,16	-32,96
CIL 36	<i>S. xylosus</i>	1,95	6,24	-22,57	-32,70

*pH normal é o pH do sobrenadante não neutralizado (variando de 4,18 a 5,61).

São mostrados em negrito microrganismos que apresentaram valores de diferença percentual acima de 10% entre o sobrenadante tratado com protease e o sobrenadante não tratado com protease sobre *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus*.

4. CONCLUSÃO

Dos 98 isolados testados pelo teste de difusão em ágar, 88 apresentaram halos de inibição sobre *L. monocytogenes* ou *S. aureus* variando de 0,25 a 5,00 mm sobre pelo menos um microrganismo indicador. Sessenta e três isolados apresentaram halos de inibição $\geq 1,5$ mm sobre *L. monocytogenes* ou *S. aureus*, sendo 49 provenientes dos salames artesanais e 14 provenientes do salame industrial.

Dos 63 isolados testados em meio líquido, 41 apresentaram entre 10 e 66% de redução da atividade inibidora sobre *L. monocytogenes* e/ou *S. aureus* no sobrenadante tratado com protease, indício da presença de

substâncias protéicas inibidoras. Destes, 33 são provenientes dos salames artesanais. Entre os isolados com maiores evidências da produção de bacteriocinas encontram-se estirpes das espécies *S. equorum* (AIL 2 e BIL 20), *S. xylosum* (CIL 22 e CIL 23), *S. warneri* (BIL 21), *S. caprae* (CIS 45), *S. arlettae* (CIS 46) e várias estirpes de *S. capitatus* (BIS 25, BIS 26, BIS 27, BIS 28, BIS 29, BIS 30, BIS 31, BIS 32, BIS 34, BIS 37, CIS 53 e CIS 54). Destes isolados, apenas o AIL 2 é de origem industrial. Mesmo entre isolados de uma mesma espécie houve diversidade quanto à atividade antagonista sobre *L. monocytogenes* ou *S. aureus*. Foram observadas diferenças no perfil antagonista dos isolados em relação às suas origens, isto é, meios em que foram obtidos. De modo geral, os isolados provenientes do ágar Baird-Parker demonstraram maior atividade antagonista do que aqueles provenientes do ágar Oxford.

Foi demonstrado o potencial de diversas estirpes de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano, em sua maioria provenientes de salames artesanais, em inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus in vitro*. O grande número de isolados com atividade inibitória oriundos dos salames artesanais encontrados neste estudo nos permite a composição de diferentes combinações de bactérias para obter um efeito mais pronunciado na inibição de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, com a vantagem de estarem totalmente adaptadas às condições de fermentação do salame. Porém é necessário que esta inibição seja averiguada no salame, pois a produção de substâncias antimicrobianas depende do ambiente onde o microrganismo se encontra e do seu comportamento em relação aos outros microrganismos competidores ali presentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMMOR, S., TAVERON, G., DUFOUR, E. e CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility – screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control, v.17, p.454-461, 2006.

2. BARANYI, J. e ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, v.23, p.277-294, 1994. O programa DMfit 2.0 está disponível em <http://www.ifr.ac.uk/safety/DMFit/>
3. CAPLICE, E., e FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, v.50, p.131-149, 1999.
4. CARNIO, M. C., HÖLTZEL, A., RUDOLF, M., HENLE, T., JUNG, G. e SCHERER, S. The macrocyclic peptide antibiotic micrococcin P₁ is secreted by the food-borne bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66(6), p.2378–2384, 2000.
5. De PAULA, R. A. Atividade inibidora em bactérias lácticas e produção de bacteriocinas. Viçosa, MG: UFV, 2000, 47 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
6. GONZÁLEZ-FANDOS, M. E., SIERRA, M. L., GARCIA-LÓPEZ, M. L., OTERO, A., SANZ, J. e MORENO, B. Staphylococcal growth and enterotoxin production in the presence of meat cultures (non LAB). *Meat Science*, v.43, n.3-4, p.255-263, 1996.
7. JAY, J. M. Do background microorganisms play a role in the safety of fresh foods? *Trends in Food Science and Technology*, v.8, p. 421-424, 1997.
8. LEROY, F., VERLUYTEN, J. e DE VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v.106, p.270-285, 2006.
9. NASCIMENTO, J. S., FAGUNDES, P. C., BRITO, M. A. V. P., SANTOS, K. R. N. e BASTOS, M. C. F. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v.106, p.61-71, 2005.
10. PAPAMANOLI, E., KOTZEKIDOU, P., TZANETAKIS, N. e LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Characterization of micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology*, v.19, p.441-449, 2002.
11. PAPAMANOLI, E., TZANETAKIS, N., LITOPOULOS-TZANETAKI, E. e KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from

- a Greek dry fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, v.65, p.859-867, 2003.
12. SIMONOVÁ, M., STROMPFOVÁ, V., MARCINÁKOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., VESTERLUND, S., MORATALLA, M.L., BOVER-CID, S. e VIDAL-CAROU, C. Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Science*, v.73, p. 559-564, 2006.
 13. SPELHAUG, S. R., HARLANDER, S. K. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Protection*, v.52, n.12, p.856-862, 1989.
 14. TAGG, J. R., DAJANI, A. S. e WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriology Review*, v.40, v.3, p.722-756, 1976.
 15. TRISTÃO, I. H. Bactérias isoladas de salame tipo italiano e sua resistência a antibióticos e a bactérias lácticas. Viçosa, MG, UFV, 1998, 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
 16. VILLANI, F., PEPE, O., MAURIELLO, G., SALZANO, G., MOSCHETTI, G., e COPPOLA, S. Antimicrobial activity of *Staphylococcus xylosus* from Italian sausages against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, v.18, p.159-161, 1994.
 17. VILLANI, F., SANNINO, L., MOSCHETTI, G., MAURIELLO, G., PEPE, O., AMODIO-COCCHIERI, R., e COPPOLA, S. Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosus* 1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages. *Food Microbiology*, v.14, p.555-566, 1997.

CAPÍTULO III

Atividade de nitrato redutase e catalase de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano

RESUMO

A importância de estafilococos coagulase negativos na fermentação de salames é atribuída principalmente a atividade das enzimas liberadas durante o processo de fabricação, a saber: nitrato redutase, responsável pela cor e aroma do produto, e catalase, que atua na prevenção da rancidez e descoloração do salame pela degradação do peróxido de hidrogênio. Neste trabalho, foram avaliadas as atividades de nitrato redutase e catalase em 98 estirpes de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano, na sua maioria estafilococos coagulase negativos, pertencentes às espécies *Staphylococcus xylosus*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. chromogenes*, *S. equorum*, *S. arlettae*, *S. ayersii*, *S. caprae*, *S. warneri*, *S. delphini*, entre outras. Esses isolados foram obtidos a partir de duas marcas de salames artesanais de boa qualidade sensorial e de uma marca de salame industrial, sendo 72 isolados provenientes dos salames artesanais e 26 do salame industrial. Entre os isolados dos salames artesanais foi observado um bom potencial para uso como culturas *starter* devido à atividade de nitrato redutase, pois do total de 72 isolados, 47 foram capazes de reduzir nitrato a nitrito em diferentes intensidades. Todos os 98 isolados apresentaram atividade de catalase em diferentes intensidades, contudo, foram consideradas como boas candidatas à composição de culturas *starter* as estirpes que demonstraram alta atividade de nitrato redutase e catalase, simultaneamente. São elas: seis estirpes de *S. xylosus*, quatro estirpes de *S. arlettae* e uma estirpe de *S. equorum*. Alta atividade de catalase e alta atividade de nitrato redutase, individualmente, foram observadas em 34 e 19 isolados, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

As culturas *starter* preparadas para uso na fabricação de embutidos utilizam *Staphylococcus* coagulase negativos principalmente em razão das enzimas que liberam durante o processamento, a exemplo da nitrato redutase, cuja atividade acelera a formação e estabilização da cor através

da formação de nitrosomioglobina (Mauriello et al., 2004). Além do seu papel no desenvolvimento da coloração adequada, a redução do nitrato é importante para a qualidade do produto, uma vez que previne a formação de sabores indesejáveis (Miralles et al., 1996). O nitrito formado pode limitar a oxidação de lipídeos por mecanismos indiretos, a saber: ligação do grupo heme e prevenção da liberação do ferro catalítico, ligação do ferro não heme com inibição da catálise, e/ou estabilização dos lipídeos olefínicos contra a oxidação (Talon et al., 1999). A importância da atividade de nitrato redutase é tal que ela é considerada como o primeiro critério a ser utilizado na escolha de estirpes de estafilococos coagulase negativos para uso como culturas *starter* (Montel et al., 1996; García-Varona et al., 2000). Vale ressaltar que outras bactérias, além dos estafilococos coagulase negativos, são igualmente importantes na fermentação de salames. Um grupo mais completo, que abrange espécies de *Kocuria* e *Micrococcus*, é o dos cocos Gram-positivos catalase-positivos que participam em reações desejáveis durante a maturação de salames fermentados (Martin et al., 2006).

Para se alcançar as propriedades tecnológicas e sensoriais adequadas em salames fermentados é necessário selecionar estirpes que tenham as características desejadas (Drosinos et al., 2005). As culturas de *Staphylococcus* utilizadas como *starter* na fermentação de salame geralmente se caracterizam por possuir altos níveis de atividade de catalase e nitrato redutase, capacidade para metabolizar lipídeos eficientemente e, também, por suas endo e exopeptidases (Miralles et al., 1996).

A maioria das bactérias lácticas produz peróxido de hidrogênio como produto do metabolismo durante a fermentação do salame. O peróxido de hidrogênio é um forte agente oxidante responsável pela descoloração do pigmento heme nitroso, alterações no aroma, rancidez e redução da vida de prateleira do salame (Hammes e Knauf, 1994; Hugas e Monfort, 1997). A atividade de catalase é de importância por remover o peróxido de hidrogênio, e, assim, prevenir o desenvolvimento de rancidez e alterações na coloração do produto (Coppola et al., 1997; Hammes e Hertel, 1998), a exemplo da demonstrada inibição da oxidação de lipídeos em *S. xylosus* (Barrière et al., 2001).

Neste trabalho foram avaliadas as atividades de nitrato redutase e catalase em cocos Gram-positivos isolados de salame fermentado artesanal de boa qualidade, comparando-as com as atividades destas enzimas em cocos Gram-positivos isolados de salame fermentado industrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Foram utilizadas para os procedimentos de avaliação das atividades de nitrato redutase e catalase, 98 estirpes de cocos Gram-positivos pertencentes à coleção de culturas do laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia. Essas culturas foram originalmente isoladas de duas marcas de salames tipo italiano, processados por fermentação natural, e de uma processada por fermentação industrial. Todas as estirpes de bactérias originaram-se de isolamento em ágar Baird-Parker e ágar Oxford, após procedimento para detecção de bactérias competidoras de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente (Tristão, 1998).

2.2. Atividade de nitrato redutase

A atividade de nitrato redutase das culturas de cocos Gram-positivos foi avaliada com uso da metodologia descrita por Miralles et al. (1996) e Mauriello et al. (2004). Os isolados foram cultivados em 3 mL de caldo nutritivo a 37 °C por 18 horas e centrifugados a 10000 g por 5 minutos em microcentrífuga Beckman Microfuge™ 12. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 estéril. Trinta microlitros desta suspensão foram inoculados em orifícios de 3-4 mm de diâmetro feitos em placas de Petri contendo ágar YT (1% de tripton, 0,5% de extrato de levedura, 0,4% de NaCl, 1,5% de ágar) adicionado de 1 g.L⁻¹ de KNO₃. As placas foram incubadas a 30 °C por 7

horas e, após o período de incubação, foi adicionada uma mistura 1:1 das soluções NIT 1 (0,6 g de N-1-naftiletilenodiamina dihidroclorato em 100 mL de ácido acético 5 N) e NIT 2 (0,8 g de ácido sulfanílico, em 100 mL de ácido acético 5 N). Verificou-se a formação de halos vermelhos de redução de nitrato que foram medidos da borda do orifício até a borda do halo. O experimento foi feito com 3 repetições.

