

**LUANA MARTINS PERIN**

**CARACTERIZAÇÃO DE FATORES INTERFERENTES NA PRODUÇÃO DE  
BACTERIOCINAS POR BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE  
LEITE CRU E QUEIJO**

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

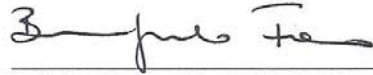
VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011

LUANA MARTINS PERIN

**CARACTERIZAÇÃO DE FATORES INTERFERENTES NA PRODUÇÃO DE  
BACTERIOCINAS POR BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE  
LEITE CRU E QUEIJO**

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

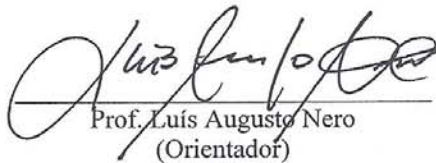
APROVADA: 17 de fevereiro de 2011.



Prof. Bernadette Dora. G. de M. Franco



Prof. Maria Aparecida S. Moreira



Prof. Luis Augusto Nero  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente minha mãe Ana Claudia e ao Zé Augusto por entenderem minha decisão profissional, pelo apoio, torcida durante esses anos e por estarem sempre presentes quando precisei.

Ao meu orientador Prof. Luís Augusto Nero, por ter aberto as portas para mim, primeiro como estagiária e depois como aluna de mestrado. Pela atenção, confiança e dedicação para a realização deste trabalho.

Aos Profs. Maria Aparecida, Paulo Sérgio e Abelardo por contribuírem para meus conhecimentos e formação profissional.

À Profa. Bernadette por aceitar o convite para participar da minha banca e pelas sugestões fundamentais para melhoria deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq e Fapemig pelo financiamento do projeto e concessão de minha bolsa de mestrado.

À cidade de Viçosa, que me acolheu por todos estes anos e que aprendi a gostar.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Veterinária e aos funcionários, em especial Dagô, Luiz Carlos, Rosi, Marquinhos e Élcio, por serem sempre atenciosos, pacientes, prestativos e estarem à disposição quando precisei de ajuda.

Ao meu grande amigo e namorado Fred pela compreensão e por ser meu companheiro em todos os momentos tornando meus dias mais felizes e agradáveis com sua tranquilidade, amor e paciência.

Aos grandes amigos e companheiros de laboratório que tornaram meus dias de trabalho mais agradáveis e alegres: Paulinha, Rodrigo, Michelle, Gabi, Fernanda, Japa e Belinha pelos momentos de descontração e por muitas vezes serem minhas próprias mãos na realização deste trabalho e por estarem sempre presentes durante esses anos.

Aos amigos de mestrado Mococa, Newton, Carol, Tião e Emílio. À Fran, pelos momentos de estudo, e também pela grande amizade, conselhos, e apoio.

Aos amigos de Vitória, que sempre estiverem presentes em minha vida mesmo à distância, em especial Bru, Maja, Mirna, Maria e Gigio.

Aos amigos que fiz em Viçosa e que estão longe, em especial, Marília, Vini e Filipe.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e para a realização deste trabalho.

## CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
1.1. Bactérias Ácido Láticas e detecção da atividade antimicrobiana.....	2
1.2. Bacteriocinas .....	5
1.3. Sensibilidade enzimática de bacteriocinas .....	8
1.4. Fatores determinantes para produção e aplicação de bacteriocinas em alimentos.....	9
2. OBJETIVOS.....	18
Objetivo geral.....	18
Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Microrganismos utilizados .....	19
3.2. Caracterização da atividade antimicrobiana.....	21
3.2.1. Sensibilidade enzimática .....	21
3.2.2. Atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos indicadores .....	22
3.3. Condições de incubação para atividade antimicrobiana.....	23
3.3.1. Interferência de meios de cultura.....	23
3.3.2. Interferência do tempo e temperatura de incubação .....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
4.2. Sensibilidade enzimática .....	26
4.3. Atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos indicadores .....	29
4.4. Condições de incubação para atividade antimicrobiana.....	40

