

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



Dissertação

Caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de presunto cozido e verificação do potencial tecnológico e bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

Juliana de Lima Marques

Bióloga

Pelotas, 2014

Juliana de Lima Marques

Caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de presunto cozido e verificação do potencial tecnológico e bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação: Prof. Dra. Ângela Maria Fiorentini

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M357c Marques, Juliana de Lima

Caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido láticas isoladas de presunto cozido e verificação do potencial tecnológico e bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* / Juliana de Lima Marques; orientadora Ângela Maria Fiorentini; coorientador Wladimir Padilha da Silva. - Pelotas, 2014.
69 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Bacteriocinas. 3. *Pediococcus pentosaceus*. 4. Presunto cozido. I. Fiorentini, Ângela Maria, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Título.

CDD: 664

Juliana de Lima Marques

Caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de presunto cozido e verificação do potencial tecnológico e bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

Dissertação aprovada, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 14/10/2014.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini
Doutora em Ciências dos Alimentos – UFSC

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Doutor em Ciências dos Alimentos - USP

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

Profa. Dra. Liziane Schittler
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial – UFPel

Prof. Dr. Celso Medina Fagundes
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

Agradecimentos

Aos meus pais, Ilton e Leda, e ao meu irmão Fernando, por tudo que me proporcionaram até hoje. Por sempre me apoiarem em todas as decisões que tomei e nunca deixado de acreditar em mim. Com certeza, tudo o que sou hoje é consequência dos ensinamentos de vocês, e serei eternamente grata.

A minha orientadora, Profa. Ângela Maria Fiorentini, pela orientação, oportunidade, confiança, assim como todo o apoio e incentivo fornecidos ao longo deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Wladimir Padilha da Silva, pela orientação e oportunidade.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo incentivo, conversas, por todos os momentos de descontração, e por sempre me auxiliarem quando precisei. Além, de claro, aguentarem todas as minhas crises de ansiedade.

A Universidade Federal de Pelotas, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de executar este trabalho.

A Profa. Patrícia Nascente e à Josiara Mendes, por me auxiliarem com o sistema Vitek.

Ao Prof. Luiz Augusto Nero (UFV) e à Profa. Amanda Motta (UFRGS), por cederem cepas padrões de grande importância para a execução deste trabalho.

A banca examinadora, por aceitar participar do crescimento do meu trabalho.

A todos, que direta ou indiretamente, me acompanharam ao longo desse trajeto, compreendendo tanto as minhas ausências, frustrações, como me incentivando e comemorando junto a mim.

A todos vocês, o meu sincero muito obrigada!

Resumo

MARQUES, Juliana de Lima. **Caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de presunto cozido e verificação do potencial tecnológico e bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus***. 2014. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Micro-organismos patogênicos se desenvolvem nas condições que se encontram os alimentos, assim como as bactérias ácido lácticas (BAL), que prevalecem na microbiota natural de muitos destes, incluindo os produtos cárneos. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar, por técnicas bioquímicas e moleculares, bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de presunto cozido fatiado, assim como verificar o potencial tecnológico e bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Para duzentos (200) isolados, foram realizados testes de coloração de Gram, catalase, crescimento nas diferentes temperaturas (10°C e 45°C), concentrações de NaCl (4,5% e 6%), resistência em diferentes valores de pH (4,0 e 9,0) e tipo de fermentação. Após, foi realizado o teste de antagonismo contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, utilizando a técnica *spot-on-the-lawn*, seguido do teste de atividade proteolítica. Após a caracterização dos isolados, aqueles que revelaram resultados positivos a todos os testes, foram submetidos à identificação fenotípica por meio do sistema Vitek, e posterior confirmação por técnicas moleculares (PCR). Os resultados demonstraram que dos duzentos (200) isolados, 181 (90,5%) foram identificados como BAL, sendo 71 (39,22%) com potencial de aplicação tecnológica. Além disso, 68 (95,8%) apresentaram atividade antagonista contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, indicando a produção de compostos antimicrobianos. Porém, quando submetidos ao teste de atividade proteolítica, 64 (90,14%) apresentaram potencial bacteriocinogênico. Destes, 7 (46,66%) foram identificados bioquimicamente e molecularmente como *P. pentosaceus*. Com isso, pode-se afirmar que os isolados identificados molecularmente como *P. pentosaceus* apresentam amplo espectro de aplicação como culturas iniciadoras em produtos cárneos, além do potencial bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Bacteriocinas; *Pediococcus pentosaceus*; Presunto cozido.

Abstract

MARQUES, Juliana de Lima. **Phenotypic and molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from cooked ham and technological and bacteriocinogenic potential against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus***. 2014. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Besides pathogenic microorganisms fail to develop the conditions, which are foods, lactic acid (LAB) bacteria and their bacteriocins dominate the natural microbiota of many of these, including meat products. Given the above, the objective of this study was to characterize, by biochemical and molecular techniques, lactic acid bacteria (LAB) isolated sliced cooked ham, and to evaluate the antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. From 200 isolates Gram stain, catalase, growth at different temperatures (10 °C and 45 °C), concentrations of NaCl (4.5% and 6%), resistance to different pH tests were carried out (4.0 and 9,0) and type of fermentation. After the antagonism against *S. aureus* and *L. monocytogenes* test was carried out using the technique spot-on-the-lawn, followed by testing of proteolytic activity. After characterization of the isolates revealed that the positive results for all tests, underwent biochemical identification by the Vitek system, and subsequent confirmation by molecular techniques. The results showed that isolates two hundred, 181 (90.5%) were identified as BAL, 71 (39.22%) with great potential for technological application. In addition, 68 (95.8%) had antagonistic activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes*, indicating the production of antimicrobial compounds. However, when subjected to proteolytic activity, 64 test (90.14%) showed bacteriocinogenic potential. Of these, 7 (46.66%) were biochemically and molecularly identified as *P. pentosaceus*. With this, it can be stated that the isolates identified as *P. pentosaceus* have molecularly broad spectrum of application as starter cultures in meat products, beyond the bacteriocinogenic potential against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Bacteriocins; *Pediococcus pentosaceus*; Cooked ham.

Lista de Figuras

Figura 1	Equipamento Vitek ®2 e cartões para identificação de bactérias gram-positivas	33
Figura 2	Microscopia óptica do isolado 136, Gram-positivo e morfologia de bacilo (1000X).....	36
Figura 3	Presença de halo translúcido ao redor do crescimento do isolado 97 de BAL, contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	40
Figura 4	Percentual dos 68 isolados de BAL provenientes de presunto cozido fatiado que apresentaram compostos de natureza proteica sensíveis em relação ao número de enzimas testadas.....	42
Figura 5	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos da PCR para confirmação do gênero <i>Pedococcus</i> spp. para identificação do gene 23S com amplificação no fragmento 701pb.....	49
Figura 6	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos da PCR para confirmação da espécie <i>P. pentosaceus</i> com amplificação do fragmento 394pb.....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1	Oligonucleotídeos utilizados para identificação em nível de gênero e espécie de <i>P. pentosaceus</i> isolados de presunto cozido fatiado.....	34
Tabela 2	Perfil bioquímico de 15 isolados identificados em <i>P. pentosaceus</i> pelo sistema Vitek ®2.....	45

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Bactérias ácido lácticas (BAL).....	16
3.2 Atividade antimicrobiana.....	18
3.3 Bacteriocinas.....	20
3.3.1 <i>Pediococcus</i> e bacteriocinas.....	24
3.5 BAL de carnes e derivados.....	26
3.6 Aplicação tecnológica de BAL em carnes e derivados.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Amostras.....	30
4.2 Caracterização Fenotípica.....	30
4.2.1 Caracterização do potencial tecnológico.....	30
4.3 Detecção da atividade antagonista.....	31
4.4 Confirmação do potencial bacteriocinogênico.....	31
4.5 Identificação bioquímica e molecular dos isolados potencialmente bacteriocinogênicos.....	32
4.5.1 Identificação bioquímica.....	32
4.5.2 Identificação molecular.....	33

4.5.2.1 Extração de DNA.....	33
4.5.2.2 PCR.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Caracterização Fenotípica.....	36
5.1.2 Caracterização do potencial tecnológico.....	37
5.2 Confirmação da atividade antagonista das BAL.....	39
5.3 Confirmação do potencial bacteriocinogênico.....	41
5.4 Identificação bioquímica e molecular dos isolados potencialmente bacteriocinogênicos.....	43
5.4.1 Identificação bioquímica: Vitek.....	43
5.4.2 Identificação molecular: PCR.....	48
6 CONCLUSÕES.....	51
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICES.....	63
ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Para os consumidores, os alimentos são fontes nutricionais de importância significativa para a manutenção da saúde e bem-estar. Porém, esse alto teor de nutrientes faz dos alimentos, dependendo dos fatores intrínsecos e extrínsecos, um meio propício para a sobrevivência e multiplicação de micro-organismos. Além de determinados micro-organismos patogênicos se desenvolverem nas condições que se encontram os alimentos, as bactérias ácido lácticas (BAL) prevalecem na microbiota natural de muitos destes, incluindo os produtos cárneos (DE MARTINS et al., 2002; SAKALA et al., 2002).

As BAL fazem parte de um grupo de bactérias Gram-positivas, agrupadas por apresentarem as mesmas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas (AXELSSON, 2004). Quando aplicadas como culturas iniciadoras, as BAL aumentam o período de conservação de alimentos, provocando a degradação dos carboidratos presentes na matéria-prima, o que consequentemente causa redução do pH, tornando o meio inviável para o desenvolvimento de grande parte dos micro-organismos deteriorantes e patogênicos (MADEIRA et al., 2003). A atividade antagonista promovida pelas BAL se dá devido à produção de compostos antimicrobianos, como os ácidos orgânicos, dióxido de carbono, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (CASTELLANO et al., 2008).

Bacteriocinas são de grande interesse em pesquisas atuais. São peptídeos antimicrobianos com ação bactericida ou bacteriostática, sintetizados via ribossomal e hidrolisados por enzimas digestivas. Essas substâncias apresentam grande potencial tecnológico e bioconservador, visto que dificultam a multiplicação e sobrevivência de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (SOBRINO-LÓPEZ; MARTÍN-BELLOSO, 2008; ACUÑA et al., 2012).

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de identificar isolados bacteriocinogênicos. Dal Bello et al. (2010) identificaram 9,8% dos isolados de

Enterococcus de produtos cárneos com potencial bacteriocinogênico contra *L. monocytogenes*. Biscola et al. (2013) ao isolarem BAL de carne de charque identificaram sensibilidade de dois isolados frente às enzimas proteolíticas, demonstrando a natureza proteica das substâncias antimicrobianas, ou seja, potencialmente bacteriocinogênicos contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

No entanto, no Brasil só é permitido o uso comercial da nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Sua aplicação se dá somente em queijos e superfícies externas de salsichas, já que não é resistente ao tratamento térmico, limitando a aplicação em demais produtos cárneos (DEEGAN et al., 2006). Barros (2009) aplicou nisina em tripas naturais objetivando o controle de micro-organismos deteriorantes em salsichas, e obtiveram sucesso em seus resultados.

Sendo assim, a busca por novas linhagens produtoras de bacteriocinas isoladas de produtos cárneos é necessária, a fim de promover a bioconservação desses produtos.

Dentre os produtos cárneos industrializados, o presunto cozido fatiado se destaca por ser altamente perecível, além de ser um produto que envolve grande manipulação, apresentando maior superfície de contato com o oxigênio, o que pode reduzir a vida útil do alimento, pois permite o crescimento de micro-organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, veiculados pelos manipuladores, plantas de processamento, equipamentos/utensílios (OLIVEIRA, 2006).

Vale ressaltar que a RDC nº12 de 2001 preconiza para produtos cárneos cozidos ou não, embutidos ou não (mortadela, salsicha, fiambre, presunto, morcela e outros): ausência de *Salmonella* sp./25g., tolerância de 10^3 UFC/g para coliformes a 45 °C, 3.10^3 UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positiva, e 5.10^2 UFC/g para *Clostridium* sulfito redutor a 46 °C (BRASIL, 2001).

Tendo em vista o grande problema dos conservantes sintéticos presentes nos alimentos, assim como os efeitos que podem causar na saúde dos consumidores quando ingeridos, por determinado tempo e com certa frequência, como os efeitos alergênicos (PEREIRA et al., 2008), justifica-se a busca por novos aditivos considerados naturais, que possam controlar e eliminar micro-organismos indesejáveis. E com o avanço da biotecnologia, nos permite identificar que os micro-organismos mais promissores, assim como os compostos produzidos por eles, são aqueles isolados da microbiota natural dos alimentos, pois tendem a ter capacidade metabólica mais bem adaptada às condições expostas.

Sabendo-se que *L. monocytogenes* e *S. aureus* são patógenos de interesse em alimentos, principalmente em produtos cárneos, já que essas duas espécies conseguem se desenvolver em ampla faixa de temperatura e pH, resistem a altas concentrações de NaCl e à redução da atividade de água, consideram-se necessárias pesquisas que visam analisar a presença de BAL produtoras de antimicrobianos de origem proteica e com potencial tecnológico em produtos cárneos, como presunto cozido. Os isolados com potencial para inibir *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, após caracterizados molecularmente, poderão ser utilizados tanto como alternativas a fim de solucionar problemas de segurança alimentar como estratégias de aplicação tecnológica para produtos cárneos industrializados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar, por técnicas bioquímicas e moleculares, bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de presunto cozido fatiado, assim como verificar o potencial tecnológico e bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

.

2.1.1 Objetivos Específicos

1. Caracterizar bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de amostras de presunto cozido fatiado;
2. Detectar a presença de atividade antagonista de BAL presentes nas amostras de presunto cozido fatiado contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*;
3. Confirmar a natureza proteica da(s) substância(s) produzidas pelos isolados de BAL, com atividade contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*;
4. Identificar, em nível de gênero e espécie as BAL isoladas de presunto cozido fatiado, com potencial bacteriocinogênico confirmada em relação aos patógenos testados, por técnicas bioquímicas e moleculares.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)

A vasta diversidade de BAL permite sua presença em vários nichos ecológicos, habitando naturalmente àqueles ricos em nutrientes, principalmente os alimentos, como produtos lácteos, cárneos e vegetais (INÊS et al., 2008). Também podem ser encontradas no solo, água, silagem, além de serem isoladas da cavidade oral, do trato gastrintestinal e genital, onde podem afetar benéficamente os ecossistemas microbianos de seres humanos e animais (MAKAROVA; KOONIN, 2007).