2.3. Atividade de catalase

A atividade de catalase foi determinada pelo método descrito por Mauriello et al. (2004) com modificações. Células originadas de colônias de cada isolado foram cultivadas em 15 mL de caldo nutritivo (peptona 10 g.L⁻¹, glicose 10 g.L⁻¹, NaCl 5 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 2,5 g.L⁻¹, extrato de carne 8 g.L⁻¹, extrato de levedura 4 g.L⁻¹, pH 6,5) a 37 °C por 20 horas e centrifugadas a 10000 g por 5 minutos em centrífuga Sorvall RC 5C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 estéril. Após centrifugação, o sedimento foi ressuspendido em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 e a D.O_{630 nm} foi ajustada para 1,00 em espectrofotômetro Pharmacia Biotech Novaspec® II. Cinco mililitros desta suspensão foram centrifugados a 10000 g por 5 min em microcentrífuga Sorvall MC 12V, Du Pont, e o sedimento foi ressuspendido em 1,5 mL de peróxido de hidrogênio 60 mM em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0. Após 3 minutos de reação à temperatura ambiente, foi feita centrifugação a 10000 g por 4 minutos e imediatamente feita a leitura da A_{240 nm} do sobrenadante em espectrofotômetro Beckman DU® 640. O resultado foi expresso como μmoles de peróxido de hidrogênio consumido.min⁻¹.mL⁻¹ de células com D.O_{630 nm} = 1,0. O experimento foi realizado com 3 repetições.

Para o cálculo da quantidade de H₂O₂ consumido foi construída uma curva padrão com 8 concentrações de H₂O₂ (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mM) no dia da leitura de cada amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade de nitrato redutase

Os isolados que apresentaram reação positiva para redução de nitrato em meio YT adicionado de KNO_3 formaram halos vermelhos nítidos logo após a adição das soluções NIT 1 e NIT 2 (Figura 1). As medidas dos halos (Tabela 1) indicam que as espécies de estafilococos coagulase negativos que apresentaram melhor redução de nitrato foram *S. capitis* subsp. *capitis*, com 96,7% de estirpes positivas, *S. xylosus* com 70% e 100% de *S. chromogenes*. Outros autores constataram resultados similares (Drosinos et al., 2005), ou seja, em 100% de estirpes de *S. capitis* e em 83,3% de estirpes de *S. xylosus* isolados de salame artesanal esta característica encontra-se presente. As espécies que apresentaram menor porcentagem de estirpes positivas para redução de nitrato foram *S. equorum* e *S. warneri*, com 20% cada uma, e *S. arlettae* com 35%. A maioria das estirpes de *S. warneri* não reduz nitrato (Sneath et al., 1986), porém, há relatos de que 16,7% das estirpes de *S. warneri* testadas e 78% das estirpes de *S. equorum*, todas isoladas de salame artesanal, mostraram-se com capacidade de redução de nitrato (Mauriello et al., 2004).

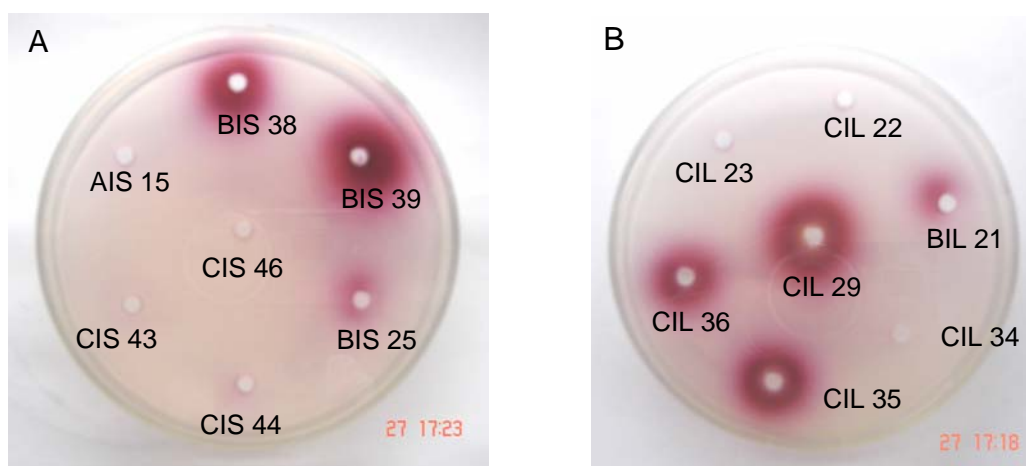


Figura 1 – Resultados do teste de atividade de nitrato redutase para estirpes de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano em ágar Baird-Parker (A) e em ágar Oxford (B).

A grande maioria dos isolados oriundos do ágar Baird-Parker foi capaz de reduzir nitrato a nitrito, porém, com diferenças nas intensidades (Tabela 1). Dos 60 isolados provenientes do ágar Baird-Parker 53 (88,3%) formaram halos de redução de nitrato. Os isolados obtidos em ágar Oxford apresentaram comportamento diferente, pois dos 38 isolados testados, apenas 15 reduziram nitrato, porém com halos, em média, maiores do que os apresentados pelos isolados provenientes do ágar Baird-Parker. A literatura consultada registra trabalhos em que 40% das estirpes de estafilococos coagulase negativos isolados de salames artesanais foram incapazes de reduzir nitrato (Mauriello et al., 2004). Outros autores constataram essa característica em 100% das estirpes de estafilococos coagulase negativos isolados de salame artesanal (Casaburi et al., 2005). A atividade da nitrato redutase de estirpes de bactérias pode também ser avaliada em meio líquido, por método espectrofotométrico, sendo este o recomendado para a detecção de baixa atividade de nitrato redutase (Casaburi et al., 2005). Neste estudo, como o objetivo era a identificação de estirpes com alto potencial para redução de nitrato, optou-se por utilizar o método em ágar.

A média dos diâmetros de halos vermelhos formados por 30 dos 68 isolados variou de 12 a 14,2 mm de diâmetro (Tabela 1). Diâmetros de halos de redução de nitrato formados por estafilococos coagulase negativos, com a utilização da mesma metodologia (Mauriello et al., 2004), resultaram em valores entre 3 e 19 mm, sendo a maioria em torno de 9 a 15 mm.

Os resultados da avaliação da atividade de nitrato redutase demonstram a variabilidade existente entre isolados de uma mesma espécie (Tabela 1). Essa variação foi também relatada anteriormente para estirpes de *S. xylosus* isolados de salames secos (Talon et al., 1999). Sete estirpes de *S. xylosus*, CIL 32, CIL 36, CIL 31, CIL 35, CIL 25, CIL 28 e BIL 13; juntamente com duas estirpes de *S. capitis*, AIS 10 e AIS 11; duas estirpes de *S. chromogenes*, AIS 14 e AIS 16; uma estirpe de *S. equorum*, BIL 6; quatro estirpes de *S. arlettae*, CIL 19, CIL 24, CIL 30 e BIL 14 e uma estirpe de *S. ayersii*, AIS 6, diferiram das demais, pela maior atividade de nitrato redutase (Tabela 1).

Tabela 1 – Diâmetro do halo formado por cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano como resultado do teste da atividade de nitrato redutase

Isolado*	Microrganismo	Halo (mm)**	Comparação***
CIL 32	<i>Staphylococcus xylosus</i>	14,2	a
CIL 36	<i>S. xylosus</i>	14,0	a
BIS 38	<i>Rothia dentocariosa</i>	14,0	a
BIL 6	<i>Staphylococcus equorum</i>	13,8	a
CIL 31	<i>S. xylosus</i>	13,8	a
AIS 14	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	13,8	a
AIS 16	<i>S. chromogenes</i>	13,8	a
CIL 29	<i>Staphylococcus arlettae</i>	13,7	a
AIS 18	<i>R. dentocariosa</i>	13,7	a
BIS 41	<i>Brevibacterium acetylicum</i>	13,7	a
CIL 35	<i>S. xylosus</i>	13,5	a
CIL 25	<i>S. xylosus</i>	13,3	a
CIL 28	<i>S. xylosus</i>	13,3	a
AIS 6	<i>Staphylococcus ayersii</i>	13,0	a
CIL 24	<i>S. arlettae</i>	12,8	a
CIL 30	<i>S. arlettae</i>	12,8	a
AIS 5	<i>R. dentocariosa</i>	12,7	a
AIS 19	<i>R. dentocariosa</i>	12,7	a
AIS 20	<i>R. dentocariosa</i>	12,7	a
BIS 39	<i>R. dentocariosa</i>	12,7	a
AIS 2	<i>R. dentocariosa</i>	12,5	a
AIS 17	<i>R. dentocariosa</i>	12,5	a
BIL 14	<i>S. arlettae</i>	12,3	a
AIS 10	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	12,3	a
AIS 13	<i>R. dentocariosa</i>	12,3	a
BIL 5	não identificado	12,2	a
BIL 13	<i>S. xylosus</i>	12,2	a
AIS 3	<i>R. dentocariosa</i>	12,2	a
AIS 22	<i>S. chromogenes</i>	12,2	a
AIS 11	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	12,0	a
AIS 7	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	11,7	b
AIS 21	<i>R. dentocariosa</i>	11,7	b
AIS 12	<i>R. dentocariosa</i>	11,5	b
BIS 27	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	11,5	b
BIS 30	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	11,5	b
AIS 1	<i>R. dentocariosa</i>	11,3	b
AIS 9	<i>S. arlettae</i>	11,3	b
BIS 37	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	11,2	b
BIL 12	<i>S. arlettae</i>	11,0	b
BIS 42	<i>S. chromogenes</i>	11,0	b
AIS 4	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,8	b
BIS 28	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,7	b
BIS 24	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,3	b
BIS 29	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,3	b
BIS 35	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,2	b
BIS 36	<i>S. ayersii</i>	10,2	b
CIS 51	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,2	b
CIS 59	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,0	b
CIS 50	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	9,5	c
BIS 23	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	9,3	c
CIS 48	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	8,8	c
CIS 58	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	8,8	c
BIS 33	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	8,7	c
AIS 8	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	8,3	c
BIS 31	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	8,3	c
CIS 52	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	8,0	c

BIS 26	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	7,8	c
CIS 45	<i>Staphylococcus caprae</i>	7,7	c
BIS 32	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	7,2	d
BIS 34	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	6,8	d
CIS 53	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	6,8	d
CIS 55	<i>Staphylococcus delphini</i>	6,7	d
CIS 61	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	6,3	d
BIS 25	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	6,2	d
CIS 54	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	6,0	d
CIS 56	<i>S. delphini</i>	5,8	d
BIL 21	<i>Staphylococcus warneri</i>	5,3	d
CIS 57	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	4,7	d

* As letras iniciais dos códigos dos isolados, A, B ou C, representam as origens dos mesmos:

A –salame industrial, B e C – salames artesanais. A 3ª letra, S ou L, representa o meio a partir do qual o isolado foi originalmente obtido: S – ágar Baird-Parker, L – ágar Oxford.

** Tamanho do diâmetro do halo formado, medido da borda do orifício até a borda do halo; média de 3 repetições. A redução do nitrato é evidenciada por halos vermelhos em torno dos orifícios contendo suspensão de células do isolado em tampão fosfato de sódio após 7 horas de incubação a 30 °C e adição de uma mistura das soluções NIT 1 e NIT 2.

*** As médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

As estirpes codificadas com a letra A são as provenientes do salame industrial (marca A), e, por essa razão, é provável que tenham se originado de culturas *starter* selecionadas em função do potencial redutor de nitrato e adicionadas para a fermentação do salame. As demais, oriundas dos salames artesanais (B e C), e que apresentaram halos de redução de nitrato acima de 10,0 mm, foram consideradas como boas candidatas à formação de consórcios para fermentação de salames.

As dez estirpes de *R. dentocariosa* que se destacaram pela atividade de redução de nitrato (Tabela 1), não devem ser consideradas para a formulação de culturas *starter* por não ser esta espécie normalmente associada a produtos alimentícios. Essa bactéria, *R. dentocariosa*, é associada a processos patológicos (Plummer e Schoch, 1995, Binder et al., 1997, Larkin et al., 2001). Registre-se contudo que sete das 10 estirpes aqui referidas tiveram origem no salame industrial e foram incluídas apenas com o objetivo de comparação.