4.4.1. Interferência de meios de cultura.....	40
4.4.2. Interferência de tempo e temperatura de incubação .....	43
5. CONCLUSÕES .....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
ANEXOS.....	68
Meios de cultura e reagentes utilizados.....	69
Resultados detalhados .....	72

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Esquema demonstrando as diferentes substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por bactérias ácido lácticas, destacando a produção de bacteriocinas supostamente identificada pela produção de halos de inibição em ensaios microbiológicos (Deegan et al., 2006 modificado). ..... 4

### ANEXOS

Figura 1. Teste de sensibilidade enzimática das substâncias antimicrobianas produzidas pelo isolado En01. Microrganismo indicador de sensibilidade: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644..... 89

Figura 2. Halos de inibição observados por bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo utilizando o método spot-on-the-lawn. Microrganismo indicador de sensibilidade: *Lactobacillus sakei* ATCC 15521..... 89

Figura 3. Halos de inibição observados pelo isolado Lc10 utilizando o método diluição crítica. Microrganismo indicador de sensibilidade: *Staphylococcus aureus* 26BP6... 90

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Tabela 1. Diferenças entre as características apresentadas por bacteriocinas e antibióticos (Cleveland et al., 2001 modificado). ..... 7
- Tabela 2. Exemplos de bacteriocinas produzidas por gêneros de bactérias ácido lácticas com potencial bioconservador em alimentos (O'Sullivan et al., 2002 modificado). ..... 12

### MATERIAL E MÉTODOS

- Tabela 3. Microrganismos utilizados no estudo. .... 20
- Tabela 4. Identificação molecular dos 101 isolados de BAL utilizados no estudo (Moraes, 2011). .... 21
- Tabela 5. Composição dos meios de cultura utilizados no estudo (g/L). .... 24

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Tabela 6. Frequência de sensibilidade enzimática apresentada pelas substâncias antimicrobianas produzidas pelos 101 isolados de BAL, utilizando *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como microrganismo indicador. .... 28
- Tabela 7. Frequência de inibição apresentada pelos gêneros de BAL contra os 36 microrganismos indicadores (12 *Listeria* spp., 12 *Staphylococcus* spp., 12 BAL) utilizando o método spot-on-the-lawn. .... 33
- Tabela 8. Resultados obtidos para os seis isolados de *Lactococcus* spp., quanto ao diâmetro do halo (mm) por spot-on-the-lawn e título da substância antimicrobiana produzida por diluição crítica (UA/mL). .... 34
- Tabela 9. Resultados obtidos para os cinco isolados de *Enterococcus* spp., quanto ao diâmetro do halo (mm) por spot-on-the-lawn e título da substância antimicrobiana produzida por diluição crítica (UA/mL). .... 36
- Tabela 10. Resultados obtidos para os quatro isolados de *Lactobacillus* spp., quanto ao diâmetro do halo (mm) por spot-on-the-lawn e título da substância antimicrobiana produzida por diluição crítica (UA/mL). .... 38

Tabela 11. Quantificação da produção de bacteriocinas pelo método da diluição crítica (UA/mL) nos diferentes meios de cultura utilizando <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 como microrganismo indicador.....	41
Tabela 12. Quantificação da produção de bacteriocinas pelo método da diluição crítica (UA/mL) nos diferentes meios de cultura utilizando <i>Staphylococcus aureus</i> 26BP6 como microrganismo indicador.....	41
Tabela 13. Quantificação da produção de bacteriocinas pelo método da diluição crítica (UA/mL) nos diferentes meios de cultura utilizando <i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521 como microrganismo indicador.....	42
Tabela 14. Influência do tempo e temperatura de incubação na produção de bacteriocinas pelos 101 isolados de BAL, utilizando <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 como microrganismo indicador.....	45
Tabela 15. Influência do tempo e temperatura de incubação na produção de bacteriocinas pelos 101 isolados de BAL, utilizando <i>Staphylococcus aureus</i> 26BP6 como microrganismo indicador.....	46
Tabela 16. Influência do tempo e temperatura de incubação na produção de bacteriocinas pelos 101 isolados de BAL, utilizando <i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521 como microrganismo indicador.....	47
Tabela 17. Diâmetros (mm) dos halos de inibição nos diferentes tempos e temperaturas utilizando <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 como microrganismo indicador.....	48
Tabela 18 Diâmetros (mm) dos halos de inibição nos diferentes tempos e temperaturas utilizando <i>Staphylococcus aureus</i> 26BP6 como microrganismo indicador.....	49
Tabela 19. Diâmetros (mm) dos halos de inibição nos diferentes tempos e temperaturas utilizando <i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521 como microrganismo indicador.....	50