Essa habilidade de sobreviver em diversos habitats se dá pela capacidade de utilizar e transportar diferentes substratos. Como exemplo, no genoma de alguns micro-organismos presentes no trato gastrintestinal, foram encontrados transportadores específicos para fruto-oligossacarídeos, os quais são carboidratos não digeríveis identificados prioritariamente nesse ambiente (SCHROETER; KLAENHAMMER, 2009).

As BAL compreendem um grupo de micro-organismos com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007). São Gram-positivas, apresentam morfologia de cocos, bacilos ou coco-bacilos (FUGELSANG; EDWARDS, 2007), não são esporuladas, contêm baixo conteúdo de G+C, são ácidos tolerantes, catalase e motilidade negativas, e consideradas anaeróbias, anaeróbias facultativas ou microaerófilas. Além disso, são quimiorganotróficas (basicamente sacarolíticas), atuando preferencialmente sobre os carboidratos (MAKAROVA; KOONIN, 2007).

São classificadas geralmente como mesófilas, mas conseguem se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura, variando entre 5 °C e 45 °C. Vale ressaltar que a multiplicação em determinadas temperaturas é importante para diferenciar as bactérias, assim como a tolerância ao sal e às condições ácidas e

alcalinas como, por exemplo, algumas cepas se desenvolvem em pH 9,6 e outras em pH 3,0, como no caso dos probióticos (AXELSSON, 2004).

Para obtenção de energia para a biossíntese e reprodução, necessitam de grande quantidade de ácido láctico (resultado do metabolismo primário dos açúcares), assim como de vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos em determinadas espécies (FERREIRA, 2003). Com base no metabolismo fermentativo, as BAL podem ser classificadas em homofermentativas ou heterofermentativas. As primeiras produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação da glicose, enquanto que as heterofermentativas produzem diversos metabólitos como produtos resultantes, tais como o ácido acético, dióxido de carbono e etanol, além do próprio ácido láctico (PARADA et al., 2007). Como exemplo de homofermentativo, temos as espécies dos gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e alguns *Lactobacillus*, e heterofermentativo, espécies de *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, e alguns *Lactobacillus* (AXELSSON, 2004).

Em determinadas situações, diferentes espécies de BAL utilizam vias alternativas para a metabolização do piruvato, dependendo das condições e da capacidade enzimática, o que acaba gerando outros compostos, como o acetato, gás carbônico, peróxido, diacetil e acetoína (HUTKINS, 2006).

Sabendo-se que nutricionalmente as BAL são descritas como fastidiosas, algumas exigências nutricionais são necessárias (FUGELSANG; EDWARDS, 2007). O carbono é considerado o elemento estrutural básico, sendo fundamental para a produção dos compostos orgânicos necessários para a viabilidade celular (TORTORA et al., 2005). As BAL obtêm carbono por meio da fermentação da glicose ou de outros compostos. Algumas espécies fermentam o ácido málico e o ácido tartárico, que é de grande interesse do ponto de vista enológico (ZAMBONELLI, 2003). Enquanto o nitrogênio, é fundamental para a síntese de proteínas, de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e para a síntese de ATP (TORTORA et al., 2005). Quanto à disponibilidade para as BAL, encontra-se na forma de resíduos de aminoácidos e peptídeos (ZAMBONELLI, 2003). Os sais minerais e as vitaminas são requeridos em diferentes concentrações entre as espécies, e são essenciais ao metabolismo celular (LEPE; LEAL, 2004).

A classificação das BAL em diferentes gêneros se dá de acordo com a morfologia, tipo de fermentação, configuração do ácido láctico sintetizado, e tolerância a diferentes condições de sal, pH e temperatura em que as cepas são

submetidas. Além disso, a relação filogenética entre os diferentes micro-organismos também é considerada (AXELSSON, 2004).

Segundo revisões taxonômicas, existem cerca de 20 gêneros de BAL, porém sob o ponto de vista tecnológico, os principais representantes são: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Paralactobacillus*, *Trichococcus* e *Weissella* (MOHANIA et al., 2008).

3.2 Atividade antimicrobiana

As BAL são conhecidas por promoverem segurança alimentar, devido aos compostos antimicrobianos que podem sintetizar, assim como, propiciam qualidade aos alimentos, através da aplicação de culturas iniciadoras em produtos fermentados, os quais proporcionam sabor, aroma e textura aos produtos (ROUSE et al., 2007). Ou seja, alguns desses compostos são capazes de inibir o crescimento de determinados micro-organismos patogênicos e deteriorantes que podem estar presentes, além de, dependendo das concentrações utilizadas provocarem alterações sensoriais no produto (HERREROS et al., 2005).

Essa atividade antagonista pode se dar por diversos mecanismos, como sensibilidade às interações microbianas, competição por nutrientes, sítios de adesão, e produção de substâncias inibitórias bactericidas (VÁSQUEZ et al., 2009), como os ácidos orgânicos (ácido lático, acético e propiônico), dióxido de carbono, diacetil, peróxido de hidrogênio, substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular (reuterina) e bacteriocinas (CASTELLANO et al., 2008).

Para identificação da atividade antimicrobiana, podem ser realizadas diferentes técnicas, dentre elas: inoculação e inversão do ágar, inoculação na superfície de placa com a cultura indicadora (*spot-on-the-lawn*) e difusão em poços (LEWUS; MONTVILLE, 1991). Em geral, é verificada a atividade antimicrobiana contra um micro-organismo alvo, observada em placas onde se cultiva a BAL e posteriormente é adicionado um micro-organismo patogênico. Após a incubação das placas em temperatura e tempo apropriados, são observados halos inibitórios ao redor do crescimento da BAL (MÜLLER et al., 2009).

Um aspecto em comum, entre as BAL, são as vias fermentativas para a síntese de energia celular, resultando na produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido lático, o qual provoca redução do pH no meio, dificultando a

sobrevivência de patógenos (AMMOR; MAYO, 2007). Na pesquisa desenvolvida por Wilson et al. (2005) verificaram atividade anti-listeria de *Lactobacillus plantarum* SK1, diante à produção de ácido láctico. Outra função importante desempenhada pelo ácido láctico é a destacada por Servin (2004), que ressalta que o mesmo atua como um permeabilizador da membrana externa de bactérias Gram-negativas, possibilitando que outros antimicrobianos penetrem na célula, aumentando a sensibilidade dos patógenos aos antimicrobianos.

No caso de fermentação heteroláctica, pode ocorrer também produção de ácido acético, fórmico, etanol e dióxido de carbono (MATAMOROS et al., 2009). Muitas vezes indesejáveis em certos alimentos, pois a presença de ácidos influencia diretamente no sabor e aroma do produto (VÁSQUEZ et al., 2009).

Outro metabólito, peróxido de hidrogênio, pode ser produzido pelas enzimas flavinas de BAL, na presença de oxigênio, lactato, piruvato e NADH (HOLZAPFEL et al., 2001). O composto apresenta inibição contra alguns micro-organismos, devido ao efeito oxidante que promove na membrana lipídica e nas proteínas celulares (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). Pridmore et al. (2008), constataram que *Lactobacillus johnsonii* NCC533, produtor de peróxido de hidrogênio apresentou atividade antagonista dessa cepa contra *Salmonella* Typhimurium SL1344. Em determinadas situações, a produção de peróxido de hidrogênio pode afetar a sensorialidade do produto (HOLZAPFEL et al., 2001), assim como, a cor de produtos cárneos, pela formação de coeglobina, responsável pelo pigmento esverdeado (TERRA et al., 2004).

A produção de diacetil por algumas BAL promove o aroma de manteiga em produtos lácteos, porém são necessárias grandes concentrações para a conservação do alimento, o que acaba limitando seu uso. Em contrapartida, o acetaldeído necessita de menores concentrações para provocar a inibição de micro-organismos indesejáveis (SUSKOVIC et al., 2010).

O gás carbônico e o etanol são compostos antimicrobianos que as bactérias heterofermentativas também são capazes de produzir. A síntese de biosurfactantes, amônia e sideróforos (capazes de reduzir a quantidade de ferro disponível para o micro-organismo) também podem promover o antagonismo das BAL (DE VUYST; LEROY, 2007; CHEICKHYOUSSEF et al., 2008).

Lücke (2000) ressalta que metabólitos como peróxido de hidrogênio, gás carbônico e diacetil apresentam aplicação limitada em produtos cárneos como

compostos antimicrobianos, pois dependendo da concentração podem influenciar nas características sensoriais do produto.

No entanto, dentre todos os compostos antimicrobianos que as BAL podem sintetizar, as bacteriocinas são a de maior relevância na bioconservação de alimentos, visto que os outros metabólitos podem provocar alterações sensoriais nos produtos (FERNANDEZ et al., 2003). Como dados apresentados por Sawitzki et al. (2009), foram identificadas cepas de *Lactobacillus plantarum* isoladas de embutidos cárneos artesanais que apresentaram antagonismo contra *S. aureus* ATCC 12598, *L. monocytogenes* NTC 098630 e *E. coli* 25922, bem como potencial tecnológico para uso como culturas iniciadoras.

3.3 Bacteriocinas

A emergência de micro-organismos resistentes aos antibióticos de uso clínico aumentou o interesse por pesquisas de peptídeos naturais com atividades antimicrobianas. Esses peptídeos, denominados de bacteriocinas, estão concentrando grande parte dos estudos sobre bioconservação, enfatizando sua detecção, produção, purificação, mecanismo de ação, caracterização bioquímica e aplicação na bioconservação de alimentos (VÁSQUEZ et al., 2009).

As bacteriocinas são definidas como substâncias bactericidas ou bacteriostáticas de origem proteica, produzidas por determinadas linhagens bacterianas que impedem a multiplicação de outros micro-organismos (NASCIMENTO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012). Devido a isto, as bacteriocinas vêm sendo aplicadas como bioconservantes. A bioconservação envolve a aplicação de um conjunto de técnicas e de processos que empregam organismos vivos ou substâncias destes providas. O uso desta permite melhorar a qualidade do produto, controlar os processos, aumentar a vida útil, e consequentemente garantir a segurança do alimento (CORBO et al., 2009).

A síntese de bacteriocinas no metabolismo bacteriano é maior no final da fase exponencial e no início da fase estacionária e o seu declínio ocorre devido a degradação proteolítica (THOMAS et al., 2000).

É importante ressaltar que as bacteriocinas e os antibióticos convencionais apresentam diferenças significativas, principalmente no que tange à síntese e o espectro de ação (FRANCIOSI et al., 2009; NIETO-ARRIBAS et al., 2009). A síntese das bacteriocinas ocorre via ribossomal e seu espectro de ação é mais restrito a

bactérias filogeneticamente relacionadas. Além disso, as bactérias produtoras desses peptídeos são imunes a essas substâncias sintetizadas, através da produção de proteínas específicas que estão localizadas no mesmo operon da bacteriocina, podendo estar no cromossomo bacteriano, plasmídeos ou transposons (ARAUZ et al., 2009). Em contrapartida, os antibióticos são considerados metabólitos secundários oriundos de bactérias e fungos, e seu espectro de ação é amplo. A resistência de alguns micro-organismos está ligada à transferência de genes que podem afetar sítios de acordo com seu mecanismo de ação, podendo agir tanto na membrana celular quanto em alvos intracelulares, inibindo a síntese de DNA, RNA, formação de proteínas e de parede bacteriana (CLEVELAND et al., 2001). Além disso, as bacteriocinas não alteram a microbiota do trato gastrointestinal, pois estas são digeridas por enzimas proteolíticas, como tripsina e pepsina, diferentemente dos antibióticos que não são digeridos pela ação das enzimas digestivas (BROMBERG et al., 2006)

A atividade bacteriocinogênica surgiu há cerca de 80 anos, quando foi identificada atividade antagonista através da síntese de colicinas por determinadas cepas de *E. coli*, o que permitiu avanços e desenvolvimento de métodos para detecção e isolamento desses compostos (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

Todorov e Dicks (2007) salientam que, para a triagem de uma cepa produtora de bacteriocina, é importante testar a atividade antagonista em diferentes condições (meio de cultivo, temperatura, pH, compostos orgânicos), pois geralmente esses compostos são produzidos em condições de estresse. Inativações genômicas também são consideradas empecilhos encontrados no estudo das bacteriocinas (GÁLVEZ et al., 2007).

Além de promover antagonismo em relação aos micro-organismos indesejáveis nos alimentos, as bacteriocinas também podem controlar o crescimento de outras BAL que não são culturas iniciadoras, mas que estão presentes naturalmente nos alimentos (GÁLVEZ et al., 2008; GUINAME et al., 2005). Devido à lise das células bacterianas, esses peptídeos também podem acelerar a proteólise e a maturação, melhorando as características sensoriais de vários produtos (GARDE et al., 2006).

O principal grupo de bactérias gram-positivas produtoras de bacteriocinas são as BAL, o que reflete na aplicabilidade industrial como bioconservadores, já que há um consenso quanto à inocuidade desse grupo de bactérias, com exceção de

algumas espécies de *Enterococcus* e *Streptococcus*, que podem veicular alguns genes de virulência (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006). Estudos relatam que patógenos alimentares, como *L. monocytogenes*, *C. botulinum* e *S. aureus* são inibidos pela ação das bacteriocinas (GÁLVEZ et al., 2007).

Quanto ao mecanismo de ação das bacteriocinas nas células alvo, de uma forma geral, a bacteriocina sofre uma interação eletrostática pelas células energizadas. Quando entram em contato com a membrana celular, ocorre uma mudança na conformação dos peptídeos, permitindo uma interação com os fosfolipídios da membrana através de forças iônicas, provocando uma desestabilização da bicamada lipídica, formando poros. Consequentemente, ocorre uma dissipação do potencial de membrana e do gradiente de pH, reduzindo o ATP intracelular e promovendo um efluxo de metabólitos que interrompem a biossíntese celular (SIMOVA et al., 2009; BENKERROUM, 2010). No entanto, as bactérias Gram-negativas acabam limitando a atividade das bacteriocinas (NERO et al., 2008; CASTELLANO et al., 2008). Essas bactérias, por apresentarem uma membrana externa, necessitam de um choque osmótico, tratamento com menor pH, detergente ou agente quelante (como por exemplo, o EDTA), ou tratamento com campo elétrico pulsado com a finalidade de destruir essa membrana externa (DE VUYST; LEROY, 2007). Porém, não são todas as cepas de BAL que são capazes de produzir esses peptídeos antimicrobianos (HAJIKHANI et al., 2007).