O salame industrial foi o que apresentou maior número de isolados com halos de redução de nitrato acima de 12,0 mm. Porém muitos isolados oriundos dos salames artesanais também demonstraram halos de redução de nitrato acima deste valor, sugerindo que a presença de nitrato na massa cárnea foi possivelmente relevante na seleção de culturas capazes de

reduzi-lo a nitrito, as quais permaneceram no produto final. Esse dado aponta que estes isolados são promissores para a formulação de culturas *starter*.

3.2. Atividade de catalase

Todos os cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano apresentaram atividade de catalase, sendo esta considerada como expressiva para a grande maioria dos isolados (Tabela 2). Outros autores também verificaram atividade de catalase em 100% das estirpes de estafilococos coagulase negativos isoladas de salames fermentados tradicionais (Mauriello et al., 2004; Casaburi et al., 2005). No presente estudo constatou-se a existência de variabilidade nessa característica mesmo entre isolados de uma mesma espécie, um comportamento que é usualmente encontrado para bactérias (Talon et al., 1999, Mauriello et al., 2004).

A maioria dos isolados apresentou atividade de catalase em valores próximos ao valor máximo teórico, ou seja, 30 $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ degradado. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ de células com $\text{D.O}_{630 \text{ nm}} = 1,0$ (Tabela 2). Não foram observadas diferenças marcantes entre os isolados obtidos em ágar Baird-Parker e em ágar Oxford.

Dos 98 isolados testados, 45 apresentaram atividade de catalase acima de 28,32 $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ degradado. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ de células com $\text{D.O}_{630 \text{ nm}} = 1,0$, sendo 32 provenientes dos salames artesanais. Estes isolados representam um grupo com potencial para uso em culturas *starter*, com o objetivo de atuarem na degradação do peróxido de hidrogênio produzido durante o processo de fermentação do salame. O uso de espécies com essa característica de atividade de catalase pode contribuir para a prevenção do surgimento de sabores e odores desagradáveis gerados pela oxidação de lipídeos durante a maturação do salame (Mauriello et al., 2004). Outros 20 isolados apresentaram atividade de catalase com valores entre 26,41 e 28,25 $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ degradado. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ de células com $\text{D.O.} = 1,0$ a 630 nm, podendo também serem aplicados com a mesma finalidade (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade de catalase em cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano

Isolado*	Microrganismo	Atividade de catalase**	Comparação***
BIL 6	<i>Staphylococcus equorum</i>	30,06	a
AIS 15	<i>Staphylococcus caprae</i>	29,84	a
AIL 3	<i>S. equorum</i>	29,81	a
CIL 25	<i>Staphylococcus xylosus</i>	29,70	a
AIS 17	<i>Rothia dentocariosa</i>	29,70	a
AIL 4	<i>S. equorum</i>	29,59	a
BIL 18	<i>Staphylococcus arlettae</i>	29,55	a
CIS 44	<i>S. arlettae</i>	29,43	a
BIL 21	<i>Staphylococcus warneri</i>	29,42	a
AIS 20	<i>R. dentocariosa</i>	29,42	a
BIL 13	<i>S. xylosus</i>	29,39	a
AIS 13	<i>R. dentocariosa</i>	29,37	a
AIS 8	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	29,30	a
CIL 33	<i>S. xylosus</i>	29,29	a
CIL 32	<i>S. xylosus</i>	29,20	a
CIL 24	<i>S. arlettae</i>	29,17	a
CIL 29	<i>S. arlettae</i>	29,15	a
CIL 40	<i>S. warneri</i>	29,14	a
CIL 28	<i>S. xylosus</i>	29,11	a
BIL 5	não identificado	29,11	a
BIL 12	<i>S. arlettae</i>	29,07	a
BIL 17	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	29,05	a
BIS 35	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	29,05	a
BIL 14	<i>S. arlettae</i>	29,04	a
CIL 35	<i>S. xylosus</i>	29,03	a
AIS 21	<i>R. dentocariosa</i>	29,03	a
CIL 36	<i>S. xylosus</i>	29,01	a
AIL 2	<i>S. equorum</i>	28,99	a
AIS 19	<i>R. dentocariosa</i>	28,96	a
CIL 30	<i>S. arlettae</i>	28,95	a
BIS 37	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	28,94	a
AIL 1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	28,84	a
CIS 60	<i>S. arlettae</i>	28,82	a
CIL 34	<i>S. arlettae</i>	28,81	a
BIS 42	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	28,75	a
BIL 16	<i>S. arlettae</i>	28,75	a
AIS 5	<i>R. dentocariosa</i>	28,68	a
BIS 38	<i>R. dentocariosa</i>	28,63	a
BIS 24	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	28,61	a
CIS 46	<i>S. arlettae</i>	28,61	a
CIS 43	<i>S. arlettae</i>	28,57	a
AIS 18	<i>R. dentocariosa</i>	28,52	a
BIS 27	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	28,49	a
BIS 39	<i>R. dentocariosa</i>	28,34	a
CIL 27	<i>S. warneri</i>	28,32	a
BIS 34	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	28,25	b
BIL 15	<i>S. arlettae</i>	28,20	b
BIL 10	<i>S. warneri</i>	28,17	b
AIS 4	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	28,17	b
AIS 9	<i>S. arlettae</i>	28,14	b
BIS 41	<i>Brevibacterium acetylicum</i>	28,11	b
BIS 33	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	27,99	b
AIS 2	<i>R. dentocariosa</i>	27,88	b
BIS 23	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	27,69	b
AIS 1	<i>R. dentocariosa</i>	27,59	b

AIS 22	<i>S. chromogenes</i>	27,43	b
AIS 12	<i>R. dentocariosa</i>	27,26	b
BIS 30	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	27,17	b
AIS 3	<i>R. dentocariosa</i>	27,10	b
AIS 10	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	26,93	b
AIS 6	<i>Staphylococcus ayersii</i>	26,92	b
CIS 55	<i>Staphylococcus delphini</i>	26,79	b
AIS 11	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	26,76	b
AIS 7	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	26,55	b
CIL 39	<i>S. warneri</i>	26,41	b
CIS 45	<i>Staphylococcus caprae</i>	25,56	c
CIS 51	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	25,09	c
CIS 50	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	24,99	c
CIS 58	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	24,61	c
BIS 28	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	24,31	c
CIS 59	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	23,82	d
BIS 25	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	23,57	d
BIS 26	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	23,54	d
BIS 29	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	23,54	d
BIS 32	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	23,24	d
AIS 16	<i>S. chromogenes</i>	22,65	e
AIS 14	<i>S. chromogenes</i>	22,32	e
BIS 31	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	21,70	e
BIL 7	<i>Listeria innocua</i>	21,28	e
BIL 9	<i>L. innocua</i>	21,09	e
BIL 8	<i>L. innocua</i>	21,01	e
CIS 47	<i>S. arlettae</i>	16,15	f
BIS 36	<i>S. ayersii</i>	13,34	g
CIS 54	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	11,13	h
CIS 52	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,52	h
CIS 49	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,22	h
CIS 57	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	10,16	h
CIS 56	<i>S. delphini</i>	9,68	h
CIS 53	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	9,14	i
CIS 48	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	8,82	i
CIS 61	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	8,41	i
CIL 41	<i>S. arlettae</i>	6,83	j
CIL 26	<i>S. arlettae</i>	6,20	j
BIL 11	<i>S. auricularis</i>	5,57	j
CIL 23	<i>S. xylosus</i>	5,50	j
BIL 20	<i>S. equorum</i>	5,43	j
CIL 31	<i>S. xylosus</i>	5,10	j
CIL 22	<i>S. xylosus</i>	4,80	j

* As letras iniciais dos códigos dos isolados, A, B ou C, representam as origens dos mesmos:

A –salame industrial, B e C – salames artesanais. A 3ª letra, S ou L, representa o meio a partir do qual o isolado foi originalmente obtido: S – ágar Baird-Parker, L – ágar Oxford.

** Média de 3 repetições da atividade catalase expressa em $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ degradado $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ de células com D.O. = 1,0 a 630 nm. O consumo de H_2O_2 foi avaliado pela medida da absorvância a 240 nm.

*** As médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Os resultados demonstraram uma grande variação entre os valores de atividade de catalase para isolados de uma mesma espécie, fato que já havia sido observado anteriormente (Mauriello et al., 2004). De modo geral,

as espécies de estafilococos coagulase negativo que apresentaram maiores valores de atividade de catalase foram *Staphylococcus xylosus*, *S. equorum*, *S. arlettae* e *S. warneri*. A eficiência destas espécies na degradação de peróxido de hidrogênio já foi relatada (Mauriello et al., 2004).

Noventa e dois por cento dos isolados oriundos do salame industrial tiveram atividade de catalase acima de 26,41 $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ degradado. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ de células com D.O. = 1,0 a 630 nm. Isso reflete o fato de que as culturas utilizadas na fermentação deste salame possivelmente foram escolhidas com base na sua atividade de catalase, entre outros critérios. Entre os isolados oriundos dos salames artesanais, 57% apresentaram atividade de catalase também acima de 26,41 $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ degradado. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ de células com D.O. = 1,0 a 630 nm. Portanto, foi encontrado um bom número de isolados provenientes dos salames artesanais com potencial para uso em culturas *starter*, principalmente levando-se em conta o fato de que estes microrganismos foram selecionados naturalmente dentro de uma microbiota bastante variada.

4. CONCLUSÃO

A atividade de redução do nitrato apresentou-se variável entre os cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano.

Dos 98 isolados estudados, 68 reduziram nitrato a nitrito em diferentes intensidades, sendo que, destes, 30 apresentaram altos níveis de atividade de nitrato redutase. Entre estes, destacaram-se sete estirpes de *S. xylosus*, CIL 32, CIL 36, CIL 31, CIL 35, CIL 25, CIL 28 e BIL 13; uma estirpe de *S. equorum*, BIL 6 e quatro estirpes de *S. arlettae*, CIL 29, CIL 24, CIL 30 e BIL 14, todas provenientes de salames artesanais.

Em relação à degradação de peróxido de hidrogênio, entre os 98 isolados estudados, 45 apresentaram altos níveis de atividade de catalase, destacando-se sete estirpes de *S. xylosus*, CIL 25, BIL 13, CIL 33, CIL 32, CIL 28, CIL 35 e CIL 36; uma estirpe de *S. equorum*, BIL 6; 12 estirpes de *S. arlettae*, BIL 18, CIS 44, CIL 24, CIL 29, BIL 12, BIL 14, CIL 30, CIS 60, CIL 34, BIL 16, CIS 46 e CIS 43; três estirpes de *S. warneri*, BIL 21, CIL 40 e CIL

27; e quatro estirpes de *S. capitis*, BIS 35, BIS 37, BIS 24, BIS 27, todas provenientes dos salames artesanais.

Os isolados com os melhores resultados para atividade de nitrato redutase e atividade de catalase simultaneamente, seriam, portanto, seis estirpes de *S. xylosus*, CIL 25, CIL 28, CIL 32, CIL 35, CIL 36 e BIL 13; uma estirpe de *S. equorum*, BIL 6; e quatro estirpes de *S. arlettae*, CIL 24, CIL 29, CIL 30 e BIL 14. Estes isolados seriam os melhores candidatos para composição de consórcios de culturas *starter*, mas consideram-se também combinações complementares de isolados. Tudo depende do comportamento dos microrganismos no processo de fermentação e da resposta que eles darão, em associações.