## **ANEXOS**

Tabela 1. Código inicial e código utilizado no estudo para os isolados de bactérias ácido lácticas de leite cru e queijo e respectivas identificações por testes moleculares.....	72
Tabela 2. Sensibilidade enzimática das substâncias antimicrobianas produzidas pelos 101 isolados de BAL, utilizando <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 como microrganismo indicador.....	75



Tabela 3. Códigos utilizados para os 36 microrganismos indicadores utilizados no estudo e suas respectivas identificações. ....	79
Tabela 4. Diâmetro dos halos (mm) apresentados pelos 101 isolados de BAL contra 12 cepas de <i>Listeria</i> spp., utilizando o método spot-on-the-lawn. ....	80
Tabela 5. Diâmetro dos halos (mm) apresentados pelos 101 isolados de BAL contra 12 cepas de <i>Staphylococcus</i> spp., utilizando o método spot-on-the-lawn.....	83
Tabela 6. Diâmetro dos halos (mm) apresentados pelos 101 isolados de BAL contra 12 cepas de Bactérias Ácido Láticas, utilizando o método spot-on-the-lawn.....	86

## RESUMO

PERIN, Luana Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2011. **Caracterização de fatores interferentes na produção de bacteriocinas por Bactérias Ácido Láticas isoladas de leite cru e queijo.** Orientador: Luís Augusto Nero. Co-orientadores: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira e Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Bactérias ácido láticas (BAL) são constituintes naturais da microbiota do leite cru, exercendo importante papel na segurança alimentar, devido ação antimicrobiana sobre microrganismos deteriorantes e patógenos, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Várias espécies de BAL já foram isoladas e identificadas como produtoras de diversas bacteriocinas. Porém, pesquisas devem ser conduzidas a fim de otimizar a utilização e a produção dessas substâncias antimicrobianas, visando o controle de patógenos e deteriorantes. Considerando a viabilidade de aplicação das bacteriocinas em indústrias de alimentos, este trabalho teve como objetivo verificar a natureza protéica e a interferência de condições de incubação na produção de substâncias antimicrobianas por isolados de Bactérias Ácido Láticas (BAL) de leite cru e queijo. As substâncias antimicrobianas produzidas foram caracterizadas quanto à sensibilidade enzimática, atividade antimicrobiana contra diferentes cepas de *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. e BAL, e avaliadas quanto à interferência de oito variações de meios de cultura (MRS, MRS modificado - MRSm, M17, e BHI, adicionados ou não de solução de cisteína) e oito combinações de tempo e temperatura de incubação (25 e 35 °C por 12, 24, 48 e 72h). As substâncias antimicrobianas produzidas por 80 isolados de BAL apresentaram natureza protéica, as caracterizando como bacteriocinas. *Lactococcus* spp. foi o gênero que apresentou melhor desempenho de atividade antimicrobiana e *Listeria* spp. foi o gênero mais sensível. Os meios de cultura MRS e MRSm e a combinação de 25 °C por 24h, e a 35 °C por 12h de incubação, foram as condições que apresentaram melhor performance de atividade antimicrobiana. Assim, foi possível conhecer alguns aspectos relevantes em relação à produção de bacteriocinas por alguns gêneros de BAL, direcionando estudos complementares para sua futura aplicação em produtos lácteos.