As bacteriocinas são divididas em três classes de acordo com suas características bioquímicas e genéticas:

- I- Composta pelos lantibióticos. São bacteriocinas que apresentam o aminoácido modificado lantionina, além de possuírem um peso molecular menor que 5 kDa. Exemplo: Nisina.
- II- Composta pelos não-lantibióticos, as quais são formadas por peptídeos termoestáveis com peso molecular inferior a 10 kDa. Essa classe se subdivide em três classes.
 - a. IIa: São denominados “pediocin-like” (semelhantes à pediocina). Se encontram os peptídeos ativos (pediocinas) com atividade, em especial contra *L. monocytogenes*. Inicialmente, os pré-peptídeos são sintetizados com uma sequência *leader* na extremidade amino-terminal, a qual é clivada durante a translocação da bacteriocina, e secretada da célula por meio de transportadores específicos.

- b. IIb: Composta pelas bacteriocinas que necessitam da atividade sinérgica entre dois peptídeos, apresentando um mecanismo de ação que envolve a redução do ATP intracelular. Se forem aplicados individualmente, apresentam reduzida atividade bacteriocinogênica. Exemplo: Lactococina G e Lacticina.
- c. IIc: Apresentam uma estrutura cíclica, resultado da interação covalente das terminações C e N. Exemplo: Enterocina AS-48, Reuterina.
- III- Composta por peptídeos termolábeis, com peso molecular acima de 30 kDa (NASCIMENTO et al., 2008).
- IV- Formada de estruturas proteicas associadas a moléculas de carboidratos e lipídeos, como a pediocina SJ-1. Porém, essa classe ainda não foi bem elucidada (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

Quanto aos métodos de identificação de BAL bacteriocinogênicas, geralmente são realizados testes convencionais a fim de verificar a inibição de micro-organismos alvos. Além disso, é preciso detectar a natureza proteica dessas substâncias antagonistas sintetizadas pelas BAL, através da adição de enzimas proteolíticas. No entanto, para confirmação das BAL bacteriocinogênicas são necessárias técnicas moleculares para assegurar maior precisão nos resultados (BROMBERG et al., 2006).

Já foram identificadas diversas bacteriocinas sintetizadas por BAL, no entanto, seu potencial de aplicação em produtos alimentícios ainda é restrito (SOBRINO-LÓPEZ; MARTÍN-BELLOSO, 2008). A nisina é a única bacteriocina licenciada para aplicação em alimentos no Brasil. É sintetizada por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, e só é permitido seu uso em queijos e superfícies externas de salsichas, limitando sua aplicação em produtos cárneos (DEEGAN et al., 2006).

A aplicação das bacteriocinas como bioconservantes nos alimentos se pode dar de várias formas: 1) inoculação da BAL no alimento e consequente produção de bacteriocina; 2) aplicação da bacteriocina purificada no produto; 3) da bacteriocina encapsulada; e 4) incorporação da bacteriocina na embalagem do produto (NASCIMENTO et al., 2008). Com relação à primeira, os probióticos podem produzir bacteriocinas *in situ*, no trato gastrointestinal, o que favorece a colonização destas

bactérias no intestino e proteção contra possíveis patógenos (DE VUYST; LEROY, 2007).

Para a obtenção de sucesso na aplicação desses peptídeos, devem-se avaliar suas propriedades, como: estabilidade à temperatura, pH e espectro de ação. Visando à comercialização, é necessária a avaliação das bacteriocinas em relação aos principais fatores que serão encontrados nos alimentos, assim como os aspectos que proporcionarão sua produção otimizada, sem afetar a qualidade nutricional e sensorial do alimento (NAVARRO et al., 2000). Além disso, devem ser analisadas quanto a sua patogenicidade, capacidade de sobreviver e competir com a microbiota natural do produto (DEEGAN et al., 2006), bem como ausência de toxicidade, e a concentração mínima do peptídeo capaz de inibir o crescimento de bactérias indesejáveis no produto (SOBRINO-LÓPEZ; MARTÍN-BELLOSO, 2008).

3.3.1 *Pediococcus* e bacteriocinas

O gênero *Pediococcus* faz parte do grupo de BAL, compreende micro-organismos Gram-positivos, homofermentativos, imóveis, anaeróbios facultativos e microaerófilos (DOBSON et al., 2002). Apresentam a morfologia de cocos, tétrades, mas podem ocorrer em pares, principalmente no início e metade da fase exponencial do metabolismo bacteriano. Algumas cepas podem apresentar atividade de pseudocatalase, quando se encontrarem em meios com concentração de carboidratos reduzida. Além disso, a temperatura ótima de crescimento varia entre 25 °C e 40 °C, porém algumas espécies crescem a 45 °C, e dificilmente a 10 °C (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

Atualmente, são descritas dez espécies pertencentes a esse gênero, sendo elas: *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. cellicola*, *P. ethanolidurans*, *P. claussenii*, *P. stilesii*, *P. acidactici* e *P. pentosaceus* (DOBSON et al., 2002).

As bactérias que fazem parte deste gênero são encontradas em muitos alimentos, principalmente como culturas iniciadoras em produtos fermentados (DÍEZ et al., 2012). Algumas espécies produzem compostos antimicrobianos, como as bacteriocinas (ALBANO et al., 2007), as quais são chamadas de pediocinas, e apresentam efeito bactericida sobre determinadas bactérias indesejáveis (ANASTASIADOU et al., 2008).

São conhecidas, em torno, de 16 pediocinas. Dentre elas: pediocin A, pediocin N5p, pediocin P e pediocin ACCEL (produzidas por *P. pentosaceus*),

pediocin PA-1, pediocin, pediocin Ach, pediocin SJ-1, pediocin PC, pediocin PO2, pediocin L50, pediocin 5, pediocin AcM, pediocin ST18 e pediocin CP2 (produzidas por *P. acidilactici*), e pediocin PD-1 (produzida por *P. damnosus*) (MILLETTE et al., 2008).

Uma vantagem da utilização das pediocinas é a resistência que apresentam à degradação térmica. Sendo assim, podem ser adicionadas às carnes cruas, pois provavelmente vão continuar mantendo suas características após o cozimento. A pediocina PA-1/Ach. Pós inoculados com pediocinas foram produzidos e encapsulados em embalagens de alimentos, havendo inibição de *Listeria* na superfície dos produtos (MURINA, 1996).

Dessa forma, a atividade bacteriocinogênica desenvolvida por algumas cepas de *Pedococcus* tem despertado o interesse para aplicação dessas bactérias como culturas iniciadoras ou de suas bacteriocinas como bioconservantes em alimentos (PAPAGIANNI; ANASTASIADOU, 2009).

O uso como bioconservantes evita a contaminação dos produtos cárneos durante o pós-processamento (corte, embalagem, manuseio), além de apresentarem atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos de importância em produtos alimentícios, principalmente *L. monocytogenes* (ZHU; DU; CORDRAY; AHN, 2005).

Sabe-se que a legislação no Brasil preconiza somente a aplicação comercial de nisina, porém em outros países já é permitida a comercialização da pediocina PA-1/Ach (ALTATM), produzida por *P. acidilactici*, o que aumenta a probabilidade dessa ser a próxima a ser licenciada no país (SOBRINO-LÓPEZ; MARTÍN-BELLOSO, 2008). Essa bacteriocina é formada por 44 aminoácidos, 4,6 kDa, e pertence a classe IIa. Além disso, é codificada por um plasmídeo, que contém o operon *pedABCD* responsável pela codificação desta bacteriocina. A pediocina é caracterizada por resistir ao tratamento térmico e ao congelamento, mantendo sua atividade por até 3 meses (RODRIGUEZ et al., 2002).

Em pesquisa desenvolvida, Murina (1996) detectou que bactérias produtoras de pediocinas quando inoculadas no início da produção de salsichas de frango promovem a inibição de *Listeria* durante o período de fermentação do produto

Já foram isoladas diversas cepas bacteriocinogênicas de *Pedococcus* a partir de alimentos, como produtos cárneos, lácteos (ALBANO et al., 2007) e bebidas fermentadas (BENEDUCE et al., 2004; TODOROV; DICKS, 2005). De acordo com

Papagianni e Anastasiadou (2009), cepas de *P. pentosaceus* vêm sendo utilizadas na indústria de alimentos como culturas iniciadoras em bebidas fermentadas e em produtos cárneos.

Em pesquisa desenvolvida por Anastasiadou et al. (2008) um isolado de *P. pentosaceus* potencialmente bacteriocinogênico, oriundo de linguiça seca, foi avaliado quanto a atividade antagonista contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, assim como, foi realizada a purificação e caracterização da bacteriocina produzida por esse isolado para possível aplicação em alimentos.

Albano et al. (2009) isolaram *P. acidilactici* com potencial bacteriocinogênico de produto cárneo fermentado, e posteriormente a cultura foi aplicada em linguiça suína fermentada e defumada (típica de Portugal) antes da etapa de embutimento, atuando como bioprotetor contra *L. innocua*.

3.5 BAL em carnes e derivados

Diversos trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de isolar BAL de produtos cárneos e seus derivados, com potencial bacteriocinogênico e para aplicação como culturas iniciadoras.

Conforme Papamanoli et al. (2003), de sete culturas de *Lactobacillus plantarum* isoladas a partir da microbiota natural de salames, 71% apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, 29% inibiram duas culturas de *S. aureus*, porém não houve inibição de *E. coli* 0157: H7 e *B. cereus*. Bromberg et al (2006) isolaram BAL bacteriocinogênicas em carnes e produtos derivados, e detectaram a eficiência da bacteriocina produzida por *Lactobacillus lactis* ssp. *hordniae* na redução e inibição de *L. monocytogenes*.

No mesmo sentido, Sawitzki et al., (2009) ao avaliarem isolados de embutidos cárneos artesanais, identificados como *L. plantarum*, foi constatada atividade antagonista contra *S. aureus* ATCC 12598, *L. monocytogenes* NTC 098630 e *E. coli* 25922, bem como potencial tecnológico para uso como culturas iniciadoras.

Em contrapartida, um grupo de estudos ao isolar BAL de um produto cárneo fermentado tradicional do Vietnã, obtiveram 85 isolados, sendo que somente 44 apresentaram características típicas de BAL, ou seja, gram-positivas e catalase negativas. Os autores testaram a atividade antagonista destes isolados, e constataram reduzido potencial de inibição contra *S. aureus* e *L. monocytogenes* (NGUYEN et al., 2010).

Da mesma forma, outra pesquisa foi desenvolvida visando isolar BAL de produtos cárneos de diversas fontes (embalados e armazenados em refrigeração a 4 °C e 7 °C). Como resultado obtiveram 212 isolados, sendo todos identificados como BAL, pois apresentaram-se como Gram-positivas e oxidase e catalase negativos. Além disso, apresentaram crescimento em 4 °C, 22 °C e 30 °C, apresentando potencial tecnológico (POTHAKOS et al., 2014).

Chakchouk-Mtibaa et al. (2014) isolaram BAL de 95 amostras de diferentes origens, como carnes e derivados de frango, moela de frango, além de vegetais fermentados. Os isolados foram testados em relação ao seu potencial antagonista contra bactérias Gram-positivas (*Micrococcus luteus* LB14110, *S. aureus* ATCC 6538, *L. monocytogenes* ATCC 19117) e Gram-negativas (*Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 49189). Os resultados demonstraram maior espectro de inibição contra *Salmonella* Typhimurim ATCC 14028, caracterizando este isolado como promissor para bioconservação de alimentos.

3.6 Aplicação tecnológica de BAL em carnes e derivados

A utilização de micro-organismos no âmbito industrial não é uma prática recente. Entre os produtos gerados por micro-organismos, podemos citar os produtos cárneos, lácteos e seus derivados, onde as BAL atuam como culturas iniciadoras. Dessa forma, as BAL apresentam grande potencial para utilização industrial, pois são consideradas grau-alimento, dominando a microbiota natural de diversos produtos alimentícios (SCHROETER; KLAENHAMMER, 2009).

As culturas iniciadoras podem ser definidas como culturas puras, de micro-organismos viáveis, os quais são adicionados aos produtos, pois seu metabolismo faz com que os alimentos sejam produzidos com características peculiares. Como apresentam a capacidade de sintetizar compostos aromáticos e antimicrobianos, conferem a esses produtos atributos sensoriais desejáveis e extensão da vida útil dos mesmos (TEUSINK; SMID, 2006).

Do ponto de vista biotecnológico, as BAL têm amplo espectro de aplicação, podendo atuar desde o controle do processo fermentativo até sua utilização como probióticos (INÊS et al., 2008). Dessa forma, a produção em larga escala explora o uso das culturas iniciadoras com o intuito de agregar segurança, padronização e qualidade ao produto final (DE VUYST; LEROY, 2007). Esses objetivos são atingidos através da produção de ácidos, peptídeos e de compostos de *flavor* por

parte das BAL, assim como a contribuição para a textura, aumento da digestibilidade e valor nutricional dos alimentos, respectivamente, devido à produção de exopolissacarídeos, síntese de enzimas e liberação de aminoácidos ou produção de vitaminas, principalmente as do complexo B (HUGENHOLTZ, 2008).

Os gêneros mais relacionados à aplicação das BAL na indústria de alimentos são: *Lactococcus* (leite), *Lactobacillus* (leite, cereais, vegetais e carnes), *Leuconostoc* (vegetais, leite), *Pediococcus* (vegetais, carnes) e *Streptococcus* (leite) (KLAENHAMMER et al., 2002). Em geral, as culturas iniciadoras são constituídas de mais de um micro-organismo, visto que seu objetivo é somar ações, visando alcançar o efeito esperado no produto final (CAMPAGNOL, 2007).

Na aplicação das culturas iniciadoras em produtos cárneos, é válido salientar que, a quantidade de cultura a ser adicionada à massa cárnea deve superar em dois ciclos logarítmicos a de micro-organismos presentes na microbiota das carnes. A habilidade das culturas iniciadoras em competir com a microbiota natural desses produtos e exercer as atividades metabólicas, está relacionada à taxa de multiplicação e sobrevivência dos micro-organismos nas condições em que foram submetidos na produção de embutidos fermentados, por exemplo (COTON et al., 2010; SEBASTIAN et al., 2011). Para que sua ação não seja limitada pelas condições do processamento, é necessário que essas bactérias consigam se adaptar em diferentes condições, como ampla faixa de temperatura, pH, concentrações de NaCl e nitrito de sódio ou potássio (AMMOR; MAYO, 2007).