O bom resultado apresentado por estes isolados nos testes *in vitro* para redução de nitrato e degradação de peróxido de hidrogênio permite, numa continuação destes estudos, a composição de diferentes consórcios de culturas com boas perspectivas de uso como culturas *starter* na fermentação de salames.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRIÈRE, C., CENTENO, D., LEBERT, A., LEROY-SÉTRIN, S., BERDAGUÉ, J. L. e TALON, R. Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. FEMS Microbiology Letters, v.201, p.181-185, 2001.
2. BINDER, D., ZBINDEN, R., WIDMER, U., OPRAVIL, M. e KRAUSE, M. Native and prosthetic valve endocarditis caused by *Rothia dentocariosa*: Diagnostic and therapeutic considerations. Infection 25 (1), 22-26, 1997.
3. CASABURI, A., BLAIOTTA, G., MAURIELLO, G., PEPE, O. e VILLANI, F. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. Meat Science, v.71, n.4, p.643-650, 2005.
4. COPPOLA, R., IORIZZO, M., SAOTTA, R., SORRENTINO, E., e GRAZIA, L., Characterization of micrococci and staphylococci isolated

- from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. Food Microbiology, v.14, p.47-53, 1997.
5. DROSINOS, E. H., MATARAGAS, M., XIRAPHI, N., MOSCHONAS, G., GAITIS, F. e METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. Meat Science, v.69, p.307-317, 2005.
 6. GARCÍA-VARONA, M., SANTOS, E. M., JAIME, I., ROVIRA, J. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. International Journal of Food Microbiology, v.54, p.189-195, 2000.
 7. HAMMES, W. P. e KNAUF, H. J. Starters in the processing of meat products. Meat Science, v.36, p.155-168, 1994.
 8. HAMMES, W. P. e HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. Meat Science, v.49, n.suppl.1, p.S125-S138, 1998.
 9. HUGAS, M. e MONFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. Food Chemistry, v.59, n.4, p.547-554, 1997.
 10. LARKIN, J., MONTERO, J., TARGINO, M., POWERS, A., ACCURSO, C. e CAMPBELL, M. *Rothia dentocariosa* Endocarditis. Clinical Microbiology Newsletter 23 (2), 13-15, 2001.
 11. MARTIN, B., GARRIGA, M., HUGAS, M., BOVER-CID, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T. e AYMERICH, T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase positive cocci from slightly fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, v. 107, p.148-158, 2006.
 12. MAURIELLO, G., CASABURI, A., BLAIOTTA, G., VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. Meat Science, v.67, p.149-158, 2004.
 13. MIRALLES, M. C., FLORES, J. e PEREZ-MARTINEZ, G. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. Food Microbiology, v.13, p.227-236, 1996.
 14. MONTEL, M.C., REITZ, J., TALON, R., BERDAGUÉ, J.-L. E ROUSSET-AKRIM, S. Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects

- on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology*, v.13, p.489-499, 1996.
15. PLUMMER, M. e SCHOCH, P. E. *Rothia dentocariosa* bacteremia. *Clinical Microbiology Newsletter* 17 (3), 22-24, 1995.
 16. SNEATH, P. H. A., Editor; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E., Associate editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams e Wilkins, Baltimore, p.1023, 1986.
 17. TALON, R., WALTER, D., CHARTIER, S., BARRIERE, C. e MONTEL, M. C. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, v.52, p.47-56, 1999.
 18. TRISTÃO, I. H. Bactérias isoladas de salame tipo italiano e sua resistência a antibióticos e a bactérias lácticas. Viçosa, MG, UFV, 1998, 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

CAPÍTULO IV

Produção e degradação de aminas biogênicas e presença de genes codificadores de enterotoxinas em cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano

RESUMO

Estafilococos coagulase negativos desempenham importante papel na fermentação de embutidos cárneos, portanto aspectos de segurança como a produção de enterotoxinas e de amins biogênicas devem ser levados em consideração na seleção de estirpes para uso como culturas *starter*. Noventa e oito estirpes de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano foram testadas quanto à presença dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh* e *sej*, codificadores das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEH e SEJ, respectivamente, por reação em cadeia de polimerase (PCR), e quanto à produção e degradação de amins biogênicas, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa. A incidência de genes de enterotoxina estafilocócica encontrada foi baixa, com exceção do gene *see* que foi detectado em 23,5% dos isolados. Quatro isolados apresentaram os genes *seb* e *seh* simultaneamente; dois isolados apresentaram apenas o gene *seh*; e um isolado apresentou o gene *sej*. Os genes *sea*, *sec* e *sed* não foram detectados em nenhum dos 98 isolados. Nove isolados produziram níveis consideráveis, entre 4,19 e 69,78 mg.L⁻¹ de histamina, tiramina, putrescina e/ou cadaverina e um isolado produziu 720,35 mg.L⁻¹ de tiramina. Trinta e nove por cento das estirpes que não mostraram atividade aminoácido descarboxilase sobre tirosina, histidina, ornitina ou lisina, exibiram capacidade de degradar tiramina e histamina. Quatorze estirpes foram capazes de degradar tiramina em níveis acima de 70% e 21 foram capazes de degradar acima de 70% de histamina.

1. INTRODUÇÃO

Aspectos relacionados à segurança alimentar, como produção de enterotoxinas e de amins biogênicas, bem como a capacidade de degradar amins biogênicas, devem ser considerados na seleção de estirpes de cocos Gram-positivos, coagulase negativos, adequadas para uso como culturas *starter*.

Enterotoxinas estafilocócicas são uma família de 9 tipos sorológicos principais de peptídeos termoestáveis causadores de intoxicação alimentar (Balaban e Rasooly, 2000). Os nove principais tipos antigênicos de enterotoxinas estafilocócicas compreendem cinco tipos clássicos, SEA, SEB, SEC, SED e SEE e quatro tipos descritos mais recentemente, SEG, SEH, SEI e SEJ. O tipo SEC é dividido em três subclasses, SEC₁, SEC₂ e SEC₃, de acordo com seus pontos isoelétricos (Rosec e Gigaud, 2002). A enterotoxina estafilocócica mais comumente recuperada em surtos de intoxicação alimentar é SEA, seguida por SED e SEB (Balaban e Rasooly, 2000). A produção de enterotoxinas por estafilococos coagulase negativos isolados de alimentos vem sendo estudada nos últimos dez anos (Rodríguez et al., 1996; Vernozy-Rozand et al., 1996; Rosec et al., 1997; Rosec e Gigaud, 2002; Carmo et al., 2002; Martin et al., 2006).

Estirpes de estafilococos coagulase negativos selecionadas para uso como culturas *starter* devem ser seguras do ponto de vista da produção de enterotoxinas. A ocorrência de genes de enterotoxina em cocos Gram-positivos catalase-positivos isolados de salame fermentado é muito rara (Blaiotta et al., 2004; Martin et al., 2006). Além disso, o gene pode estar presente e não ser expresso. DNAs de várias estirpes de estafilococos coagulase negativos isolados de salame seco hibridizaram com as sondas de DNA para detecção dos genes das enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED, mas essas estirpes não produziram enterotoxina (Rodríguez et al., 1996). Mutações pontuais podem resultar no silenciamento de genes (Okoji et al., 1993). Entretanto, estes genes podem ser reativados por uma nova mutação e serem expressos sob condições apropriadas (Hall et al., 1983). Portanto, não apenas a produção da enterotoxina, mas também a detecção dos seus genes deve ser considerada na seleção de cocos Gram-positivos para uso na fermentação de produtos cárneos (Rodríguez et al., 1996).

As aminas biogênicas estão comumente presentes em organismos vivos, nos quais são responsáveis por várias funções essenciais: promoção do crescimento, atividade metabólica, atuação no sistema imunológico do intestino e no sistema nervoso, controle da pressão sanguínea e eliminação de radicais livres. Porém, se são consumidas em altas quantidades em alimentos, podem ter efeitos tóxicos como dilatação dos vasos sanguíneos,

hipotensão, dor de cabeça, diarreia e vômitos (Silla-Santos, 1996), além de outros mais severos tais como reações pseudo-alérgicas (intoxicação histamínica), enxaquecas e crises hipertensivas (Bover-Cid et al., 2001a). Normalmente, não há perigo para um consumidor saudável cujas monoamino e diamino-oxidases farão o catabolismo dessas aminas biogênicas, promovendo a sua desaminação oxidativa com produção de aldeídos, peróxido de hidrogênio e amônia (Cooper, 1997).

Fatores adicionais potencializam os efeitos toxicológicos das aminas biogênicas. Esses fatores são o álcool e a presença das aminas putrescina e cadaverina, sensibilidade individual, inativação do mecanismo de detoxificação devido a deficiências genéticas, doenças gastrointestinais ou tratamentos com inibidores de monoaminooxidases (Brink et al., 1990; Bover-Cid et al., 2001a).

Bactérias do ácido láctico e enterobactérias são os principais formadores de aminas biogênicas em alimentos, porém cocos Gram-positivos catalase-positivos também têm demonstrado esta capacidade (Martuscelli et al., 2000; Suzzi e Gardini, 2003). É importante evitar estirpes, entre as culturas *starter*, com atividade aminoácido descarboxilases, a fim de reduzir o risco de acúmulo de aminas biogênicas durante o processamento, uma vez que essas bactérias podem atingir números elevados durante a fermentação do salame (Martin et al., 2006). A introdução de estirpes capazes de degradar uma ou mais aminas pode ser uma forma adicional de diminuir a quantidade de aminas biogênicas produzidas no salame (Leuschner e Hammes, 1998; Gardini et al., 2002; Suzzi e Gardini, 2003). Microrganismos que exibem atividade amina oxidase *in vitro* nem sempre reproduzem esta atividade com a mesma intensidade no salame devido às condições mais severas encontradas no produto, em particular, devido à baixa tensão de oxigênio, baixo pH e presença de NaCl. Contudo, já foi observada redução no teor de histamina em salames secos adicionados de culturas *starter* contendo estirpes de *Micrococcus varians* com atividade amina oxidase (Leuschner e Hammes, 1998). As evidências e a importância da degradação de histamina e/ou de tiramina em salames são tais que esta atividade tem sido sugerida como um possível critério para a seleção de

espécies úteis para promover a redução do conteúdo de aminas em salames fermentados (Masson et al., 1996; Martuscelli et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos importantes na segurança alimentar potencialmente relacionados à utilização de cocos Gram-positivos como culturas *starter*. Assim, a presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas e a produção e a degradação de aminas biogênicas foram pesquisadas em bactérias com potencial para uso como culturas *starter* em salame tipo italiano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Foram utilizadas 98 estirpes de cocos Gram-positivos isolados de duas marcas de salames tipo italiano processados por fermentação natural e de uma marca de salame tipo italiano processado por fermentação industrial (Tristão, 1998).

As estirpes de *Staphylococcus aureus* usadas como controle positivo para genes codificadores de enterotoxinas estão descritas na Tabela 1. As estirpes foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Dra. Edna Froeder Arcuri da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. As estirpes 91-2415D, 95-2806 e 92-2221 foram doadas pelo Dr. Jean-Philippe Rosec do Montpellier Laboratoire, Montpellier, França.

Tabela 1 - Estirpes de *Staphylococcus aureus* usadas como controle positivo para presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas

Estirpe	Genótipo
ATCC 13565	<i>sea</i>
91-2415D	<i>seb</i>
5404	<i>sec, sed</i>
ATCC 27664	<i>see</i>
95-2806	<i>seh</i>
92-2221	<i>sej</i>

2.2. Detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas em cocos Gram-positivos isolados de salame italiano

2.2.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi feita segundo Cocolin et al. (2001). Células de uma colônia de cada isolado cultivadas em ágar nutritivo foram ressuspendidas em 200 µL de água milli-Q esterilizada e foram adicionados 12,5 µL de proteinase K (Gibco, BRL) de forma a se obter uma concentração final de 20 mg.mL⁻¹. O DNA foi extraído pela incubação a 65°C por 1,5 hora em banho-maria Cole-Parmer modelo 1095-00 (Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, Illinois, USA) seguida de uma etapa de fervura por 10 minutos. Foi feita centrifugação a 8000 g por 5 minutos, a 4 °C, em microcentrífuga refrigerada Sigma Laborzentrifugen® 2K 15 e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C, para uso posteriormente nas reações de PCR.