## ABSTRACT

PERIN, Luana Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Characterization of interfering factors in the bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from raw milk and cheese.** Adviser: Luís Augusto Nero. Co-advisors: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira and Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Lactic acid bacteria (LAB) occur naturally as indigenous microbiota in raw milk, and play an important role in the microbial ecology of this product due to their antimicrobial activity against spoilage and pathogenic microorganisms, such as *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Several LAB species were already isolated and identified as producers of some bacteriocins. However, researches should be conducted to optimize the antimicrobial substances production to control the development of foodborne pathogens and spoilage microorganisms. Considering the bacteriocins application viability in the food industry, the aim of this work was to verify the proteinaceous nature and the culture conditions interference on production of antimicrobial substances by Lactic Acid Bacteria (LAB) cultures isolated from raw milk and cheese. The antimicrobial substance produced were characterized for sensibility of different enzymes, for antimicrobial action against *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. and LAB cultures, and the effect of eight variations of culture media (MRS, modified MRS - mMRS, M17, and BHI, added or not with cistein solution) and eight combinations of time and temperature of incubation (25 and 35 °C for 12, 24, 48 and 72h) were evaluated. The antimicrobial substances produced by 80 LAB cultures presented a proteinaceous nature, indicating the bacteriocin production. *Lactococcus* spp. was the genera with better antimicrobial activity and *Listeria* spp. was the most sensitive genera. The culture media MRS and mMRS and the incubation conditions of 25 °C for 24h, and to 35 °C for 12h presented better antimicrobial activity performance. Considering the obtained results, it was possible to understand some important aspects in relation to the bacteriocin production by some genera of LAB, leading further studies to their future application in dairy products.

## INTRODUÇÃO GERAL

Bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo de microrganismos que estão naturalmente presentes na microbiota de diversos alimentos, inclusive leite e derivados. BAL são bastante conhecidas pela capacidade de produzir uma série de substâncias desejáveis para a indústria de alimentos, podendo ser utilizadas como iniciadoras na produção de derivados fermentados, e por serem capazes de produzir diversas substâncias antimicrobianas. As substâncias antimicrobianas produzidas por BAL incluem ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono, peptídeos antifúngicos, substâncias de baixo peso molecular e bacteriocinas. As bacteriocinas são peptídeos biologicamente ativos que apresentam atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos deteriorantes e patógenos frequentemente associados a alimentos.

A aplicação das bacteriocinas na bioconservação dos alimentos oferece muitos benefícios, que têm estimulado o desenvolvimento de diversas pesquisas que visam o isolamento e identificação de novos isolados de BAL naturalmente presentes em alimentos que sejam capazes de produzir bacteriocinas. Muitos estudos têm reportado que produtos lácteos são importantes fontes de novas cepas de BAL bacteriocinogênicas.

Um estudo inicial finalizado em 2009 visou a seleção e identificação precisa de microrganismos naturalmente presentes em leite cru e queijo, especialmente BAL, produtoras de substâncias com atividade antimicrobiana em relação a *Listeria monocytogenes*. Esses isolados de BAL foram caracterizados como potenciais produtores de bacteriocinas. Dessa forma, foi necessária a continuidade desse estudo, visando a caracterização detalhada desses isolados. Assim, as substâncias antimicrobianas produzidas por BAL identificadas como antagonistas foram caracterizadas quanto à natureza protéica, permitindo a classificação desses isolados como produtores de bacteriocinas, quanto à verificação da atividade antimicrobiana em relação a 36 microrganismos indicadores (*Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. e BAL), e foi verificada a interferência de alguns fatores na produção dessas substâncias, como a utilização de diferentes meios de cultura, tempo e temperatura de incubação.

Essa caracterização detalhada é muito importante para identificação de novos isolados de BAL que possuam potencial aplicação em indústrias de alimentos como ferramenta alternativa na garantia da qualidade e segurança microbiológica de leite e derivados.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Bactérias Ácido Lácticas e detecção da atividade antimicrobiana

O leite cru possui uma microbiota autóctone extremamente rica, composta por diferentes grupos de microrganismos que indicam as condições de produção, além do status sanitário dos animais produtores (Wouters et al., 2002; Herreros et al., 2007; Asteri et al., 2010). Ainda, alguns microrganismos deteriorantes e patogênicos são frequentemente associados a esse produto, representando preocupações em relação a sua qualidade e segurança microbiológica. Porém, muitos trabalhos realizados demonstraram que a microbiota natural desse produto exerce uma atividade inibitória considerável sobre microrganismos patogênicos (Cordano & Rocourt, 2001; Kongo et al., 2008; Nero et al., 2008; Bello et al., 2010; Ortolani et al., 2010a). Os principais promotores dessas interferências em alimentos são as bactérias ácido lácticas (BAL), que possuem uma participação relevante na microbiota de diversos alimentos, inclusive produtos lácteos. Esses microrganismos estão naturalmente presentes nos ambientes de ordenha e processamento, o que facilita a contaminação da matéria-prima e produtos beneficiados (Casalta & Montel, 2008; Franciosi et al., 2009; Ortolani et al., 2010a).