Daí et al. (2013) ao verificarem a diversidade de BAL durante a fermentação de Chouguiyu, um peixe chinês, obtiveram 75 isolados, sendo 61 típicos de BAL. Destes, 22 apresentaram a morfologia de cocos e 39 de bacilos curtos. Ressalta-se que, nenhum isolado conseguiu se desenvolver na concentração de 6,5% de NaCl, porém a capacidade de digestão de fontes de carbono foi variável entre os isolados.

As culturas iniciadoras são imprescindíveis na elaboração de embutidos cárneos fermentados, pois a produção de ácido lático aliada aos baixos teores de umidade e atividade de água são os fatores que conferem sabor característico a estes produtos. A partir de açúcares adicionados na massa cárnea, as culturas produzem ácido lático, e consequentemente reduzem o pH e promovem a gelatinização de proteínas. Do ponto de vista tecnológico, a queda do pH para valores próximos ao ponto isoelétrico (5,3) das proteínas reduz a capacidade de retenção de água, propiciando a secagem e a perda de peso do produto, o que

confere uma textura firme e melhor fatiabilidade ao embutido. Além disso, a baixa atividade de água e a acidez resultante dificultam o desenvolvimento de muitos micro-organismos patogênicos e deteriorantes (MIRALLES et al., 1996).

Na seleção de culturas iniciadoras produtoras de bacteriocinas em produtos cárneos, devem ser considerados alguns aspectos, como a capacidade da cepa em produzir bacteriocinas no alimento; difusão da bacteriocina no produto, assim como sua interação com os componentes intrínsecos do alimento (por exemplo, lipídeos e proteínas) e efeito do cloreto de sódio e nitrito de sódio, que conferem características sensoriais e de coloração aos alimentos, particularmente os embutidos curados (KOUAKOU et al., 2009).

Uma vantagem em nível tecnológico da utilização de BAL produtoras de bacteriocinas em alimentos é a readequação do tratamento térmico, podendo reduzir a intensidade de calor, pois o excesso do mesmo poderia formar substâncias tóxicas (podendo provocar neoplasias em longo prazo) ou reações químicas cruzadas (podendo modificar as características sensoriais do produto), como a reação de *Maillard* (GÁLVEZ et al., 2007).

Contudo, os micro-organismos mais vantajosos para uso como biconservadores são aqueles isolados da microbiota natural dos alimentos, pois tendem a ter capacidade metabólica mais bem adaptada a qualidade do produto (BROMBERG et al., 2006; TOPISIROVIC et al., 2006).

Neste contexto, as bacteriocinas produzidas por BAL associadas com carnes, tais como *Pedococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* e *Lactobacillus* spp. podem apresentar um potencial muito maior como conservantes em alimentos à base de carne.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Duzentos (200) isolados de BAL, provenientes de presunto cozido fatiado, cidade de Pelotas, RS. Armazenados em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) com glicerol (20% v/v) e estocados a - 80 °C, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), onde foi realizada a pesquisa.

4.2 Caracterização Fenotípica

Para identificação e caracterização dos isolados de BAL, os mesmos foram recuperados em caldo MRS e incubados a 36 °C por 24h e, após, submetidos aos testes de coloração de Gram e produção de catalase.

4.2.1 Caracterização do potencial tecnológico

Com a finalidade de obter características tecnológicas, 181 isolados característicos de BAL foram submetidos ao crescimento em duas temperaturas (10 °C e 45 °C), duas concentrações de NaCl (4,5% e 6%) e resistência a dois valores de pH (4,0 e 9,0). Estes testes foram realizados utilizando caldo MRS, e os tubos foram incubados a 36 °C por 7 dias (DROSINOS et al., 2005).

A habilidade de fermentar glicose com produção de CO₂ foi verificada a partir de tubos de ensaio contendo tubos de Durham e caldo MRS acrescido de 3% de glicose. Os tubos foram incubados a 37 °C por 48h, de acordo com Lima et al. (2009). Nos tubos em que observou-se turbidez do meio e produção de gás, os isolados foram caracterizados como heterofermentativos, já os que apresentaram somente turvação do meio foram classificados como homofermentativos. Foi considerado como resultado positivo, os tubos que apresentaram metabolismo homofermentativo.

4.3 Detecção da atividade antagonista

A atividade antagonista dos isolados de BAL foi verificada a partir da técnica *spot-on-the-lawn*, segundo Fleming et al. (1975) com adaptações, contra *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *L. monocytogenes* L90 isolado de presunto. Como controle positivo e negativo foram utilizados *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Dy 13 e água destilada estéril, respectivamente. Os 71 isolados de BAL que apresentaram resultados positivos para todos os testes de aplicação tecnológica, assim como o controle positivo foram recuperados em caldo MRS e após, incubados a 36°C por 24h. Foram retiradas alíquotas de 2µL do cultivo em caldo MRS, aferidas até uma concentração referente a escala 4 de McFarland (correspondendo a 12×10^8 UFC.mL⁻¹), e inoculadas em placas contendo ágar MRS, as quais foram incubadas em jarra de anaerobiose a 36 °C por 24h.

Os inóculos de *L. monocytogenes* e *S. aureus* foram diluídos até a escala 3 de McFarland (correspondendo a 9×10^8 UFC.mL⁻¹) e realizadas diluições, até a concentração aproximada de 10^5 UFC.mL⁻¹, inoculados em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) semi-sólido, o qual foi adicionado nas placas como uma sobrecamada. As placas foram incubadas a 36°C por 24h.

A atividade antagonista foi avaliada pela formação de halos inibitórios, independente do tamanho, ao redor da colônia do isolado de BAL. O tamanho do diâmetro dos halos foi medido com o auxílio de paquímetro (King.tools®), sendo a medida de inibição, a diferença entre os diâmetros do halo de inibição frente ao patógeno menos o diâmetro do crescimento da BAL.

4.4 Confirmação da atividade bacteriocinogênica

Para confirmar o potencial bacteriocinogênico, a análise foi realizada de acordo com Fleming et al. (1975) e Harris et al. (1989), com adaptações. Os 64 isolados, que apresentaram atividade antagonista contra os patógenos, foram inoculados em tubos contendo caldo MRS e incubados a 36°C por 24h. Cada isolado foi semeado com alíquotas de 5µL, em placas contendo 10mL de ágar MRS modificado (com 0,5% de dextrose) e incubadas em aerobiose a 36°C por 24h. Logo após, foi feito uma cavidade (poço) no ágar, próximo ao crescimento e, foram acrescentados 20µL de solução de enzima (20mg.mL⁻¹). O procedimento foi repetido

para cada uma das quatro enzimas utilizadas: pepsina (de mucosa de estômago de suíno), quimotripsina (de pâncreas de bovino), proteinase K (de *Tritirachium álbum*) e tripsina (de pâncreas bovino). Como controle negativo, foram utilizados 20uL de água destilada estéril. As placas ficaram expostas durante 15 minutos em temperatura ambiente. O inóculo de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 25923 foram padronizados na escala 3 de Mc Farland (correspondendo a $9 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$) e realizadas diluições, chegando a uma população de cerca de 10^5 UFC.mL^{-1} , inoculadas em ágar BHI semi-sólido, o qual foi adicionado nas placas como uma sobrecamada. As placas foram incubadas a 36°C por 24h.

A confirmação do potencial bacteriocinogênico dos isolados de BAL se deu através da sensibilidade da substância produzida frente a uma ou mais enzimas testadas. A ausência de halo de inibição na região onde as soluções enzimáticas foram adicionadas confirmou a natureza proteica da substância inibidora.

4.5 Identificação fenotípica e molecular dos isolados potencialmente bacteriocinogênicos

Os 64 isolados de BAL que apresentaram atividade antagonista confirmada por natureza proteica, contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 25923, foram identificados em nível de gênero e espécie por meio de técnicas bioquímicas e moleculares. A identificação bioquímica foi realizada pelo Sistema Vitek®2 (BioMerieux, France), e a identificação molecular através de PCR.

4.5.1 Identificação fenotípica

Foram identificados os isolados de BAL, através do sistema Vitek, utilizando os cartões GP Test Kit VTK 2 (Gram-positivas) de acordo com instruções do fabricante no que se refere à preparação do inóculo, incubação, leitura e interpretação dos resultados. Os isolados foram recuperados em placas contendo ágar MRS com tempo inferior de 24h de crescimento a 36°C. Foram ajustados em solução salina a 0,43% em uma escala correspondendo, aproximadamente, 0,61 a 0,63 em densímetro Densicheck® (BioMerieux).

Os cartões apresentam 43 testes bioquímicos, os quais contêm tanto testes de mudança de pH como detecção de amilopeptidases e oxidases, testes de fermentação, de descarboxilação, dentre outros (urease, piruvato, sulfato de polimixina B e NaCl 6%). Esses cartões foram inoculados automaticamente por um

sistema à vácuo, e posteriormente, inseridos no módulo de incubação e leitura, submetidos a uma medida cinética fluorescente a cada 15 minutos.

Os resultados foram armazenados através de um sistema computadorizado, o qual ao final da análise emitiu um relatório referente aos testes bioquímicos, descrevendo o gênero e espécie do micro-organismo identificado, tempo de análise, e quando necessário, sugeriu outras provas bioquímicas.



Figura 1. Equipamento Vitek ®2 e cartões para identificação de bactérias Gram-positivas
Fonte: <<http://www.biomerieux.com.br/>>

4.5.2 Identificação molecular

4.5.2.1 Extração de DNA

Os isolados identificados a partir do Vitek como *Pediococcus pentosaceus*, foram recuperados em caldo MRS e incubados a 36 °C por 24h. O DNA dos isolados foi extraído de acordo com Sambrook e Russel (2001), com modificações.

Os cultivos foram transferidos para 4mL de caldo MRS e incubou-se a 37 °C, overnight. Após este período, transferiu-se 1mL de cada cultivo para microtubos, os quais foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o *pellet* foi suspenso com 100µL de STES, acrescido de 50µL de pérolas de vidro, e de 100µL de fenol-clorofórmio e agitou-se em vortex por um minuto, seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo. A precipitação do DNA foi realizada com etanol absoluto a 4 °C e cloreto de sódio 5M, com manutenção a -70 °C por 30 minutos. Após este período, foi realizada nova centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos. Para aumentar a pureza do material extraído, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com álcool etílico 70%. O material foi centrifugado novamente a 13.000 rpm por 5 minutos, e colocou-

se para secar em estufa a temperatura de 37 °C até a evaporação completa do álcool. Após, suspendeu-se o *pellet* em 30µL de água ultrapura estéril e 1µL de RNase.

Foi verificada a qualidade do DNA, a partir da pureza e quantificação da amostra em espectrofotômetro (Biospectrometer Kinetic Eppendorf) a 260nm. Após, o DNA foi diluído até a concentração de 25ng.

4.5.2.2 PCR

Para identificação do gênero *Pediococcus* spp. e da espécie *Pediococcus pentosaceus* foram utilizados oligonucleotídeos específicos, conforme a Tab. 1. A especificidade dos *primers* foi avaliada com o software *Basic Local Alignment Search Tool* – BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), os quais demonstraram 100% de homologia nas sequências quando comparadas com as depositadas no banco de dados.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para identificação em nível de gênero e espécie de *P. pentosaceus* isolados de presunto cozido fatiado.

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Identificação	Referência
PedF	GAAC TCGTGTACGTTGAAAAGTGCTGA	701	<i>Pediococcus</i> spp.	Pfannebecker e Fröhlich (2008)
PedR	GCGTCCCTCCATTGTTCAAACAAG			
PentF	GGGAACGGTTTTAGTTTTATACG	396	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Petri et al. (2013)
PentR	CTAAGAGCGGTGATGATAAG			

Os *primers* PedF e PedR amplificam um fragmento do gene 23S do DNAr presente em *Pediococcus* spp., e os *primers* PentF e PentR amplificam uma sequência genética associada à síntese de uma proteína hipotética, que ainda não se conhece a função específica, mas que está presente em *P. pentosaceus*.

Primeiramente, para identificação de *Pediococcus* spp., cada reação de 25µL foi composta por 12,5µL de Kit para PCR “Go Taq Green Master Mix 2x” (Promega Corp.), 1µL de cada *primer* (10pMol), 2µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. Para identificação de *P. pentosaceus* também foi utilizado 12,5µL do Kit

para PCR, porém 1,25µL de cada *primer* (2pMol), 1µL do DNA (25ng) e água ultra-pura até completar o volume de 25µL.

As reações foram submetidas à amplificação em termociclador (PTC-100, MJ Research®). O programa utilizado para identificação em nível de gênero se baseou em: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 32 ciclos de desnaturação a 94 °C por 0,5 minutos, anelamento a 69,5 °C por 0,5 minutos e extensão a 72 °C por 0,5 minutos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Já o programa para identificação em nível de espécie se deu da seguinte forma: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de 6 ciclos de desnaturação a 94 °C por 0,5 minutos, anelamento começando a 69 °C por 3 minutos e reduzindo 1 °C a cada ciclo, e extensão a 72 °C por 1,5 minutos. Após, mais 22 ciclos de desnaturação a 94 °C a 0,5 minutos, anelamento a 62 °C por 3 minutos e extensão a 72 °C por 1,5 minutos, e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de todas as reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) (Backer Analyzed), utilizando como marcador o *Ladder* 1kb (Invitrogen™), como controle positivo *P. pentosacus* CR006 (BioAgro-UFV), como controle negativo *S. aureus* ATCC 25923, e mais um controle da reação, a água ultra-pura estéril. Após a corrida eletroforética, foram aplicados 4µL de produto da PCR no gel, o qual foi corado com 2µL de *Gel/Red*, e visualizado sob luz UV em transiluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia®).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Fenotípica

Dos duzentos (200) isolados submetidos à caracterização morfológica (coloração de GRAM) e teste da catalase, 181 (90,5%) foram identificados como BAL, apresentando-se como Gram-positivos e catalase negativa. Destes, 134 (74,03%) apresentaram morfologia de cocos e 47 (25,97%) de bacilos (Fig. 2). Esses resultados corroboram com os encontrados por Oliveira et al. (2008) que ao pesquisarem BAL em cinco amostras de carne embaladas à vácuo de diferentes abatedouros de Belo Horizonte, também obtiveram resultados para o teste de catalase, motilidade e coloração de Gram. Além disso, também constatarem morfologia de cocos e bacilos, entre os isolados. Da mesma forma, ao analisarem 141 isolados de embutidos cárneos artesanais oriundos da Argentina, Castro et al. (2011) detectarem em 100% dos isolados coloração Gram-positiva, catalase e oxidase negativas.



Figura 2. Microscopia óptica do isolado 136, Gram-positivo e morfologia de bacilo (1.000X).