2.2.2. Amplificação de segmentos de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas

As preparações de DNA dos 98 isolados foram divididas, de acordo com seus códigos, em 9 grupos de 10 e um grupo de 8 para realização das reações em cadeia de polimerase, PCR (Tabela 2). As reações de amplificação foram feitas tendo como molde 150 ng de DNA que constava de mistura eqüitativa dos DNAs das bactérias de cada grupo. As reações ocorreram em um volume total de 25 µL, contendo 5 µL de tampão Go Taq® (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado, dATP, dCTP, dTTP e dGTP (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 0,4 µM de cada *primer*, uma unidade de Go Taq® DNA Polimerase (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Para o gene *sed* foi usado 0,8 µM de cada *primer*. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas, sintetizados pela Dialab Diagnósticos SA (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) estão

apresentadas na Tabela 3. Os grupos com resultado positivo foram submetidos a reações de PCR para cada estirpe individualmente.

Dois programas foram utilizados para as amplificações em termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc. A amplificação dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* constituiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos seguida de 35 ciclos, sendo cada ciclo composto de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 57 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após o último ciclo, seguiu-se uma etapa de 72 °C por 7 minutos (Martin et al., 2006). A amplificação dos genes *seh* e *sej* ocorreu com uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos seguida de 30 ciclos, sendo cada ciclo composto de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Após o último ciclo, seguiu-se uma etapa de 72 °C por 5 minutos (Rosec e Gigaud, 2002).

As amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1,2% com tampão TEB 1X, constituído de 0,09 M de Tris-borato e 0,002 M de EDTA. O tempo de corrida foi de aproximadamente 2 horas a 50 volts. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídio. As imagens das bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e capturadas com o Eagle Eye™ II, Stratagene. Os resultados foram registrados como presença ou ausência de bandas correspondentes a DNA do tamanho esperado.

Tabela 2 – Agrupamento dos cocos Gram-positivos isolados de salame italiano para as reações de amplificação de DNA

Agrupamento	Isolados
Grupo 1*	AIS 1 (<i>R. dentocariosa</i>), AIS 2 (<i>R. dentocariosa</i>), AIS 3 (<i>R. dentocariosa</i>), AIS 4 (<i>S. capitis ss capitis</i>), AIS 5 (<i>R. dentocariosa</i>), AIS 6 (<i>S. ayersii</i>), AIS 7 (<i>S. capitis ss capitis</i>), AIS 8 (<i>S. capitis ss capitis</i>), AIS 9 (<i>S. arlettae</i>) e AIS 10 (<i>S. capitis ss capitis</i>)
Grupo 2	AIS 11 (<i>S. capitis ss capitis</i>), AIS 12 (<i>R. dentocariosa</i>), AIS 13 (<i>R. dentocariosa</i>), AIS 14 (<i>S. chromogenes</i>), AIS 15 (<i>S. caprae</i>), AIS 16 (<i>S. chromogenes</i>), AIS 17 (<i>R. dentocariosa</i>), AIS 18 (<i>R. dentocariosa</i>), AIS 19 (<i>R. dentocariosa</i>) e AIS 20 (<i>R. dentocariosa</i>)
Grupo 3	AIS 21 (<i>Rothia dentocariosa</i>), AIS 22 (<i>Staphylococcus chromogenes</i>), BIS 23 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 24 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 25 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 26 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 27 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 28 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 29 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 30 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>)
Grupo 4	BIS 31 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 32 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 33 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 34 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 35 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 36 (<i>Staphylococcus ayersii</i>), BIS 37 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), BIS 38 (<i>Rothia dentocariosa</i>), BIS 39 (<i>Rothia dentocariosa</i>), BIS 41 (<i>Brevibacterium acetylicum</i>)
Grupo 5	BIS 42 (<i>Staphylococcus chromogenes</i>), CIS 43 (<i>S. arlettae</i>), CIS 44 (<i>S. arlettae</i>), CIS 45 (<i>Staphylococcus caprae</i>), CIS 46 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), CIS 47 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), CIS 48 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), CIS 49 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), CIS 50 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), CIS 51 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>)
Grupo 6	CIS 52 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), CIS 53 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), CIS 54 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), CIS 55 (<i>Staphylococcus delphini</i>), CIS 56 (<i>Staphylococcus delphini</i>), CIS 57 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), CIS 58 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), CIS 59 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>), CIS 60 (<i>S. arlettae</i>), CIS 61 (<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>)
Grupo 7	AIL 1 (<i>Staphylococcus saprophyticus</i>), AIL 2 (<i>Staphylococcus equorum</i>), AIL 3 (<i>Staphylococcus equorum</i>), AIL 4 (<i>Staphylococcus equorum</i>), BIL 5 (não identificado), BIL 6 (<i>Staphylococcus equorum</i>), BIL 7 (<i>L. innocua</i>), BIL 8 (<i>L. innocua</i>), BIL 9 (<i>L. innocua</i>), BIL 10 (<i>Staphylococcus warneri</i>)
Grupo 8	BIL 11 (<i>Staphylococcus auricularis</i>), BIL 12 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), BIL 13 (<i>Staphylococcus xylosus</i>), BIL 14 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), BIL 15 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), BIL 16 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), BIL 17 (<i>Staphylococcus haemolyticus</i>), BIL 18 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), BIL 20 (<i>Staphylococcus equorum</i>), BIL 21 (<i>Staphylococcus warneri</i>)
Grupo 9	CIL 22 (<i>Staphylococcus xylosus</i>), CIL 23 (<i>Staphylococcus xylosus</i>), CIL 24 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), CIL 25 (<i>Staphylococcus xylosus</i>), CIL 26 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), CIL 27 (<i>Staphylococcus warneri</i>), CIL 28 (<i>Staphylococcus xylosus</i>), CIL 29 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), CIL 30 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), CIL 31 (<i>Staphylococcus xylosus</i>)
Grupo 10	CIL 32 (<i>Staphylococcus xylosus</i>), CIL 33 (<i>Staphylococcus xylosus</i>), CIL 34 (<i>Staphylococcus arlettae</i>), CIL 35 (<i>Staphylococcus xylosus</i>), CIL 36 (<i>Staphylococcus xylosus</i>), CIL 39 (<i>Staphylococcus warneri</i>), CIL 40 (<i>Staphylococcus warneri</i>), CIL 41 (<i>Staphylococcus arlettae</i>)

* Os microrganismos dos grupos 1 a 6 foram isolados em ágar Baird-Parker e os microrganismos dos grupos 7 a 10 foram isolados em ágar Oxford.

Tabela 3 - Seqüências dos oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação de DNA dos genes para as enterotoxinas A, B, C, D, E, H e J

Gene alvo	Primer	Seqüência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>sea</i>	sea 1	ggttatcaatgtgcgggtgg	102	Martin et al., 2006 apud Mehrotra et al., 2000
	sea 2	cggcactttttctctcgg		
<i>seb</i>	seb 1	gtatgggtgtaactgagc	164	Martin et al., 2006 apud Mehrotra et al., 2000
	seb 2	ccaaatagtgacgagtagg		
<i>sec</i>	sec 1	agatgaagtagttgatgtatgg	451	Martin et al., 2006 apud Mehrotra et al., 2000
	sec 2	cacacttttagaatcaaccg		
<i>sed</i>	sed 1	ccaataataggagaaaataaaag	278	Martin et al., 2006 apud Mehrotra et al., 2000
	sed 2	attggtatttttctggtc		
<i>see</i>	see 1	aggtttttcacaggtcatcc	209	Martin et al., 2006 apud Mehrotra et al., 2000
	see 2	cttttttcttcggtcaatc		
<i>seh</i>	seh 1	tcacatcatatgcgaaagcag	357	Rosec e Gigaud, 2002 apud Ren et al., 1994
	seh 2	tagaccaatcaccctttcc		
<i>sej</i>	sej 1	cagcgatagcaaaaatgaaaca	426	Rosec e Gigaud, 2002 apud Zhang et al., 1998
	sej 2	tctagcggacaacagttctga		

2.3. Formação e degradação de aminas biogênicas por cocos Gram-positivos isolados de salame italiano

2.3.1. Produção de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina

A produção de aminas foi analisada em células oriundas de colônias de cada isolado que foram cultivadas três vezes consecutivas em 3 mL de caldo nutritivo (peptona 10 g.L⁻¹, glicose 10 g.L⁻¹, NaCl 5 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 2,5 g.L⁻¹, extrato de carne 8 g.L⁻¹, extrato de levedura 4 g.L⁻¹, pH 6,5) contendo 0,1% de sal dissódico de tirosina (Sigma), 0,1% de monohidrocloreto de histidina (Merck), 0,1% de monohidrocloreto de ornitina (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro), 0,1% de monohidrocloreto de lisina (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro), e 0,005% de piridoxal-5-fosfato e incubados a 37 °C por 24 horas conforme metodologia descrita por Bover Cid et al. (1999). A partir do 3º pré-cultivo foram feitos inóculos de 0,1% em 5 mL de caldo descarboxilase (Bover Cid et al., 1999), contendo 0,5% de tirosina e 0,25% de histidina, ornitina e lisina e incubado a 37 °C por 4 dias. Dois mililitros da cultura cultivada foram centrifugados a 12000 g por 5 minutos em microcentrífuga Sorvall MC 12V, Du Pont, e o sobrenadante foi coletado e

adicionado de 2 mL de HCl 0,1 N. Foi feita nova centrifugação a 12000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado e congelado a -20 °C em tubos plásticos.

A análise das aminas foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa por pareamento de íons, conforme metodologia de Santos et al. (2003). As amostras foram filtradas em membrana Schleicher & Schuell, com poros de 0,45 µm de diâmetro, antes da injeção no cromatógrafo. Foi utilizado equipamento da marca Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo LC – 10 AD, com câmara de mistura a alta pressão; conjunto de lavagem automática de pistão; injetor automático Shimadzu modelo SIL-10 AD VP, coluna de fase reversa (3,9 x 300 mm, 10 µm) e pré-coluna µBondapack C₁₈ (Waters, Milford, MA, EUA); detector espectrofluorimétrico Shimadzu modelo RF-551 a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão; uma unidade de controle CBM-10AD ligada a um microcomputador. As fases móveis utilizadas foram compostas de A: solução tampão acetato de sódio 0,2 M contendo octanosulfonato de sódio 10 mM, pH ajustado para 4,9 com ácido acético glacial; e B: acetonitrila, num fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e gradiente – tempo (min)/%B: 0,01/8; 8/8; 12/8; 20/22; 32/10; 40/10; 46/10 e 55/8.

Para a derivação pós-coluna, um tubo de teflon, protegido da luz, de 2,0 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, foi conectado entre a câmara de mistura e o detector. Uma bomba LC-10AD (Shimadzu, Kyoto, Japão) bombeou a solução derivante à câmara de mistura a um fluxo de 0,4 mL.min⁻¹. A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25,0 g de ácido bórico e 22,0 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água grau cromatográfico, pH ajustado a 10,5-11,0 com hidróxido de potássio, filtrada em membrana HAWP de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de diâmetro do poro. Foram adicionados a esta solução 1,5 mL de Brij-35 e 1,5 mL de 2-mercaptoetanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 0,2 g de o-ftalaldeído (Sigma, St Louis, MO, EUA) dissolvido em 3,0 mL de metanol grau cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemanha) (Santos et al., 2003). Esta solução foi preparada diariamente e mantida ao abrigo da luz.

As aminas foram identificadas por comparação dos tempos de retenção entre as amostras e os padrões. A confirmação foi feita pela adição de solução padrão contendo a amina suspeita à amostra. O conteúdo de aminas foi calculado através de curva padrão da solução padrão contendo 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 7,0 e 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de aminas bioativas, obtidas por equações de regressão linear (Tabela 4).

Tabela 4 – Equações das retas e coeficientes de regressão para a determinação de aminas bioativas

Amina	Equação da reta	R²
Putrescina	$y = 262134x + 27602$	0,9684
Cadaverina	$y = 219639x + 6654,9$	0,9781
Tiramina	$y = 113696x + 7273,8$	0,9633
Histamina	$y = 162034x + 8914,1$	0,9711

R² = Coeficiente de regressão.