BAL constituem um grupo de microrganismos que possuem características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum. São descritos como bacilos ou cocos Gram-positivos, não formadores de esporos, e que possuem o ácido láctico como principal produto do metabolismo de carboidratos (Axelsson, 2004). São constituintes naturais da microbiota de diversos alimentos, inclusive leite e derivados, e incluem os gêneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* (Holzapfel et al., 2001).

As bactérias pertencentes ao grupo das BAL exercem nos alimentos atividade que pode ser considerada dupla, podendo gerar efeitos negativos e positivos. Considerando os efeitos negativos, as BAL são bastante conhecidas pelo seu potencial deteriorante, através da produção de ácidos derivados da fermentação de carboidratos (Han et al., 2007), e pela atividade patogênica de algumas espécies, especialmente as do gênero *Enterococcus*. Por outro lado, BAL são também bastante conhecidas pela capacidade de produzir uma série de substâncias desejáveis para a indústria de alimentos, que podem ser aproveitadas do ponto

de vista tecnológico e de segurança alimentar. Um exemplo desse aproveitamento industrial é a sua capacidade de transformação dos alimentos em produtos fermentados através da produção controlada de ácidos, associados ou não a outras substâncias (Wouters et al., 2002; Morgan et al., 2003; Casalta et al., 2009; Asteri et al., 2010). BAL ainda são capazes de inibir o desenvolvimento de outros microrganismos, através da competição por nutrientes e pela produção de ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) com consequente redução do pH, ou através da produção de outras substâncias antimicrobianas, como peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono, peptídeos antifúngicos, substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular (reuterina, reuteriicina e ácido piroglutâmico) e bacteriocinas (Figura 1) (Chen & Hoover, 2003; de Martinis et al., 2003a; Leroy & de Vuyst, 2004; Cotter et al., 2005; Gálvez et al., 2007; Bello et al., 2010). As bacteriocinas são importantes substâncias utilizadas no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos (Riley & Wertz, 2002; Rouse et al., 2008), especialmente *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* produtores de enterotoxinas, frequentemente associados a produtos lácteos (Morgan et al., 2001).

Dessa forma, a atividade antimicrobiana de BAL constituintes da microbiota desses alimentos determina aos mesmos um status de “bioconservação” (Jay, 1995; de Martinis et al., 2003a), uma vez que ocorre uma interferência direta sobre a presença e manutenção de eventuais patógenos. As alterações provocadas nesses produtos por essas substâncias antimicrobianas geram condições inadequadas para a sobrevivência e multiplicação desses microrganismos, que necessitam de condições muito específicas para se manterem viáveis (Jay et al., 1995). Essa interferência ainda pode ocorrer durante as fases de isolamento pelas metodologias convencionais, que podem não ser suficientemente seletivas para limitar o desenvolvimento de BAL autóctones das amostras analisadas e, assim, permitir a produção de substâncias antagonistas que irão prejudicar a recuperação adequada do patógeno alvo (Jay, 1995; Jay, 1996; Nero et al., 2007).

Diversos trabalhos encontrados na literatura relatam o isolamento de cepas bacteriocinogênicas a partir de produtos lácteos, demonstrando que esses produtos são potenciais fontes para descoberta de novas proteínas microbianas com atividade inibitória contra microrganismos indesejáveis (Alegría et al., 2010; Bello et al., 2010; Ortolani et al., 2010a). Considerando essa capacidade de interferir no desenvolvimento microbiano, cepas de BAL produtoras de bacteriocinas (bacteriocinogênicas), estão sendo amplamente utilizadas na indústria de alimentos visando o controle de microrganismos deteriorantes e

patogênicos (Nilsson et al., 1999; Benkerroum et al., 2002; Rosa et al., 2002; Alves et al., 2006; Tomé et al., 2008a; Alegría et al., 2010).