Quanto à morfologia, Moraes et al. (2010) ao isolarem BAL de leite cru e queijos nativos de Viçosa, identificaram a maioria dos isolados como cocos. Em contrapartida, Drosinos et al. (2005) encontraram em 88,6% dos isolados de salame, a morfologia de bacilos, sendo *Lactobacillus* o gênero predominante. Da mesma forma, Sawitzki et al. (2007) ao pesquisarem BAL em produtos cárneos artesanais da região noroeste do RS, também obtiveram maior percentual de *Lactobacillus*. Esses estudos demonstram que há uma diversidade em relação à microbiota nativa presente em produtos de origem animal.

5.1.2 Caracterização do potencial tecnológico

Em relação à identificação de BAL com potencial tecnológico, dos 181 isolados que foram submetidos aos testes de crescimento em diferentes: temperaturas (10°C e 45°C), concentrações de NaCl (4,5% e 6%), valores de pH (4,0 e 9,0) e fermentação da glicose (visando selecionar somente os homofermentativos), todos se desenvolveram pelo menos em uma das condições propostas. Na avaliação global, 71 isolados (39,22%) foram capazes de se desenvolver frente a todas as condições tecnológicas submetidas. Os percentuais dos isolados frente a cada condição proposta foram bastante variáveis.

Dos 181 isolados, 156 (86%) foram resistentes à temperatura de 10°C e 152 (84%) à temperatura de 45°C. Os resultados obtidos foram satisfatórios, visto que o crescimento em diferentes temperaturas possibilita verificar a capacidade dos isolados de adaptação a diferentes processos fermentativos (FRANCIOSI et al., 2009). Silva (2011) detectou em todos os isolados de queijo, a capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura. Em contrapartida, Drosinos et al. (2005) obtiveram isolados resistentes a baixas temperaturas, porém sensíveis a altas temperaturas.

Ainda, 170 (94%) isolados toleraram a concentração de 4,5% de NaCl e 167 (92%) toleraram 6% de NaCl. A tolerância a diferentes concentrações de NaCl é outra característica relevante na definição de uma cultura iniciadora para produtos cárneos, já que cepas sensíveis ao NaCl podem ter seu crescimento inibido à medida que reduz a atividade de água do produto (determina a maciez e suculência destes produtos), com consequente aumento da concentração de NaCl (THAPA et al., 2006).

Silva (2011) ao caracterizar BAL quanto ao potencial tecnológico, utilizou diferentes concentrações de NaCl (4%, 8%, 12% e 16%), e constatou que quanto maior a concentração de NaCl, maior a sensibilidade dos isolados. Em uma pesquisa com charque, 67% dos isolados se apresentaram halotolerantes, indicando potencial para aplicação em produtos cárneos salgados (BISCOLA et al., 2013). Dal Bello et al. (2012) ao analisarem isolados de BAL quanto à tolerância ao NaCl, identificaram que todas foram capazes de se desenvolver em até 6% de NaCl.

Além disso, 143 (79%) isolados do presente trabalho foram resistentes ao pH 4,0 e 171 (95%) resistentes ao pH 9,0. Salienta-se ainda, que é importante que as BAL tenham a capacidade de se desenvolver em ambientes ácidos e alcalinos (THAPA et al., 2006). O pH ácido (4 a 4,5) faz parte de muitos métodos de conservação de alimentos, pois inviabiliza o crescimento e multiplicação de muitos patógenos. As BAL homofermentativas produzem ácido lático como produto final da fermentação, que ao se acumular no meio extracelular provoca um ambiente desfavorável para muitos micro-organismos patogênicos. Muitas BAL têm a capacidade de resistir ao pH ácido do estômago e sobreviver ao pH alcalino do intestino, como no caso dos probióticos. Em suas pesquisas Silva (2011) detectou isolados de *P. pentosaceus*, *L. plantarum* e *E. durans* capazes de se desenvolver tanto em pH ácido como em alcalino (3,5 e 4,5 e 8,5).

Quanto ao tipo de fermentação, 103 (57%) isolados fermentaram glicose sem produção de CO₂ (homofermentativos). O tipo de fermentação também é fundamental quando se pretende selecionar culturas iniciadoras, visto que os micro-organismos homofermentativos, por exemplo, são vantajosos para aplicação em produtos cárneos pelo fato de não produzirem gás, propiciando maior uniformidade aos produtos. Sawitzki et al. (2007) detectaram 76% dos isolados de BAL, de embutidos artesanais, como homofermentativos. Salienta-se ainda, a importância de isolar BAL de outros produtos de origem animal, como os lácteos e seus derivados. Funck (2012) ao testar 21 isolados de leite e queijos coloniais da região Noroeste do RS quanto ao tipo de fermentação, obteve 100% dos isolados homofermentativos.

Tendo em vista os resultados acima, pode-se identificá-los como satisfatórios, visto que a escolha de todos os parâmetros utilizados foi vislumbrando a aplicação tecnológica. Entretanto, as concentrações de pH, temperatura e NaCl utilizadas propiciam a aplicação desses isolados em diferentes produtos, como produtos cárneos armazenados em refrigeração ou que passem por determinado tratamento

térmico em alguma etapa da produção, como a defumação em produtos cárneos. As faixas de pH possibilitam a aplicação desses isolados em produtos maturados, por exemplo, que vão resistir ao pH do ponto isoelétrico das proteínas da carne (pH 5,3), e quanto às concentrações de NaCl permitem a aplicação em alimentos com maior concentração de sal, impedindo a inviabilização das culturas lácticas.

Contudo, pode-se constatar que os isolados testados são promissores para possível utilização como culturas iniciadoras, principalmente em produtos cárneos, uma vez que micro-organismos isolados da microbiota natural de produtos tendem a estarem mais bem adaptados às características do alimento e as condições ambientais, contribuindo para manutenção das características sensoriais e melhor qualidade do produto.

5.2 Confirmação da atividade antagonista das BAL

Dos 71 isolados que apresentaram potencial tecnológico, 62 (87,32%) apresentaram halos inibitórios contra pelo menos um dos patógenos testados. Ressalta-se ainda que, 68 (95,8%) desenvolveram halos de inibição, quando testados contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 25923, enquanto que 55 (77,46%) inibiram o desenvolvimento de *L. monocytogenes* L90, isolado de amostras de presunto. Os diâmetros dos halos de inibição variaram entre 2 a 29 mm, 10 a 39 mm, e 3 a 27 mm, respectivamente. Pode-se constatar que os halos inibitórios produzidos por *L. monocytogenes* isolada de presunto foi menor quando comparada com as cepas de referência, o que pode ser atribuído ao fato de que o isolado estava submetido aos fatores intrínsecos do alimento, assim como os fatores ambientais, o que por sua vez pode alterar nas respostas quanto à produção de metabólitos contra determinados patógenos. Esses resultados indicam que a maioria dos isolados apresenta potencial antimicrobiano contra os patógenos de referências e o nativo da microbiota do presunto testados. Dessa forma, podem atuar como uma barreira para reduzir o índice de contaminação e deterioração dos alimentos.

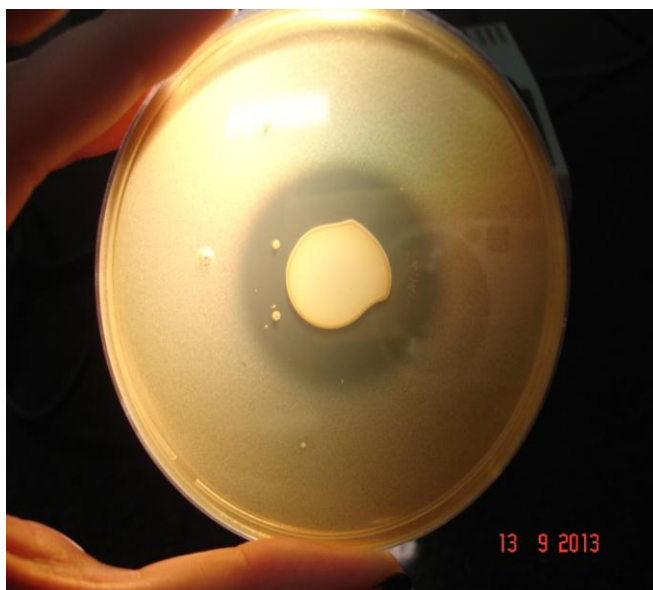


Figura 3. Presença de halo translúcido ao redor do crescimento do isolado 97 de BAL, contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Diversas pesquisas têm constatado atividade antimicrobiana de BAL contra patógenos, porém os resultados percentuais têm sido variáveis, principalmente contra bactérias Gram-positivas. Isso ocorre devido às bactérias Gram-negativas apresentarem membrana externa, dificultando a permeabilidade dos compostos antimicrobianos. No entanto, trabalhos recentes também têm apontado BAL nativas com atividade antagonista contra bactérias Gram-negativas (MEIRA et al., 2010).

Os resultados encontrados na presente pesquisa corroboram com os de Sawitzki et al. (2009), que ao isolarem BAL de linguiças artesanais fermentadas, constataram que 7 (100%) dos isolados apresentaram atividade antagonista contra *L. monocytogenes* NTC 098630, 4 (57%) contra *S. aureus* ATCC 12598 e *S. xylosus* ATCC 29971, e 3 (43%) contra *S. xylosus* isolado do produto.

Em contrapartida, Castro et al. (2011) ao verificarem o potencial antimicrobiano de isolados de BAL de linguiças artesanais oriundas da Argentina, apenas 19,15% dos isolados apresentaram atividade antagonista contra *L. innocua* e *S. aureus*. Já Rubio et al. (2014) ao isolarem BAL para aplicação em embutidos fermentados, detectaram 35% dos isolados com ação antagonista contra *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.

O meio utilizado na presente pesquisa, não possibilita identificarmos o tipo de composto que é produzido pela BAL, pois o meio MRS apresenta maior concentração de açúcar, além de não apresentar substâncias inibidoras, o que pode

propiciar tanto a produção de ácidos orgânicos, como de peróxido de hidrogênio e/ou bacteriocinas (MORAES et al., 2010).

Quanto à natureza da substância antimicrobiana, existem alternativas de minimizar a ação de ácidos e/ou peróxidos, como os meios de cultura utilizados. Os meios de cultura com baixos teores de açúcares, como o BHI e o MRS modificado (0,5% de dextrose) podem auxiliar na redução da ação de ácidos. Para evitar a produção de peróxido, a adição de uma solução de catalase (hidrolisa o peróxido de hidrogênio) ao meio de cultura e a incubação das culturas em anaerobiose são alternativas viáveis para isto (MORAES et al., 2010).

Salientando-se a importância de pesquisas com BAL isoladas de produtos de origem animal, Schittler (2012) ao isolar de leite *in natura* do oeste de Santa Catarina, e Funck (2012) ao isolar de leite *in natura* e queijos coloniais da fronteira Noroeste do RS constataram, respectivamente, 63% e 34% dos isolados de BAL de leite e queijos com atividade antagonista contra *L. monocytogenes* quando utilizado o ágar MRS.

Contudo, consideram-se satisfatórios os resultados encontrados na presente pesquisa, visto a relevância da atividade antagonista provocada por substâncias produzidas por algumas BAL contra patógenos de interesse em alimentos.

5.3 Confirmação do potencial bacteriocinogênico

Verificou-se que dos 68 isolados submetidos ao teste de atividade proteolítica, 9 (12,67%) apresentaram degradação da substância antimicrobiana produzida por estes, 21 (29,57%) a duas proteases, 18 (25,35%) a três proteases e 16 (22,53%) às quatro proteases testadas (Fig. 4). Observou-se também, que 64 (90,14%) o composto antimicrobiano sintetizado pelos isolados apresentaram sensibilidade a pelo menos uma das proteases e, 6 (8,45%) dos isolados não apresentaram sensibilidade a nenhuma das enzimas proteolíticas testadas.

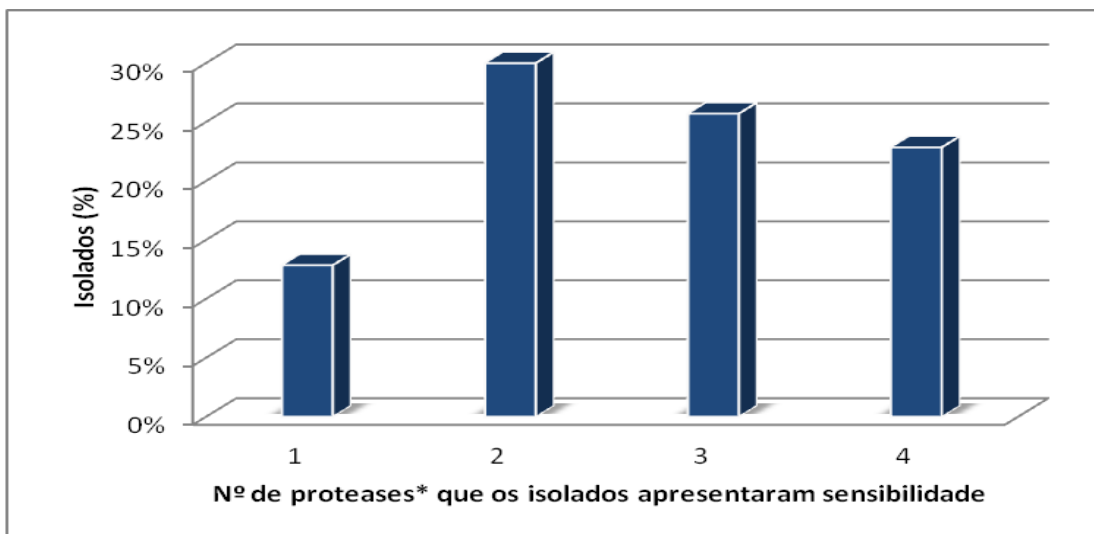


Figura 4. Percentual dos 68 isolados de BAL provenientes de presunto cozido fatiado que apresentaram compostos de natureza proteica sensíveis em relação ao número de enzimas testadas.

*enzimas: pepsina, proteinase K, quimotripsina e tripsina

Entretanto, quando há sensibilidade da substância antimicrobiana a uma protease, já ocorre inativação da substância, sendo possível inferir que a ausência de inibição do micro-organismo patogênico na presença de proteases caracteriza a natureza do composto produzido como proteica (MONTVILLE; KAISER, 1993). Nesse sentido, pode-se constatar que 64 (91%) isolados apresentaram sensibilidade ao menos uma das proteases, o que sugere que tais micro-organismos são produtores de bacteriocinas.