2.3.2. Degradação de histamina e tiramina

A degradação de histamina e tiramina foi medida de acordo com Leuschner et al. (1998). Células de colônias de cada isolado foram cultivadas em 3 mL de caldo nutritivo a 37 °C por 18 horas e, a partir deste pré-cultivo, foram transferidas 0,6 mL para 30 mL de caldo nutritivo contendo 0,01% de glicose. Após incubação a 30 °C por 18 horas, sob agitação a 200 rpm (Incubator Shaker Series 25D, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA), foi feita centrifugação a 10000 g por 10 minutos em microcentrífuga Sorvall MC 12V, Du Pont, e o sedimento foi lavado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 esterilizado. Após nova centrifugação, o sedimento foi ressuscitado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 contendo 1,63 mM de histamina (Sigma) e 3,46 mM de tiramina (Sigma) e a D.O_{630nm} foi ajustada para 5 em espectrofotômetro Pharmacia Biotech Novaspec® II. Cinco mililitros dessa suspensão foram incubados a 30 °C sob agitação rotativa a 200 rpm por 48 horas. Após incubação, 3 mL foram transferidos para tubos contendo 3 mL de HCl 1 M e fervidos por 10 minutos. Após resfriamento, uma alíquota de 5 mL foi centrifugada a 10000 g

por 5 minutos em microcentrífuga Sorvall MC 12V, Du Pont e o sobrenadante foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tubos plásticos até o momento da análise feita por HPLC como já foi descrito.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas em cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano

O resultado da amplificação dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh* e *sej* codificadores de enterotoxinas, nos agrupamentos dos cocos Gram-positivos isolados de salame italiano está apresentado na Tabela 5. Os grupos com resultados positivos tiveram seus componentes testados individualmente para identificação dos isolados contendo genes de enterotoxina. Não foram detectados genes de enterotoxina SEA, SEC e SED em nenhum dos 10 grupos, portanto conclui-se que nenhum dos 98 isolados produziu estas toxinas.

A incidência de genes de enterotoxina entre os cocos Gram-positivos isolados de salame italiano foi baixa (tabelas 6 e 7). De modo geral, a frequência de genes de enterotoxina em estafilococos coagulase negativos é muito baixa. Os resultados aqui relatados são coerentes com os de Rosec e Gigaud (2002) em um estudo com 74 isolados de estafilococos coagulase negativos oriundos de diversos tipos de alimentos em que não houve produção das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI ou SEJ e tampouco foram encontrados os seus respectivos genes. Em outro estudo foram encontradas oito estirpes, entre 240 cocos Gram-positivos catalase positivos isolados de salame fermentado, que continham o gene *sec*; os outros genes de enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sed* e *see*) não foram detectados (Martin et al., 2006).

Tabela 5 – Presença de genes de enterotoxina nos agrupamentos de cocos Gram-positivos isolados de salame italiano

Grupo	Genes de enterotoxinas						
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seh</i>	<i>sej</i>
1	-	-	-	-	-	+	-
2	-	+	-	-	-	+	-
3	-	+	-	-	-	+	-
4	-	-	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	-	+	-	-
9	-	-	-	-	+	-	-
10	-	-	-	-	+	-	-

Agrupamento dos isolados: grupo 1 - AIS 1 até AIS 10; grupo 2 – AIS 11 até AIS 20; grupo 3 – AIS 21 até BIS 30; grupo 4 – BIS 31 até BIS 40; grupo 5 – BIS 42 até CIS 51; grupo 6 – CIS 52 até CIS 61; grupo 7 – AIL 1 até BIL 10; grupo 8 – BIL 11 até BIL 21; grupo 9 – CIL 22 até CIL 31 e grupo 10 – CIL 32 até CIL 41.

Entre os isolados obtidos em ágar Baird-Parker (Tabela 6), quatro, identificados como *Rothia dentocariosa*, apresentaram o gene *seb*. Estes mesmos isolados e mais outras duas estirpes de *R. dentocariosa* apresentaram o gene *seh*; apenas um *S. capitis* subsp. *capitis* entre 46 estirpes de estafilococos coagulase negativos, demonstrou presença do gene *sej*. *R. dentocariosa* é um microrganismo normalmente encontrado na cavidade oral humana, onde é parte da microbiota normal. É considerado um patógeno oportunista (Sneath et al., 1986) sendo associado à endocardite (Binder et al., 1997; Larkin et al., 2001) e bacteremia (Plummer e Schoch, 1995), e foi recentemente reclassificado como membro da família *Micrococcaceae* (Stackebrandt et al., 1997). É um microrganismo de identificação difícil, muitas vezes sendo confundido com espécies de estafilococos coagulase negativos (Graevenitz, 2004). Não foi encontrada na literatura nenhuma referência sobre sua associação com alimentos.

Dos sete isolados obtidos em ágar Baird-Parker com resultado positivo para um ou mais genes de enterotoxina, quatro apresentaram simultaneamente os genes *seb* e *seh*, fato que parece ser bastante comum. Trinta e três estirpes de *S. aureus* (46,5%) isoladas de pessoas acometidas por intoxicação alimentar mostraram a presença conjunta desses genes (Omoe et al., 2002). Apenas um isolado (BIS 37) dentre sete com resultado positivo para uma ou mais enterotoxinas é oriundo de salame artesanal

(Tabela 6). No entanto, a existência de genes de enterotoxina num microrganismo não é prova suficiente de que ele seja capaz de produzir essas toxinas (Rodriguez et al., 1996).

Tabela 6 – Presença de genes de enterotoxina entre os cocos Gram-positivos isolados de salame italiano em ágar Baird-Parker

Isolado	Microrganismo	Genes de enterotoxina		
		<i>seb</i>	<i>seh</i>	<i>sej</i>
AIS 1	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	+	-
AIS 2	<i>R. dentocariosa</i>	-	+	-
AIS 12	<i>R. dentocariosa</i>	+	+	-
AIS 13	<i>R. dentocariosa</i>	+	+	-
AIS 17	<i>R. dentocariosa</i>	+	+	-
AIS 21	<i>R. dentocariosa</i>	+	+	-
BIS 37	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-	+

Entre os cocos Gram-positivos obtidos em ágar Oxford (Tabela 7) o único gene de enterotoxina detectado foi o *see*, que ocorreu em 60,5% dos isolados desse grupo, uma frequência bastante elevada. Em relação ao total de isolados testados, 98, a frequência cai para 23,5%. Dos 23 isolados positivos para o gene *see*, oito são *S. arlettae*, sete são *S. xylosus*, três são *S. warneri*, um *S. equorum* e um *S. saprophyticus*. Num estudo sobre a produção de enterotoxinas clássicas, SEA, SEB, SEC, SED e SEE, a única enterotoxina detectada e cuja presença do gene foi confirmada por *Southern blot*, foi SEE que foi produzida por 10 estirpes (*S. xylosus*, *S. equorum*, *S. capitis*, *S. lentus* e *S. simulans*) num total de 187 estafilococos coagulase negativos isolados de queijo e leite de cabra (Vernozy-Rozand et al., 1996).

Resultados positivos da reação em cadeia de polimerase apenas confirmam a existência de genes de enterotoxina nos isolados, sem os quais estas estirpes seriam incapazes de causar intoxicação alimentar. Porém é questionável se todas as estirpes contendo genes de enterotoxina, especialmente os genes não clássicos, poderiam causar intoxicação alimentar ou outras doenças. Para estabelecer esta relação causal é importante demonstrar a produção da toxina em níveis suficientes para causar doenças por estirpes que contenham os genes de enterotoxina. Além disso, é necessário verificar a produção da enterotoxina *in situ*, pois estirpes que produzem enterotoxinas em meios de cultura em níveis de $\mu\text{g.mL}^{-1}$ normalmente produzem apenas ng.mL^{-1} em alimentos (Omoe et al., 2002).

Tabela 7 – Presença de genes de enterotoxina SEE entre os cocos Gram-positivos isolados de salame italiano em ágar Oxford

Isolado	Microrganismo	see
AIL 1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+
BIL 6	<i>Staphylococcus equorum</i>	+
BIL 7	<i>Listeria innocua</i>	+
BIL 8	<i>L. innocua</i>	+
BIL 9	<i>L. innocua</i>	+
BIL 10	<i>Staphylococcus warneri</i>	+
BIL 12	<i>Staphylococcus arlettae</i>	+
BIL 13	<i>Staphylococcus xylosus</i>	+
BIL 14	<i>S. arlettae</i>	+
BIL 15	<i>S. arlettae</i>	+
BIL 16	<i>S. arlettae</i>	+
BIL 21	<i>S. warneri</i>	+
CIL 25	<i>S. xylosus</i>	+
CIL 26	<i>S. arlettae</i>	+
CIL 27	<i>S. warneri</i>	+
CIL 29	<i>S. arlettae</i>	+
CIL 30	<i>S. arlettae</i>	+
CIL 31	<i>S. xylosus</i>	+
CIL 32	<i>S. xylosus</i>	+
CIL 33	<i>S. xylosus</i>	+
CIL 34	<i>S. arlettae</i>	+
CIL 35	<i>S. xylosus</i>	+
CIL 36	<i>Staphylococcus xylosus</i>	+

3.2. Formação e degradação de aminas biogênicas por cocos Gram-positivos isolados de salame italiano

3.2.1 Produção de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina

Noventa e oito cocos Gram-positivos isolados de salame italiano foram testados quanto a sua capacidade de produzir histamina, tiramina, putrescina e cadaverina. Dos 60 que foram isolados a partir de ágar Baird-Parker, somente 16 produziram pelo menos uma das quatro aminas pesquisadas em níveis superiores a 1 mg.L⁻¹ (Tabela 8), sendo que, destes, apenas os isolados *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 30 e *S. chromogenes* AIS 22 produziram tiramina em níveis relevantes, de 7,31 e 2,96 mg.L⁻¹, respectivamente, e *S. ayersii* BIS 36 produziu 6,25 mg.L⁻¹ de histamina.

Tabela 8 – Produção de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina por cocos Gram-positivos isolados de salame italiano em ágar Baird-Parker

Estirpe	Teores (mg.L ⁻¹)			
	putrescina	cadaverina	tiramina	histamina
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>				
AIS 4	1,30*	1,11	1,58	1,04
AIS 7	0,70	nd	1,13	nd
AIS 8	0,27	0,57	0,87	1,10
AIS 10	0,21	0,88	0,44	0,73
AIS 11	nd	0,67	0,63	nd
BIS 23	0,03	0,10	0,77	0,06
BIS 24	0,06	0,10	0,63	0,11
BIS 25	0,02	0,11	0,76	0,10
BIS 26	0,02	0,20	0,37	0,35
BIS 27	0,04	0,17	0,27	0,17
BIS 28	0,02	0,13	0,90	0,62
BIS 29	0,01	0,12	0,81	0,49
BIS 30	0,07	0,38	7,31	0,87
BIS 31	0,16	0,21	1,17	0,19
BIS 32	0,32	0,19	1,25	0,12
BIS 33	0,63	0,11	1,36	0,05
BIS 34	0,05	0,12	1,12	nd
BIS 35	0,50	0,23	1,97	nd
BIS 37	nd	0,00	1,40	nd
CIS 48	nd	0,15	0,03	0,48
CIS 49	0,05	0,28	nd	0,38
CIS 50	0,03	0,25	nd	0,29
CIS 51	0,05	0,19	0,34	0,25
CIS 52	0,04	0,00	0,72	0,24
CIS 53	0,03	0,06	0,84	0,39
CIS 54	nd	0,41	nd	0,69
CIS 57	nd	0,35	nd	0,45
CIS 58	nd	0,27	nd	0,69
CIS 59	nd	0,29	nd	0,66
CIS 61	nd	0,29	nd	0,44
<i>Staphylococcus arlettae</i>				
AIS 9	0,20	0,91	0,74	0,91
CIS 43	0,21	0,20	0,57	nd
CIS 44	0,48	0,39	1,19	0,09
CIS 46	nd	0,26	nd	0,54
CIS 47	nd	0,22	0,44	0,71
CIS 60	0,15	0,39	nd	0,79
<i>Staphylococcus chromogenes</i>				
AIS 14	nd	0,37	0,07	nd
AIS 16	0,13	0,17	0,32	0,31
AIS 22	0,73	0,11	2,96	0,80
BIS 42	nd	0,11	0,49	0,40
<i>Staphylococcus caprae</i>				
AIS 15	nd	0,40	nd	nd
CIS 45	nd	nd	0,59	nd
<i>Staphylococcus ayersii</i>				
AIS 6	1,27	nd	1,43	nd
BIS 36	0,05	0,20	1,07	6,25
<i>Staphylococcus delphini</i>				
CIS 55	nd	0,50	nd	0,75
CIS 56	0,07	0,35	nd	0,56

<i>Rothia dentocariosa</i>				
AIS 1	nd	0,67	nd	nd
AIS 2	nd	0,30	1,11	nd
AIS 3	nd	0,32	1,19	nd
AIS 5	1,17	0,41	1,18	0,80
AIS 12	nd	0,44	0,47	nd
AIS 13	nd	0,48	0,50	nd
AIS 17	0,07	0,33	0,11	0,34
AIS 18	0,05	0,29	0,09	0,26
AIS 19	0,05	0,20	0,39	0,24
AIS 20	0,06	0,14	0,61	0,18
AIS 21	0,06	0,15	0,67	0,25
BIS 38	nd	nd	0,89	nd
BIS 39	nd	0,11	0,65	0,05
<i>Brevibacterium acetylicum</i>				
BIS 41	nd	nd	0,56	1,34

* Em negrito: valores de amina acima de 1,0 mg.L⁻¹. nd = não detectado

De modo geral, a produção de aminas biogênicas por cocos Gram-positivos é baixa. Num estudo feito com 50 estirpes de *S. xylosum* isoladas de salames artesanais, 25 estirpes produziram aminas, porém apenas sete produziram níveis significativos, entre 6 e 19 mg.L⁻¹, de espermina, espermidina, triptamina e tiramina (Martuscelli et al., 2000). Outros autores verificaram a produção de histamina e tiramina em 100% das estirpes de *Kocuria* isoladas de salame artesanal, porém em níveis variando entre 1 e pouco mais de 10 mg.L⁻¹ (Fadda et al., 2001). Entre noventa cocos Gram-positivos isolados de salames fermentados foi encontrado um isolado que produziu mais de 10 mg.L⁻¹ de putrescina; quatro produziram mais de 10 mg.L⁻¹ de tiramina e 21 produziram mais de 100 mg.L⁻¹ (Ansorena et al., 2002).

Vinte e um dos trinta e oito isolados obtidos a partir do ágar Oxford produziram uma ou mais aminas em teores superiores a 1 mg.L⁻¹ (Tabela 9). Dentre estes, nove produziram teores superiores a 2 mg.L⁻¹, sendo que alguns produziram teores muito altos, como o isolado *S. equorum* BIL 20 que produziu 720,35 mg.L⁻¹ de tiramina; *S. auricularis* BIL 11 que produziu 60,15 e 66,17 mg.L⁻¹ de tiramina e histamina, respectivamente; *S. arlettae* CIL 26 que produziu 20,89 mg.L⁻¹ de tiramina e o isolado *L. innocua* BIL 9 que produziu 69,78 e 66,19 mg.L⁻¹ de tiramina e histamina, respectivamente. Este último não seria, de qualquer forma, recomendado para uso como cultura *starter* por se tratar de uma espécie do gênero *Listeria*, mas sua presença num salame de origem artesanal pode implicar na produção de

níveis elevados de histamina e tiramina neste produto. Nenhum dos outros isolados poderia também ser recomendado para uso como cultura *starter* devido ao risco de produzirem aminas no salame.

Os isolados *S. xylosus* CIL 22 e CIL 23, *S. arlettae* CIL 24 produziram teores bem menores, em torno de 4 a 12 mg.L⁻¹ de tiramina ou histamina, porém ainda expressivos, levando-se em conta o fato de que valores acima de 6 mg.L⁻¹ são considerados significativos (Martuscelli et al., 2000). A presença de estafilococos com atividade de aminoácido descarboxilase em salames fermentados é relevante, pois estas bactérias podem contribuir para a produção de aminas biogênicas, principalmente no início da fermentação quando as condições para o seu crescimento são favoráveis (Fadda et al., 2001). Por outro lado, a adição de culturas *starter* não produtoras de aminas para desenvolver uma fermentação controlada pode ser uma prática desejável para prevenir o acúmulo excessivo de aminas biogênicas (Bover-Cid et al., 2001a).

De modo geral os cocos Gram-positivos isolados de salame testados neste trabalho produziram baixos níveis de aminas, com exceção de alguns poucos isolados. Estirpes de *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. carnosus* entre outras espécies de estafilococos coagulase negativos isolados de salame fermentado também produziram baixos níveis de tiramina, entre 2 e 18 mg.L⁻¹ (Masson et al., 1996). Dez espécies de estafilococos coagulase negativo também isolados de salame fermentado não produziram tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina ou cadaverina (Bover-Cid et al., 2001b).

Tabela 9 – Produção de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina por cocos Gram-positivos isolados de salame italiano em ágar Oxford

Estirpe	Teores (mg.L ⁻¹)			
	putrescina	cadaverina	tiramina	Histamina
<i>Staphylococcus xylosum</i>				
BIL 13	0,03	0,01	0,13	0,09
CIL 22	nd	nd	nd	4,19*
CIL 23	0,14	nd	12,09	nd
CIL 25	nd	nd	nd	1,33
CIL 28	nd	nd	0,90	1,30
CIL 31	0,08	0,55	0,67	0,12
CIL 32	0,01	1,04	0,05	0,05
CIL 33	nd	0,96	nd	nd
CIL 35	nd	nd	1,80	nd
CIL 36	nd	nd	2,58	nd
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>				
AIL 1	nd	nd	nd	nd
<i>Staphylococcus equorum</i>				
AIL 2	0,15	0,27	0,59	0,59
AIL 3	0,19	0,63	0,51	0,58
AIL 4	0,21	0,66	0,59	0,70
BIL 6	nd	0,06	0,06	0,10
BIL 20	nd	nd	720,35	nd
<i>Staphylococcus warneri</i>				
BIL 10	nd	0,05	0,01	0,12
BIL 21	nd	nd	1,36	1,20
CIL 27	nd	nd	0,02	0,11
CIL 39	nd	nd	1,39	nd
CIL 40	nd	nd	1,57	nd
<i>Staphylococcus auricularis</i>				
BIL 11	nd	0,03	60,15	66,17
<i>Staphylococcus arlettae</i>				
BIL 12	0,02	0,05	0,01	1,20
BIL 14	nd	0,01	0,44	0,40
BIL 15	0,05	0,07	0,01	0,15
BIL 16	nd	nd	0,28	0,57
BIL 18	nd	nd	0,89	1,27
CIL 24	nd	nd	4,51	1,12
CIL 26	nd	nd	20,89	nd
CIL 29	nd	nd	0,74	0,99
CIL 30	nd	nd	2,37	1,62
CIL 34	nd	1,50	nd	nd
CIL 41	nd	0,45	1,48	nd
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>				
BIL 17	nd	nd	1,01	1,04
<i>Listeria innocua</i>				
BIL 7	nd	0,05	0,01	0,08
BIL 8	nd	0,05	0,01	0,08
BIL 9	nd	0,01	69,78	66,19
BIL 5 - não identificado	0,03	0,06	0,08	0,10

* Em negrito: valores de amina acima de 1,0 mg.L⁻¹. nd = não detectado

3.2.2 Degradação de tiramina e de histamina

Trinta e seis das 60 espécies de cocos Gram-positivos isolados em ágar Baird-Parker foram capazes de degradar histamina e/ou tiramina em diferentes intensidades (Tabela 10). Dez estirpes foram capazes de degradar tiramina em percentuais superiores a 70% e 15 foram capazes de degradar histamina também acima de 70%. Entre estas, destacam-se quatro estirpes de *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*, AIS 10, CIS 52, CIS 58 e CIS 59; uma de *Staphylococcus arlettae*, AIS 9; uma de *Staphylococcus caprae*, AIS 15. Duas estirpes de *R. dentocariosa*, AIS 20 e AIS 21; e duas estirpes de *S. capitis* subsp. *capitis*, BIS 23 e BIS 24, exibiram atividade de histamina oxidase marcante, tendo sido capazes de degradar toda a histamina, 1,63 mM, presente no tampão. As estirpes CIS 52, CIS 58, CIS 59, BIS 23 e BIS 24 são provenientes de salames artesanais, sendo portanto indicadas para a composição de culturas *starter* para a fermentação de salames. Um grande número de isolados foi capaz de degradar histamina e/ou tiramina em percentuais menores que 70% porém ainda elevados. Dezesete isolados degradaram entre 30 e 70% de tiramina e treze isolados conseguiram degradar histamina na mesma intensidade.

Dentre as 38 espécies de cocos Gram-positivos isoladas em ágar Oxford, 25 foram capazes de degradar histamina e/ou tiramina em diferentes intensidades (Tabela 11). Quatro estirpes conseguiram degradar acima de 70% de tiramina e seis estirpes degradaram acima de 70% de histamina, com destaque especial para as estirpes *S. equorum* BIL 20, *S. xylosus* CIL 33 e *S. warneri* CIL 40, todas oriundas de salames artesanais. Não foram encontrados na literatura relatos anteriores sobre a atividade amina oxidase em *S. equorum* e *S. warneri*. Um número maior de isolados degradou histamina e/ou tiramina entre 30 e 70%; 14 estirpes degradaram tiramina e 13 degradaram histamina nesta faixa, que é também considerada relevante para a diminuição dos níveis destas aminas em produtos fermentados.

Os resultados deste trabalho mostraram que a degradação de histamina e tiramina por células em repouso de cocos Gram-positivos foi muito boa. Dados da literatura mostram resultados semelhantes. Uma alta atividade catabólica para histamina e tiramina foi relatada em espécies de

micrococcos, porém o mesmo não ocorreu com nenhuma das estirpes de *S. carnosus* (Leuschner et al., 1998). Trinta e nove por cento das estirpes que não mostraram atividade de aminoácido descarboxilase sobre tirosina, histidina, ornitina ou lisina, exibiram capacidade de degradar tiramina e histamina. Oitenta por cento das estirpes de *S. xyloso* isoladas de salames fermentados sem atividade de aminoácido descarboxilase mostraram diferentes níveis de atividade amina oxidase sobre histamina e tiramina (Martuscelli et al., 2000).

Foram encontradas neste estudo espécies com potencial de degradar histamina e/ou tiramina entre os cocos Gram-positivos que compõem a microbiota de salames fermentados artesanalmente. Isto é relevante considerando que a degradação destas aminas por bactérias do ácido láctico isoladas de salames fermentados é ausente ou muito baixa (Leuschner et al., 1998). Além disso, a variedade encontrada de isolados com potencial para degradação de histamina e/ou tiramina permite uma gama de combinações de bactérias para a formulação de consórcios de culturas *starter* com a vantagem extra de degradar duas das principais aminas biogênicas indesejáveis em produtos cárneos fermentados.