Arauz et al. (2009) ressaltam a necessidade de testar várias enzimas proteolíticas, já que a sensibilidade a mais de uma protease sugere a produção de mais de uma bacteriocina por cepa testada, dessa forma, aumentando a probabilidade de detecção destes compostos. Isso se dá pelo fato de que cada bacteriocina apresenta diferentes peptídeos em sua estrutura, e consequentemente sensibilidade a diferentes proteases. Com isso, avaliando somente o perfil de sensibilidade às proteases não se pode afirmar qual bacteriocina é sintetizada pelo isolado, pois como os resultados do presente estudo evidenciaram, os isolados podem sintetizar compostos de natureza proteica sensíveis a uma ou mais enzimas proteolíticas e serem classificados como bacteriocinas diferentes.

Salienta-se ainda, que esses isolados bacteriocinogênicos podem também produzir outros compostos antimicrobianos. Sabe-se que na maioria dos casos, o pH ótimo para a síntese de bacteriocinas é em torno de 5,5, então, quando associada à ação de ácidos orgânicos é vantajosa, pois propiciariam um meio favorável à

produção e expressão dessas substâncias de natureza proteicas (DROSINOS et al., 2005).

Na pesquisa desenvolvida por Dal Bello et al. (2010) confirmaram em 9,8% dos isolados potencial bacteriocinogênico, ao isolar BAL de produtos cárneos. Em contrapartida, Silva (2011) testou 41 isolados de queijo quanto ao potencial bacteriocinogênico, e detectou que 39 (95%) destes foram sensíveis às proteases, pois apenas dois isolados de *P. pentosaceus* não apresentaram atividade. Schittler (2012) isolou BAL de leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina, verificou que 307 isolados apresentaram antagonismo contra *L. monocytogenes*, e destes, 28 (9%) apresentaram atividade bacteriocinogênica. Já Biscola et al. (2013), constataram sensibilidade em dois isolados de charque frente às enzimas proteolíticas, demonstrando a natureza proteica das substâncias antimicrobianas, ou seja, potencialmente bacteriocinogênicos.

Vale ressaltar que dos 68 isolados testados no presente trabalho, 33 (48%) apresentaram sensibilidade à pepsina, 36 (53%) à proteinase K e quimotripsina, e 42 (62%) à tripsina. Pode-se constatar que os isolados apresentaram maior sensibilidade à tripsina. Os demais provavelmente não apresentam sítio lítico para essa protease. O sítio de clivagem dessa enzima é específico para cadeias laterais positivas dos resíduos de lisina e arginina (LEHNINGER et al., 2004). Nogueira (2013) testou quatro cepas padrões de BAL frente as mesmas enzimas utilizadas na presente pesquisa, e constatou 100% delas sensíveis à quimotripsina, 75% à tripsina, 50% à proteinase K e nenhuma das cepas demonstrou sensibilidade à pepsina.

A partir desses dados, observaram-se variações percentuais do potencial bacteriocinogênico dos isolados. De Martins et al. (2001) sugere que esse fato pode ser atribuído às diferenças intrínsecas das amostras, assim como o micro-organismo investigado e àquele utilizado como indicador.

5.4 Identificação fenotípica e molecular dos isolados potencialmente bacteriocinogênicos

5.4.1 Identificação fenotípica

Os 64 isolados que apresentaram potencial tecnológico e bacteriocinogênico foram identificados em nível de gênero e espécie, por meio do sistema Vitek. Pode-

se constatar que as espécies predominantes foram: 2 (3,12%) *Enterococcus faecium*, 6 (9,37%) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 10 (15,62%) *Leuconostoc* spp., e 15 (23,43%) *Pediococcus pentosaceus* (Anexo A - F). Esses resultados demonstram a diversidade de BAL presente na microbiota do produto analisado.

Com base nos resultados obtidos, *P. pentosaceus* foi o micro-organismo predominante entre os identificados, sendo um resultado vantajoso, visto a ampla aplicação desse micro-organismo em diversos alimentos, inclusive em produtos cárneos. Pode-se verificar na Tab. 2 que há variação no perfil bioquímico dos 15 isolados identificados como *P. pentosaceus*. Essa variação pode ser, em virtude de cada isolado apresentar um perfil diferente, o que nos permite inferir que não são clones. Além disso, apresentam comportamento e capacidade de adaptação a diferentes condições, como podemos perceber nos resultados quanto à atividade antagonista contra *L. monocytogenes* e *S. aureus* e quanto ao potencial bacteriocinogênico (Apêndice A). Além disso, o sistema Vitek fornece características importantes para aplicação tecnológica. No caso da degradação de lactose, por exemplo, podemos identificar nos resultados abaixo (Tab.2), que somente um isolado degrada lactose, o que pode não ser um resultado satisfatório, se for analisado do ponto de vista da elaboração de embutidos, que é adicionado leite em pó, para ser degradado pelos isolados. Além disso, 11 isolados conseguem tolerar a concentração de 6,5% de NaCl, o que é um resultado vantajoso, se analisado do ponto de vista tecnológico, como por exemplo para uma futura aplicação em alimentos que envolvem uma alta concentração salina. Então, esses resultados discriminados referentes aos testes bioquímicos são de suma importância, visto que permite analisar individualmente cada isolado frente a todos os testes, permitindo correlacionar probabilidades de aplicação em diferentes produtos.

T / I	28	38	40	47	97	99	106	107	201	210	219	223	235	28 [*]	35
AlaA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TyrA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dSOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
POLYB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
dGAL	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
dRIB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
ILATk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
dMAL	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
BACI	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NOVO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
NC6.5	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
dMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dMNE	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
MBdG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
drRAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O129R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

T / I	28	38	40	47	97	99	106	107	201	210	219	223	235	28*	35
SAL	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
dTRE	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
ADH2s	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
OPTO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

T: testes bioquímicos; I: isolados

AMY - D-AMIGDALINA AMY 0.1875 mg
APPA - Ala-Fe-Pro ARILAMIDASE APPA 0.0384 mg
LeuA - Leucina ARILAMIDASE LeuA 0.0234 mg
AlaA - Alanina ARILAMIDASE AlaA 0.0216 mg
dRIB - D-RIBOSE dRIB 0.3 mg
NOVO - RESISTÊNCIA À NOVOBIOCINA NOVO 0.000075 mg
dRAF - D-RAFINOSE dRAF 0.3 mg
PIPLC - FOSFATIDILINOSITOL FOSFOLIPASE C PIPLC 0.015 mg
CDEX - CICLODEXTRINA CDEX 0.3 mg
ProA - L-Prolina ARILAMIDASE ProA 0.0234 mg
TyrA - Tirosina ARILAMIDASE TyrA 0.0276 mg
ILATk - Alcalinização L-LACTATO ILATk 0.15 mg
NC6,5 - CRESCIMENTO EM NaCl 6,5% NC6.5 1.68 mg
0129R - RESISTÊNCIA O/129 (comp.vibrio.) O129R 0.0084 mg
dXYL - D-XILOSE dXYL 0.3 mg
AspA - L-Aspartato ARILAMIDASE AspA 0.024 mg
BGURr - BETA-GLUCURONIDASE BGURr 0.0018 mg
dSOR - D-SORBITOL dSOR 0.1875 mg
LAC - LACTOSE LAC 0.96 mg
dMAN - D-MANITOL dMAN 0.1875 mg
SAL - SALICIN SAL 0.3 mg

ADH1 - ARGININA DIHIDROLASE 1 ADH1 0.111 mg
BGAR - BETA GALACTOPIRANOSIDASE BGAR 0.00204 mg
AGAL - ALFA-GALACTOSIDASE AGAL 0.036 mg
URE - UREASE URE 0.15 mg
NAG - N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA NAG 0.3 mg
dMNE - D-MANOSE dMNE 0.3 mg
SAC - SACAROSE/SUCROSE SAC 0.3 mg
BGAL - BETA-GALACTOSIDASE BGAL 0.036 mg
AMAN - ALFA-MANOSIDASE AMAN 0.036 mg
PyrA - L-Pirrolidonil ARILAMIDASE PyrA 0.018 mg
POLYB - RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B POLYB 0.00093 mg
dMAL - D-MALTOSE dMAL 0.3 mg
MBdG - METIL-B-D-GLUCOPIRANOSIDA MBdG 0.3 mg
dtRE - D-TREALOSE dtRE 0.3 mg
AGLU - ALFA-GLUCOSIDASE AGLU 0.036 mg
PHOS - FOSFATASE PHOS 0.0504 mg
BGUR - BETA-GLUCURONIDASE BGUR 0.0378 mg
dGAL - D-GALACTOSE dGAL 0.3 mg
BACI - RESISTÊNCIA À BACITRACINA BACI 0.0006 mg
PUL - PULULANO PUL 0.3 mg
ADH2s - ARGININA DIHIDROLASE 2 ADH2s 0.27 mg
OPTO - RESISTÊNCIA À OPTOQUINA OPTO 0.000399 mg

Os métodos de identificação rápida têm contribuído significativamente no conhecimento da microbiota de diversos alimentos, inclusive produtos cárneos, auxiliando na identificação em nível de gênero e espécie. Porém, testes complementares são necessários, pois se considera que os testes de identificação fenotípica não são tão precisos, por isso devem ser complementados por testes moleculares. A fim de ilustrar o exposto, Benito et al. (2008) ao submeterem à identificação fenotípica, isolados de BAL de embutidos fermentados, através do kit API 50 CHL, constataram diferenças nos resultados em nível de gênero e espécie quando comparados às técnicas moleculares.

Freitas (2011) ao isolar BAL de produtos lácteos do Estado da Paraíba, também obtiveram identificações errôneas, ao utilizar kit rápido para testes bioquímicos. De um total de 20 isolados, 12 (60%) foram identificados, sendo seis *L. lactis* subsp. *cremoris*, um *L. lactis* subsp. *lactis*, um *L. mesenteroides*, um *P. damnosus*, três *Pediococcus* spp. e cinco *Lactobacillus* spp., três não foram identificadas. Porém, os *Lactobacillus* spp. identificados apresentavam morfologia de cocos, o que sugeriu testes complementares.

5.4.2 Identificação molecular

Com base nos resultados obtidos pela identificação bioquímica, pode-se constatar que além de *P. pentosaceus* ter sido a espécie predominante, também é a espécie com maior potencial para aplicação em produtos cárneos. Por esse motivo, foram selecionadas para identificação em nível de gênero e espécie por PCR. Dos 15 isolados, identificados inicialmente como *P. pentosaceus* pelo perfil bioquímico, 7 (46,66%) foram confirmados por PCR tanto para gênero como para espécie, conforme Fig. 5 e Fig. 6.

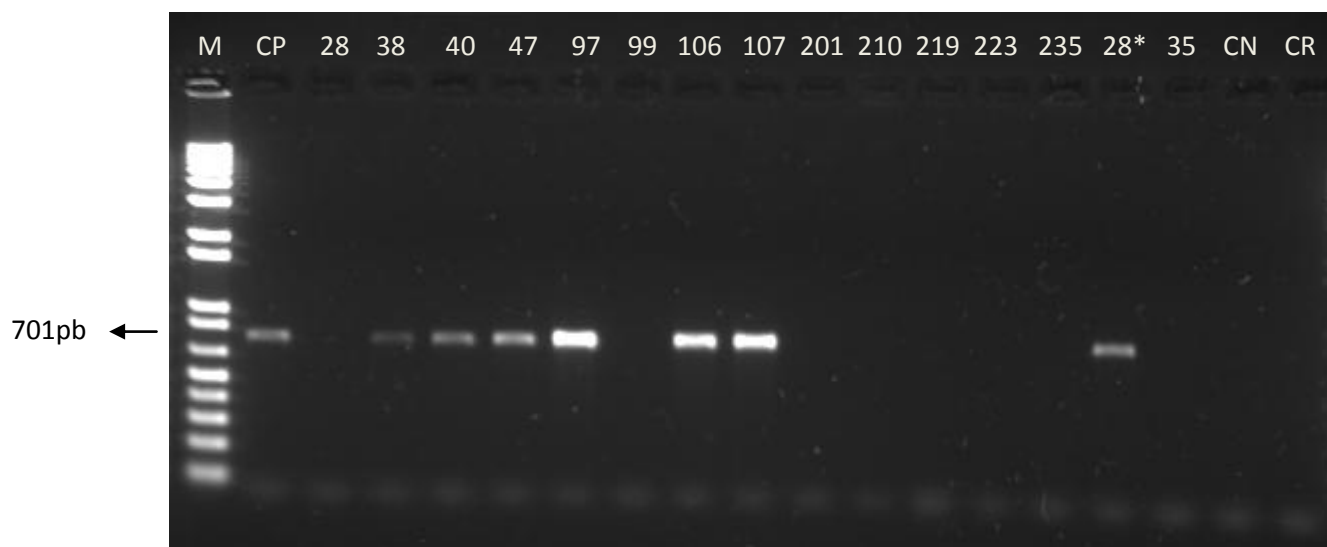


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos da PCR para confirmação do gênero *Pediococcus* spp. para identificação do gene 23S com amplificação no fragmento 701pb.

M – Marcador Ladder 1kb; CP – Controle positivo: *P. pentosaceus* CR006 (BioAgro-UFV); CN – Controle negativo: *S. aureus* ATCC 25923 CR: Controle da reação (água ultra-pura estéril); 28-35 – Isolados de *P. pentosaceus*.

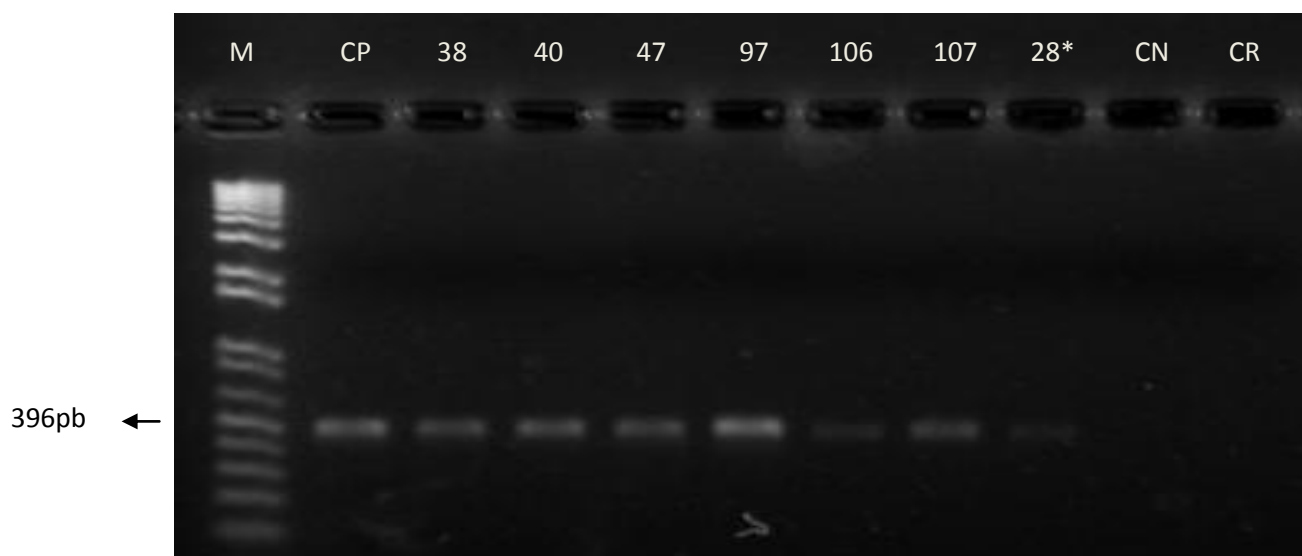


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos da PCR para confirmação de *P. pentosaceus*, para identificação de uma sequência de uma proteína hipotética com amplificação no fragmento 396pb.