Tabela 10 – Degradação de tiramina e de histamina por cocos Gram-positivos isolados de salame italiano em ágar Baird-Parker após incubação por 48 horas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 contendo 1,63 mM de histamina e 3,46 mM de tiramina

Estirpe	% Degradação	
	Tiramina	Histamina
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>		
AIS 4	38,8	30,7
AIS 7	68,2	66,3
AIS 8	25,9	17,8
AIS 10	94,0	94,0
AIS 11	-	20,6
BIS 23	54,3	100,0
BIS 24	55,7	100,0
BIS 25	22,9	-
BIS 26	0,4	-
CIS 50	59,8	68,1
CIS 51	14,5	22,5
CIS 52	80,7	82,1
CIS 54	6,3	12,7
CIS 57	25,5	39,7
CIS 58	95,0	96,6
CIS 59	83,1	86,3
CIS 61	41,1	46,6
<i>Staphylococcus arlettae</i>		
AIS 9	73,9	72,5
<i>Staphylococcus chromogenes</i>		
AIS 14	59,7	69,5
AIS 16	57,9	70,4
AIS 22	62,5	100,0
<i>Staphylococcus caprae</i>		
AIS 15	84,2	88,8
<i>Staphylococcus ayersii</i>		
AIS 6	66,9	65,7
<i>Staphylococcus delphini</i>		
CIS 55	6,6	15,4
CIS 56	30,0	45,0
<i>Rothia dentocariosa</i>		
AIS 1	70,4	79,0
AIS 2	83,0	88,8
AIS 3	64,7	74,9
AIS 5	57,3	48,1
AIS 12	53,5	65,4
AIS 13	83,1	88,0
AIS 17	53,1	66,0
AIS 18	50,4	62,5
AIS 19	76,8	83,3
AIS 20	48,3	62,6
AIS 21	50,2	100,0

Tabela 11 – Degradação de histamina e de tiramina por cocos Gram-positivos isolados de salame italiano em ágar Oxford após incubação por 48 horas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 contendo 1,63 mM de histamina e 3,46 mM de tiramina

Estirpe	% Degradação	
	Tiramina	Histamina
<i>Staphylococcus xylosus</i>		
BIL 13	37,9	51,7
CIL 22	50,8	67,7
CIL 25	34,2	46,0
CIL 28	35,6	52,2
CIL 31	56,1	62,8
CIL 32	-	23,4
CIL 33	75,3	82,6
CIL 35	-	19,4
CIL 36	11,6	37,1
<i>Staphylococcus equorum</i>		
BIL 20	82,8	88,6
<i>Staphylococcus warneri</i>		
BIL 10	49,4	57,0
BIL 21	58,6	68,0
CIL 27	51,4	58,7
CIL 40	79,6	83,8
<i>Staphylococcus arlettae</i>		
BIL 12	8,6	24,6
BIL 14	15,4	24,7
BIL 15	-	4,8
BIL 16	40,3	46,6
BIL 18	69,2	75,1
CIL 26	44,0	51,7
CIL 29	45,2	60,0
CIL 34	21,4	41,0
<i>Listeria innocua</i>		
BIL 7	69,2	78,2
BIL 8	53,8	68,2
BIL 9	75,6	83,9

4. CONCLUSÃO

A ocorrência de genes de enterotoxina em cocos Gram-positivos isolados de salame italiano observada neste estudo foi baixa, com exceção do gene *see* que estava presente em 23,5% dos isolados. Do total de 98 isolados testados, sete possuíram um ou mais dos genes *seb*, *seh* e *sej*, e 23 apresentaram o gene *see*. Entretanto a existência desses genes codificadores de enterotoxinas demonstrada pela reação em cadeia de polimerase não prova que a produção da respectiva enterotoxina ocorre.

Sob este ponto de vista, as estirpes com resultado positivo para a presença de genes de enterotoxina encontradas neste estudo não seriam, a princípio, as mais indicadas para a composição de culturas *starter*, ainda que não se tenha avaliado o seu comportamento quanto à produção de enterotoxina no salame. No entanto, se estas estirpes apresentarem bom potencial em relação às outras características desejáveis para a fermentação de salames, vale a pena avaliar se elas são realmente capazes de produzir enterotoxina, ou por mutação sítio direcionada, obter deleções que inativem definitivamente esses genes. Caso não sejam, nada impediria o seu uso como culturas *starter*.

Quanto à produção de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina, dos 98 isolados, onze produziram entre 2 e 70 mg.L⁻¹ de pelo menos uma das aminas estudadas. Um isolado, *S. equorum* BIL 20, produziu 720,35 mg.L⁻¹ de tiramina. Nove produziram teores consideráveis de tiramina, entre 4,19 e 69,78 mg.L⁻¹, dentre eles *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 30, *S. chromogenes* AIS 22, *S. ayersii* BIS 36, *S. equorum* BIL 20, *S. auricularis* BIL 11, *S. arlettae* CIL 24 e CIL 26, *S. xylosus* CIL 22 e CIL 23. Estes isolados não são, portanto, indicados para uso como culturas *starter*, embora não tenha sido avaliado o seu comportamento na fermentação do salame.

Sessenta por cento das 98 estirpes conseguiram degradar histamina e/ou tiramina em diferentes intensidades. As estirpes *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*, AIS 10, BIS 23, BIS 24, CIS 52, CIS 58 e CIS 59; *Staphylococcus arlettae* AIS 9; *Staphylococcus caprae* AIS 15, *S. equorum* BIL 20, *S. warneri* CIL 40 e *S. xylosus* CIL 33 merecem destaque especial pois mostraram melhor desempenho neste quesito.

Trinta e nove por cento das estirpes que não mostraram atividade de aminoácido descarboxilase sobre tirosina, histidina, ornitina ou lisina, exibiram capacidade de degradar tiramina e histamina, sendo, portanto as mais recomendadas para a composição de consórcios de culturas *starter* para a fermentação de embutidos cárneos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANSORENA, D., MONTEL, M. C., ROKKA, M., TALON, R., EEROLA, S., RIZZO, A., RAEMAEEKERS, M. e DEMEYER, D. Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*, v.61, p.141-147, 2002.
2. BALABAN, N. e RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, v.61, p.1-10, 2000.
3. BINDER, D., ZBINDEN, R., WIDMER, U., OPRAVIL, M., KRAUSE, M. Native and prosthetic valve endocarditis caused by *Rothia dentocariosa*: Diagnostic and therapeutic considerations. *Infection*, v.25, n.1, p.22-26, 1997.
4. BLAIOTTA, G., ERCOLINI, D., PENACCHIA, C., FUSCO, V., CASABURI, A., PEPE, O. e VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus*. AB-8802. *Journal of Applied Microbiology*, v.97, p.719-730, 2004.
5. BOVER-CID, S. e HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.53, p.33-41, 1999.
6. BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., e VIDAL-CAROU, M. C. Effect of the interaction between a low tiramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v.65, p.113-123, 2001a.
7. BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M. e VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v.66, p.185-189, 2001b.
8. BRINK, B. ten, DAMINK, C., JOOSTEN, H. M. L. J. e HUIS in't VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.11, p.73-84, 1990.

9. CARMO, L. S., DIAS, R. S., LINARDI, V. R., SENA, M. J., SANTOS, D. A., FARIA, M. E., PENA, E. C., JETT, M. e HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v.19, p.9-14, 2002.
10. COCOLIN, L., MANZANO, M., AGGIO, D., CANTONI, C. e COMI, G. A novel polymerase chain reaction (PCR) – denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of *Micrococcaceae* strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science*, v. 57, p.59-64, 2001.
11. COOPER, R. A. On the amine oxidases of *Klebsiella aerogenes* strain W70. *FEMS Microbiology Letters*, v.146, p.85-89, 1997.
12. FADDA, S., VIGNOLO, G. e OLIVER, G. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters*, v.23, p.2015-2019, 2001.
13. GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M. A., PAPARELLA, A. e SUZZI, G. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat Science*, v.61, p.275-283, 2002.
14. GRAEVENITZ, A. V. Review - *Rothia dentocariosa*: taxonomy and differential diagnosis. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v.10, p.399-402, 2004.
15. HALL, B. G., YOKOYAMA, S. e CALHOUN, D. H. Role of cryptic genes in microbial evolution. *Molecular Biology Evolution*, v.1, p.109-124, 1983.
16. LARKIN, J., MONTERO, J., TARGINO, M., POWERS, A., ACCURSO, C. e CAMPBELL, M. *Rothia dentocariosa* endocardite. *Clinical Microbiology Newsletter*, v.23, n.2, p.13-15, 2001.
17. LEUSCHNER, R. G., HEIDEL, M. e HAMMES, W. P. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, v.39, p.1-10, 1998.
18. MARTIN, B., GARRIGA, M., HUGAS, M., BOVER-CID, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T. e AYMERICH, T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase positive cocci from slightly

- fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 107, p.148-158, 2006.
19. MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M. A., GARDINI, F. e SUZZI, G. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*, v.31, p.228-232, 2000.
 20. MASSON, F., TALON, R. e MONTEL, M. C. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology*, v.32, p.199-207, 1996.
 21. MEHROTRA, M., WANG, G. e JOHNSON, W. M. Multiplex PCR detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, v.383, p.1032-1035, 2000.
 22. OKOJI, C. N., INGLIS, B. e STEWART, P. R. Potential problems in the use of oligonucleotide probes for staphylococcal enterotoxin genes. *Journal of Applied Bacteriology*, v.74, p.637-644, 1993.
 23. OMOE, K., ISHIKAWA, M., SHIMODA, Y., HU, D. L., UEDA, S. e SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40(3), p.857-862, 2002.
 24. PLUMMER, M. e SCHOCH, P. E. *Rothia dentocariosa* bacteremia. *Clinical Microbiology Newsletter* v.17, n.3, p.22-24, 1995.
 25. REN, K., BANNAN, J. D., PANCHOLI, V., CHEUNG, A. L., ROBBINS, J. C., FISCHETTI, V. A. e ZABRISKIE, J. B. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *Journal of Experimental Medicine*, v.180, p.1675-1683, 1994.
 26. RODRÍGUEZ, M., NÚÑEZ, F., CÓRDOBA, J. J., BERMÚDEZ, E. e ASENSIO, M. A. Gram-positive, catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.6, p.1897-1902, 1996.
 27. ROSEC, J. P., GUIRAUD, J. P., DALET, C. e RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *International Journal of Food Microbiology*, v.35, p.213-221, 1997.

28. ROSEC, J. P. e GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, v.77, p.61-70, 2002.
29. SANTOS, W. C., SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P., GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry* v. 81, p. 595-606, 2003.
30. SNEATH, P. H. A., Editor; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E., Associate editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams e Wilkins, Baltimore, 1342-1346, 1986.
31. STACKEBRANDT, E., RAINEY, F. A., e WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.47, p.479-491, 1997.
32. SUZZI, G. e GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.2731, p.1-14, 2003.
33. TRISTÃO, I. H. Bactérias isoladas de salame tipo italiano e sua resistência a antibióticos e a bactérias lácticas. Viçosa, MG, UFV, 1998, 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
34. VERNOSY-ROZAND, C., MAZUY, C., PREVOST, G. LAPEYRE, C., BES, M., BRUN, Y e FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v.30, p.271-280, 1996.
35. ZHANG, S., IANDOLO, J. J. e STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiology Letters*, v.168, p.227-233, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

Vários isolados provenientes de salames artesanais com potencial para uso em culturas *starter* foram estudados sob os aspectos da inibição de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, redução de nitrato e produção de catalase, ausência de genes de enterotoxinas estafilocócicas, e não produção aliada à degradação de amins biogênicas. Analisando todos os aspectos desejáveis em conjunto, foram selecionados 12 isolados com antagonismo sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes* por substância de possível natureza protéica; 11 isolados com altos níveis de atividade de catalase ou de nitrato redutase; e seis com potencial de degradação de histamina e tiramina. Nenhum destes isolados apresentou genes codificadores das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEH e SEJ e nem produziu histamina, tiramina, putrescina ou cadaverina em níveis superiores a 2 mg.L⁻¹. Os 12 isolados com atividade antagonista são *S. caprae* CIS 45, *S. arlettae* CIS 46, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 25, BIS 26, BIS 27, BIS 28, BIS 29, BIS 31, BIS 32, BIS 34, CIS 53 e CIS 54. Os que apresentaram atividade de catalase elevada foram *S. arlettae* BIL 18, CIS 44, CIS 60, CIS 46 e CIS 43, *S. warneri* CIL 40, *S. capitis* subsp. *capitis* BIS 35, BIS 24 e BIS 27. Os isolados *S. xylosus* CIL 28 e *S. equorum* BIL 6 apresentaram simultaneamente elevadas atividades de catalase e nitrato redutase. Os isolados com potencial para degradação de histamina e tiramina foram *S. capitis* subsp. *capitis* CIS 52, CIS 58, CIS 59, BIS 23 e BIS 24 e *S. warneri* CIL 40. De acordo com os estudos realizados, estes isolados são os melhores candidatos para a composição de consórcios para a fermentação de salames. Porém, são necessários estudos complementares sobre o comportamento desses isolados na fermentação do salame, antes que se estabeleça, de fato, quais os isolados mais adequados para a fermentação de salames.