M – Marcador Ladder 1kb; CP – Controle positivo: *P. pentosaceus* CR006 (BioAgro-UFV); CN – Controle negativo: *S. aureus* ATCC 25923 CR: Controle da reação (água ultra-pura estéril); 38 – 28*: Isolados de *P. pentosaceus*.

Os *primers* (*PedF* e *PedR*) utilizados para a identificação em nível de gênero foram os mesmos utilizados por Pfannebecker e Fröhlich (2008), que ao isolarem BAL de 100 amostras de vinho obtiveram 47 isolados de *Pediococcus*. Todorov e Dicks (2009) isolaram BAL de bebidas fermentadas e as identificaram por técnicas

bioquímicas e moleculares como *P. pentosaceus* potencialmente bacteriocinogênicas. Petri et al. (2013) ao isolarem BAL de vinho também obtiveram sucesso na identificação de *P. pentosaceus* utilizando os mesmos oligonucleotídeos do presente estudo (*PentF* e *PentR*).

Já Wanangkarn et al. (2014) verificaram BAL oriundas de embutidos fermentados. Dentre elas, 7 espécies foram identificadas, como *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *P. pentosaceus*, *L. mesenteroides* e *L. lactis*. Já Federici et al. (2014) obtiveram 186 isolados de BAL de produtos cárneos e identificaram 15 (8%) destes como *L. sakei*, e 9 (5%) como *P. pentosaceus*.

No mesmo sentido, uma pesquisa desenvolvida ao isolar BAL de 15 amostras de salames artesanais, obtiveram 420 isolados. Destes, 74 (18%) confirmaram molecularmente para *P. pentosaceus*. Além disso, apresentaram crescimento quando submetidos a testes de diferentes temperaturas (15°C e 45°C) e concentrações de NaCl (4% e 6,5%), condições semelhantes às desenvolvidas em nosso estudo (DANILOVÍC et al., 2011).

Neste sentido, a relação dos resultados da caracterização fenotípica, assim como a atividade antagonista contra patógenos, sensibilidade a proteases, e análises bioquímicas e moleculares nos permitiu verificar diferentes características e perfis dos isolados testados.

6 CONCLUSÕES

Sete isolados de BAL, provenientes de amostras de presunto cozido fatiado, caracterizados fenotipicamente e molecularmente como *Pediococcus pentosaceus* apresentam um amplo espectro de aplicação, pois se desenvolveram em todas as condições tecnológicas propostas, bem como na segurança contra patógenos por apresentarem potencial bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- 1) Avaliar a atividade antagonista dos sete isolados de *P. pentosaceus* contra outros patógenos gram-positivos e gram-negativos;
- 2) Identificar o gene responsável pela produção e regulação da bacteriocina, através do sequenciamento do gene 16S do rDNA de *P. pentosaceus*;
- 3) Determinar a curva de crescimento de *P. pentosaceus* e a curva de produção das pediocinas;
- 4) Quantificar a atividade antimicrobiana dos sete isolados de *P. pentosaceus*;
- 5) Selecionar o isolado de maior atividade antimicrobiana;
- 6) Purificar e caracterizar a bacteriocina quanto ao peso molecular e sequência de aminoácidos, através de métodos cromatográficos e espectrofotométricos, assim como avaliar a toxicidade, concentração mínima inibitória e concentração bactericida mínima;
- 7) Aplicar a bacteriocina purificada e caracterizada em um sistema alimentar, e avaliar sua atividade como bioconservante.

REFERÊNCIAS

ACUÑA, L.; PICARIELLO, G.; SESMA, F.; MORERO, R.; BELLOMIO, A. A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. **FEBS Open Bio**, v.2, p. 12-19, 2012.

ALBANO, H., OLIVEIRA, M., AROSO, R., CUBERO, N., HOGG, T.; TEIXEIRA, P. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from Alheiras (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. **Meat Science**, v.76, p.796–800, 2007.

ALBANO, H.; PINHO, C.; LEITE, D.; BARBOSA, J.; SILVA, J.; CARNEIRO, L.; MAGALHAES, R.; HOGG, T.; TEIXEIRA, P. Evaluation of a bacteriocin-producing strain of a *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for Alheirall, a fermented meat sausage. **Food Control**, v.20, p. 764-770, 2009

AMMOR, M.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v. 76, n. 1, p. 138-146, 2007.

ANASTASIADOU, S., PAPAGIANNI, M., FILIOUSIS, G., AMBROSIADIS, I., KOIDIS, P., Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization. **Bioresour. Technology**, v.99, p.5384-5390, 2008.

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

AXELSSON, L. Acid lactic bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S. *et al.* **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 3 ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2004.

BARROS, J. R. **Aplicação de nisina em tripa natural para o controle de micro-organismos deteriorantes em salsichas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos químicos e bioquímicos) – Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul.

BENEDUCE, L.; SPANO, G.; VERNILE, A.; TARANTINO, D.; MASSA, S. Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. **Journal of Basic Microbiology**, v.44, p.10–16, 2004.

BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, p.320-338, 2010.

BISCOLA, V.; TODOROV, S.; CAPUANO, V.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. **Meat Science**, v.93, p.607-613, 2013.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2001. Legislação. VisaLegis. Resolução RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001a. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf. Acesso em: 15 de julho de 2014

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.135-144, 2006.

CAMPAGNOL, P.C. **Cultura starter produzida em meio de cultura de plasma suíno e antioxidante natural na elaboração de salame**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal Food Microbiology**, v.50, p.131–149, 1999.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v.79, p.483–499, 2008.

CASTRO, M.P.; PALAVECINO, N.Z.; HERMAN, C.; GARRO, O.A.; CAMPOS, C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat Science** v. 87, p. 321–329, 2011.

CHAKCHOUK-MTIBAA, A.; ELLEUCH, L.; SMAOUI, S.; NAJAH, S.; SELLEM, S.; MEJDOUB, H.; ABDELKAFI, S.; MELLOULI, L. Characterization of the bacteriocin BacJ1 and its effectiveness for the inactivation of *Salmonella* Typhimurium during turkey escalope storage. **Food Chemistry**, v.152, p.566-572, 2014.

CHEICKHYOUSSEF, A.; POGORI, N.; CHEN, W.; ZHANG, H. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.215-222, 2008.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001.

CORBO, R. M.; BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; D'AMATO, D.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 223–241, 2009.

COTON, M.; ROMANO, A.; SPANO, G.; ZIEGLER, K.; VETRANA, C.; DESMARAIS, C.; LONVAUD-FUNEL, A.; LUCAS, P.; COTON, E. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. **Food Microbiology**, v.27, p.1078-1085, 2010.

DAI, Z.; LI, Y.; WU, J.; ZHAO, Q. Diversity of Lactic Acid Bacteria during Fermentation of a Traditional Chinese Fish Product, *Chouguiyu* (Stinky Mandarinfish). **Journal of Food Science**, v. 78, n. 11, 2013.

DAL BELLO, B.; RANTSIOUA, K.; BELLIO, A.; ZEPPAA, G.; AMBROSOLIA, R.; CIVERAB, T.; COCOLINA, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of autochthonous populations. **LWT. Food Science and Technology**, v.43, p.1151-1159, 2010.

DAL BELLO, B.; COCOLIN, L.; ZEPPA, G.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. **International Journal Food Microbiology**, v.153, p. 58–65, 2012.

DANILOVÍCK, B.; JOKOVIĆ, N.; PETROVÍCK, L.; VELJOVIĆ, K.; TOLINACKÍ, M.; SAVÍČ, D. The characterization of lactic acid bacteria during the fermentation of an artisan Serbian sausage (Petrovská Klobása). **Meat Science**, v.88, p.668-674, 2011.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. Fundamentals and perspectives of the use of bacteriocins by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v.18, n.2, p.191–208, 2002.

DE MARTINIS, E.C.P, PÙBLIO, M.R.P., SANTAROSA, P.R., FREITAS, F.Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.32-37, 2001.

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 13, p.194–199, 2007.

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

DOBSON, C.M.; DENEER, H.; LEE, S.; HEMMINGSEN, S.; GLAZE, S.; ZIOLA, B. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus clausenii*, a novel lactic acid bacterium isolated from beer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2003–2010, 2002.

DROSINOS, E.H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; GAITIS, G.; MOSCHONAS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, p.307-317, 2005.

FEDERICI, S.; CIARROCCHI, F.; CAMPANA, R.; CIANDRINI, E.; BLASI, G.; BAFFONE, W. Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from Ciauscolo salami produced in Central Italy. **Meat Science**, v.98, p. 575-584, 2014.

FERNÁNDEZ-GINÉS, J.M.; FERNÁNDEZ-LOPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E.; SENDRA, E.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Effect of storage conditions on quality characteristics of Bologna sausages made with citrus Fiber. **Journal of Food Science**, v.68, p.710-715, 2003

FERREIRA, C. L. L. F. **Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas**. In: Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção. Viçosa: Célia L. L. F. 206 p. 2003.

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. **Applied Microbiology**, v.30, n.6, p.1040-1042, 1975.

FOULQUIÉ MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p.1-24, 2006.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v.19, p.3–11, 2009.

FRANCO, B.D.G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 195p.

FREITAS, W. C. **Aspectos higiênico-sanitários, físico-químicos e microbiota láctica de leite cru, queijo de coalho e soro de leite produzidos no Estado da Paraíba**. 2011. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. **Wine microbiology: practical applications and procedures**. 2.ed. Springer, 2007.

FUNCK, G. D. **Atividade antagonista de bactérias ácido lácticas frente a patógenos e caracterização microbiológica e físico-química de amostras de leite in natura e queijos coloniais da região fronteira noroeste do estado do Rio Grande do Sul**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N.B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews Biotechnology**, v.28, n.2, p. 125-152, 2008.

GARDE, S.; AVILA, M.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Proteolysis of Hispanico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INIA 639. **Journal Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 840-849, 2006.

GUINANE, C.M.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. **Journal Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1316-1325, 2005.

HAJIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; BELMA ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal Dairy Technology**, v.60, p.105- 108, 2007.

HARRIS, L. J.; DAESCHEL, M. A.; STILES, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.52, p.384-387, 1989.

HERREROS, M.; SANDOVAL, H.; GONZALEZ, L.; CASTRO, J.; TORNADIJO, M. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **Food Microbiology**, v.22, p. 455–459, 2005.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.365-373, 2001.

HUGENHOLTZ, J. The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. **International Dairy Journal**, v.18, p.466–475, 2008.

HUTKINS, R. W. **Microbiology and technology of fermented foods**. Iowa: Blackweel Publishing, 2006.

INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. Revisão: As bactérias do ácido láctico do vinho – Parte I, **Ciência Técnica Vitivinícola**, v.23, p.81-96, 2008.

KOUAKOU, P.; GHALFI, H.; DESTAIN, J.; DUBOIS DAUPHIN, R.; EVRARD, P; THONART, P. Effects of curing sodium nitrite additive and natural meat fat on growth control of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CWBI-B28. **Food Microbiology**, v.26, n.6, p.623-628, 2009

LEHNINGER A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger **Principles of Biochemistry**, W. H. Freeman, New York, 2004.

LEPE, J.; LEAL, B. **Microbiología enológica: fundamentos de vinificación**. 3.ed. Mundi-Prensa Libros, 2004.

LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A.. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.

LÜCKE, F. K. Fermented meat products. **Food Research International**, v.27, p.299–307, 2000.

MADEIRA, C.; GARCÍA, P.; JANSEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 213-222, 2003.

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal Bacteriology**, v. 189, p. 1199–1208, 2007.

MATAMOROS, S.; PILET, M. F.; GIGOUT, F.; PREVOST, H.; LEROI, F. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. **Food Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 638-644, 2009.

MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; MEDINA, L. F. C.; BRANDELLI, A. Atividade antagonística de *Lactobacillus* frente a bactérias de importância em alimentos. In: 3º Simpósio de Segurança Alimentar, 2010, Florianópolis. **Anais do 3º Simpósio de Segurança Alimentar**. Florianópolis: SBCTA, 2010.

MIRALLES, M.; FLORES, J.; PERES-MARTINEZ, G. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. **Food Microbiology**, v.13, p.227–236, 1996.

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SINGH, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**, v.9, n.4, p. 190-198, 2008.

MONTVILLE, T.J.; KAISER, A. Antilisterial proteins classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins, In: HOOVER, D.G.; STEENSON L.R. (ed.), Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Academic Press**, p. 1-22, 1993.

MORAES, P. M. et al. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1320-1324, 2010.

MURINA, P.M. . **Bacteriocins for control of listeria ssp.in food**. Journal of Food Protection, Iowa, 1996. , p.54-63. Supplement.

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

NAVARO, L.; ZARAZAGA, M.; SÁENZ, J.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.44-51, 2000.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, v.55, p.299-305, 2008.

NGUYEN, H.; ELEGADO, F.; LIBROJO-BASILIO, N.; MABESA, R.; DIZON, E. Isolation and characterisation of selected lactic acid bacteria for improved processing of *Nem chua*, a traditional fermented meat from Vietnam. **Beneficial Microbes**, v.1, n.1, p.67-47, 2010.

NIETO-ARRIBAS, P.; SESEÑA, S.; POVEDA, J. M.; PALOP, L.; CABEZAS, L. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.1505–1517, 2009.

NOGUEIRA, M. B. **Atividade antagônica de *Lactobacillus brevis* e *Bifidobacterium lactis* contra *Streptococcus mutans* e sua viabilidade na forma livre e microencapsulada em goma de mascar**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

OLIVEIRA, C. P.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P.; SILVA, J. A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. **Revista Verde**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2012.

OLIVEIRA, L. A. T. Biofilme na indústria de alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, p. 33-35, 2006.

OLIVEIRA, R. B. P.; OLIVEIRA, A. L.; GLÓRIA, M. B. A.. Screening of lactic acid bacteria from vacuum packaged beef for antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 368-374, 2008.

PAPAGIANNI, M.; ANASTASIADOU, S. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. **Microbial Cell Factories**, v. 8. n. 3, 2009.

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, 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.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.3, p.521-542, 2007.

PEREIRA, A. C. S. Alergia alimentar: sistema imunológico e principais alimentos envolvidos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.29, n.2, p.189-200, 2008.

PETRI, A.; FANNEBECKER, J.; FRÖHLICH, J.; KÖNIG, H. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. **International Journal Food Microbiology**, v.33, p.48-50, 2013.

PFANNEBECKER, J.; FRÖHLICH, J. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. **International Journal Food Microbiology**, v.128, p.288-296, 2008.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v.15, p.546-553, 2007.

POTHAKOS, V.; SNAUWAERT, C.; VOS, P.; HUYS, G. Psychrotrophic members of *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium* dominate at the end of shelf-life in packaged and chilled-stored food products in Belgium. **Food Microbiology**, n.39, p. 61-67, 2014.

PRIDMORE, R. D.; PITTET, A-C.; PRAPLAN, F.; CAVADINI, C. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC533 and its role in anti-Salmonella activity. **FEMS Microbiol Letters**, n. 283, p. 210–215, 2008.

RUBIO, R.; JOFRÉ, A.; MARTÍN, B.; AYMERICH, T.; GARRIGA, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. **Food Microbiology**, v.38, p.303-311, 2014.

ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. (2007) Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, 104, 915-923.

SAKALA, R. M.; HAYASHIDANI, H.; KATO, Y.; KANEUCHI, C.; OGAWA, M. Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.1, p.173–179, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAWITZKI, M. C.; FIORENTINI, A. M.; BROD, F. C. A.; TAGLIARI, C.; BERTOL, T. M.; ARISI, A. C. M.; SANT'ANA, E. S.. Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented sausages. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 547-552, 2007.

SAWITZKI, M. C.; TERRA, N. N.; FIORENTINI, A. M. *Lactobacillus plantarum* isolados de salames artesanais naturalmente fermentados e suas propriedades tecnológicas como culturas iniciadoras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v, 29, n.2, p.340-345, 2009.

SCHITTLER, L. B. T. **Isolamento e Caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite in natura da região oeste**

de Santa Catarina. 2012. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SCHROETER, J.; KLAENHAMMER, T. Genomics of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.292, p. 1–6, 2009.

SEBASTIAN, P.; HERR, P.; FISCHER, U.; KÖNIG, H. Molecular identification of lactic acid bacteria occurring in must and wine. **South African Journal Enology Viticulture**, v.32, p.300-309, 2011.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 405–440, 2004.

SILVA, L. J. M. **Isolamento e caracterização bioquímica das bactérias do ácido láctico do queijo São Jorge.** 2011. Dissertação (Mestrado em tecnologia e Segurança Alimentar). Angra do Heroísmo: Universidade dos Açores.

SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. B.; DIMITROV, Z. H. P. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 692–701, 2009.

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

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; BEGANOVIC, J.; PAVUNC, A. L.; HABKANIC, K.; MATOSIC, S. Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 296–307, 2010.

TERRA, A.; FRIES, L.; TERRA, N. **Particularidades na fabricação do salame.** São Paulo: Varela, 2004.

TEUSINK, B.; SMID, E. J. Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.4, n.1, p.46-56, 2006.

THAPA, N.; PAL, J.; TAMANGA, J. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas, *International Journal of Food Microbiology*, v. 107, p. 33-38, 2006.

THOMAS, L. V.; CLARKSON, M. R., DELVES-BROUGHTON. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p.37–44, 2000.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against gram-negative bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 318–326, 2005.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 38; p.166-172, 2007.

TODOROV, S. D. & DICKS, L. M. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). **International Journal Food Microbiology**, v.132, n.3, p.117-126, 2009.

TOPISIROVIC, L.; KOJIE, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I. ; LOZO, J. Potencial of lactic acid bacteria isolated from natural niches in food production and preservation. **International Journal Food Microbiology**, v 112, n. 3, p. 230-235, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed; 2005.

VÁSQUEZ, S. M.; SUAREZ, H. Y.; ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas em La conservación de La carne. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 36, n. 1, p. 64-71, 2009.

ZAMBONELLI, Carlo. **Microbiologia e biotecnologia dei vini: I processi biologici e lê tecnologie della vinificazione**. Edagricole, 2003.

ZHU, M.; DU, M.; CORDRAY, J.; AHN, D. U. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, p. 34–42, 2005.

WANANGKARN, A.; LIU, D.; SWETWIWATHANA, A.; JINDAPRASERT, A.; PHARAEPHAISARN, C.; CHUMNQOEN, W.; TAN, F. Lactic acid bacterial population dynamics during fermentation and storage of Thai fermented sausage according to restriction fragment length polymorphismanalysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 61–67, 2014.

Apêndices

Apêndice A – Tabela referente aos resultados da atividade antagonista e potencial bacteriocinogênico de 15 isolados de BAL identificados pelo sistema Vitek ®2

Isolado	Atividade antagonista (mm)			Natureza Proteica			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>L. monocytogenes</i> isolado	PtnK	Quim.	Trip.	Pep.
28	39	13	13	-	+	+	+
38	26	16	5	-	+	+	+
40	18	13	15	+	+	+	+
47	20	13	7	+	+	+	+
97	28	5	4	-	+	+	+
99	10	25	17	-	-	+	-
106	15	21	10	+	-	+	+
107	31	5	4	-	-	+	+
201	-	18	16	+	+	+	+
210	23	10	4	-	+	+	+
219	9	7	5	-	+	-	+
223	24	-	13	+	-	-	+
235	28	18	14	-	+	+	+
28*	27	12	27	-	-	-	+
35	24	17	15	+	-	+	+

PtnK: proteinase K; Quim.: quimotripsina; Trip.: tripsina; Pep.: pepsina; -: ausência de halo inibitório.

Anexos

ANEXO A – Identificação de BAL pelo sistema Vitek ®2

Cliente bioMérieux:

Universidade Federal de Pelotas
Relatório da Cassete

Impresso a: 2/Jul/2014 09:13 BRT

Informações Gerais

Aparelho: VK2C6628
Hora Carregamento: 1/Jul/2014 10:54 BRT

Informações da Cassete

ID da Cassete: 1
Nome Técnico Config: labmicro
Modo de Diluição: Pré-diluído

Posição	Tipo Carta	Cód. Barras	Acesso #	Micorg.	Testes Orient.	Quant Micrg.	Mensagem
1	GP	2423179201658989	Ju DCTA 320-1	Leuco.mes.dext.			Ejectado
2	GP	2423179201658990	Ju DCTA 319-1	Lc.lactis cremoris			Ejectado
3	GP	2423179201659024	Ju DCTA 05-1	Leuco.mes.dext.			Ejectado
4	GP	2423179201659025	Ju DCTA 10-1	Unidentified			Ejectado
5	GP	2423179201659026	Ju DCTA 09-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
6	GP	2423179201658961	Ju DCTA 01-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
7	GP	2423179201658960	Ju DCTA 47-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
8	GP	2423179201658959	Ju DCTA 04-1	Str.alactolyticus			Ejectado
9	GP	2423179201658956	Ju DCTA 11-1	Leuco.citreum			Ejectado
10	GP	2423179201658955	Ju DCTA 28-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado

ANEXO B - Identificação de BAL pelo sistema Vitek ®2

Cliente bioMérieux:

Universidade Federal de Pelotas

Relatório da Cassete

Impresso a: 2/Jul/2014 09:15 BRT

Informações Gerais

Aparelho: VK2C6628
 Hora Carregamento: 1/Jul/2014 10:13 BRT

Informações da Cassete

ID da Cassete: 2
 Nome Técnico Config: labmicro
 Modo de Diluição: Pré-diluído

Posição	Tipo Carta	Cód. Barras	Acesso #	Microrg.	Testes Orient.	Quant Micrg.	Mensagem
1	GP	2423179201658812	Ju DCTA 35-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
2	GP	2423179201658813	Ju DCTA 127-1	Unidentified			Ejectado
3	GP	2423179201658815	Ju DCTA 223-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
4	GP	2423179201658816	Ju DCTA 219-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
5	GP	2423179201658814	Ju DCTA 217-1	Entero.faecium			Ejectado
6	GP	2423179201658817	Ju DCTA 97-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
7	GP	2423179201658818	Ju DCTA 231-1	Leuco.mesen.cremoris			Ejectado
8	GP	2423179201658819	Ju DCTA 232-1	Aerc.viridans			Ejectado
9	GP	2423179201658820	Ju DCTA 226-1	Aerc.viridans			Ejectado
10	GP	2423179201658821	Ju DCTA 234-1	Lc.lactis cremoris			Ejectado

ANEXO C - Identificação de BAL pelo sistema Vitek ®2

Universidade Federal de Pelotas
 Relatário da Cassete

Cliente bioMérieux:

Impresso a: 2/Jul/2014 09:15 BRT

Informações Gerais

Aparelho: VK2C6628
 Hora Carregamento: 1/Jul/2014 10:18 BRT

Informações da Cassete

ID da Cassete: 3
 Nome Técnico Config: labmicro
 Modo de Diluição: Pré-diluído

Posição	Tipo Carta	Cód. Barras	Acesso #	Microrg.	Testes Orient.	Quant Micrg.	Mensagem
1	GP	2423179201658875	Ju DCTA 16-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
2	GP	2423179201658840	Ju DCTA 17-1	Entero.faecium			Ejectado
3	GP	2423179201658845	Ju DCTA 19-1	Lc.lactis cremoris			Ejectado
4	GP	2423179201658844	Ju DCTA 20-1	Lc.lactis cremoris			Ejectado
5	GP	2423179201658843	Ju DCTA 26-1	Unidentified			Ejectado
6	GP	2423179201658842	Ju DCTA 27-1	Leuco.mes.dext.			Ejectado
7	GP	2423179201658841	Ju DCTA 13-1	Unidentified			Ejectado
8	GP	2423179201658839	Ju DCTA 148-1	Unidentified			Ejectado
9	GP	2423179201658877	Ju DCTA 201-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
10	GP	2423179201658876	Ju DCTA 206-1	Str.sobrinus			Ejectado

ANEXO D - Identificação de BAL pelo sistema Vitek ®2

Cliente bioMérieux:

Universidade Federal de Pelotas
Relatório da Cassete

Impresso a: 2/Jul/2014 09:16 BRT

Informações Gerais

Aparelho: VK2C6628

Hora Carregamento: 1/Jul/2014 10:37 BRT

Informações da Cassete

ID da Cassete: 5

Nome Técnico Config: labmicro

Modo de Diluição: Pré-diluído

Posição	Tipo Carta	Cód. Barras	Acesso #	Microrg.	Testes Orient.	Quant Micrg.	Mensagem
1	GP	2423179201658962	Ju DCTA 236-1	Unidentified			Ejectado
2	GP	2423179201658963	Ju DCTA 235-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
3	GP	2423179201658964	Ju DCTA 210-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
4	GP	2423179201658984	Ju DCTA 213-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
5	GP	2423179201658985	Ju DCTA 312-1	Lc.lactis cremoris			Ejectado
6	GP	2423179201658986	Ju DCTA 309-1	Unidentified			Ejectado
7	GP	2423179201658987	Ju DCTA 315-1	Granuli.adiacens			Ejectado
8	GP	2423179201658988	Ju DCTA 313-1	Leuco.mes.dext.			Ejectado
9	GP	2423179201658958	Ju DCTA 89-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
10	GP	2423179201658957	Ju DCTA 318-1	Lc.lactis cremoris			Ejectado

ANEXO E - Identificação de BAL pelo sistema Vitek ®2

Universidade Federal de Pelotas
 Relatório da Cassete

Cliente bioMérieux:

Impresso a: 2/Jul/2014 09:16 BRT

Informações Gerais

Aparelho: VK2C6628
 Hora Carregamento: 1/Jul/2014 11:05 BRT

Informações da Cassete

ID da Cassete: 6
 Nome Técnico Config: labmicro
 Modo de Diluição: Pré-diluído

Posição	Tipo Carta	Cód. Barras	Acesso #	Microrg.	Testes Orient.	Quant Micrg.	Mensagem
1	GP	2423179201658822	Ju DCTA 50-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
2	GP	2423179201658824	Ju DCTA 08-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
3	GP	2423179201658823	Ju DCTA 30-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
4	GP	2423179201658835	Ju DCTA 38-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
5	GP	2423179201658834	Ju DCTA 39-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
6	GP	2423179201658833	Ju DCTA 40-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
7	GP	2423179201658832	Ju DCTA 19A-1	Leuco.pseudomesent.			Ejectado
8							
9							
10							

ANEXO F - Identificação de BAL pelo sistema Vitek ®2

Universidade Federal de Pelotas
 Relatório da Cassete

Cliente bioMérieux: _____
 Impresso a: 16/Jul/2014 09:00 BRT

Informações Gerais

Aparelho: VK2C6628
 Hora Carregamento: 15/Jul/2014 10:17 BRT

Informações da Cassete

ID da Cassete: 1
 Nome Técnico Config: labmicro
 Modo de Diluição: Pré-diluido

Posição	Tipo Carta	Cód. Barras	Acesso #	Microrg.	Testes Orient.	Quant. Micr.	Mensagem
1	GP	2423179201658828	Ju DCTA 23-1	Leuco.lactis			Ejectado
2	GP	2423179201658827	Ju DCTA 28-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
3	GP	2423179201658857	Ju DCTA 106-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
4	GP	2423179201658783	Ju DCTA 107-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
5	GP	2423179201658782	Ju DCTA 99-1	Pedio.pentosaceus			Ejectado
6	GP	2423179201658781	Ju DCTA 21-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
7	GP	2423179201658780	Ju DCTA 26-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
8	GP	2423179201658779	Ju DCTA 20-1	Unidentified			Ejectado
9	GP	2423179201658826	Ju DCTA 284-1	<<Low Discrim>>			Ejectado
10	GP	2423179201658825	Ju DCTA 38-1	Unidentified			Ejectado