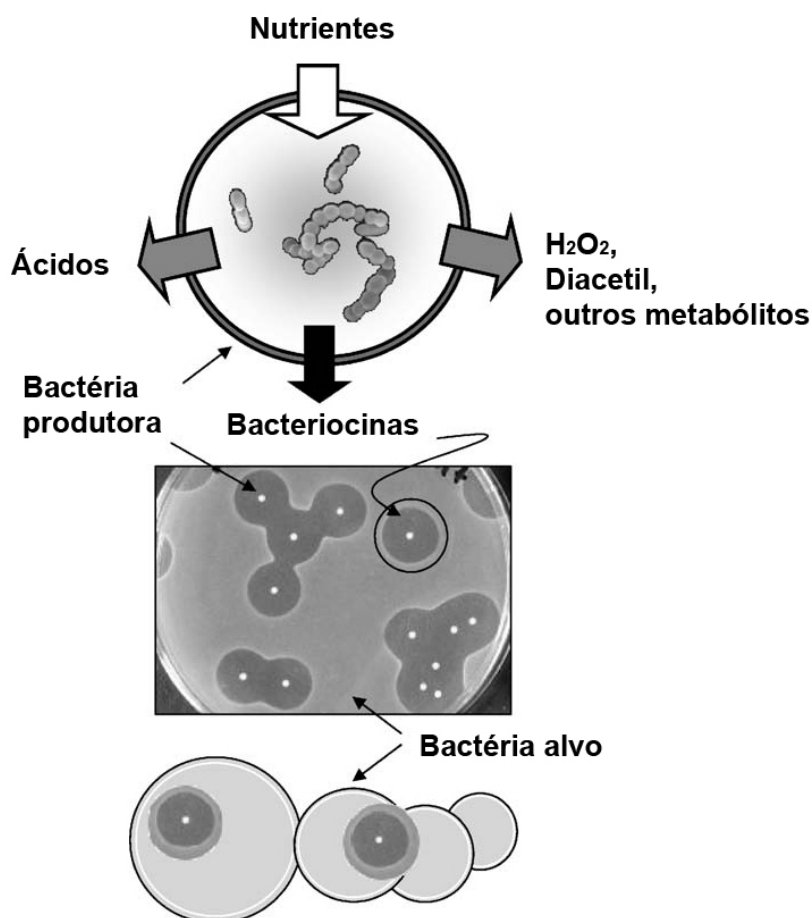


Figura 1. Esquema demonstrando as diferentes substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por bactérias ácido láticas, destacando a produção de bacteriocinas supostamente identificada pela produção de halos de inibição em ensaios microbiológicos (Deegan et al., 2006 modificado).

A detecção da atividade antagonista de BAL é usualmente realizada por dois protocolos. Um deles é o método spot-on-the-lawn (Tagg et al., 1976; Lewus et al., 1991), em que a própria BAL é inoculada pontualmente no meio de cultura base. Por este método se obtém um resultado qualitativo da produção da substância antimicrobiana. Outro método é o well-diffusion-assay (Tagg et al., 1971), em que após os tratamentos necessários é inoculado apenas o sobrenadante purificado da cultura de BAL em poços feitos no meio de cultura base. Uma variação desta técnica é a realização da diluição crítica (Mayr-Harting et al., 1972), em que são realizadas diluições do sobrenadante e inoculadas

em poços no meio de cultura base. Por este método se obtém um resultado quantitativo da substância antimicrobiana produzida em Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/mL), obtendo o título da substância que é produzida. Uma desvantagem da utilização do método well-diffusion-assay é que esta técnica usualmente determina uma menor frequência de identificação de isolados de BAL com potencial antimicrobiano quando comparado ao spot-on-the-lawn (Martínez et al., 1995; Alegría et al., 2010; Moraes et al., 2010). Lewus et al. (1991) consideraram que para aumentar a sensibilidade do ensaio, deve-se deixar a placa por um tempo em repouso para difusão das substâncias antimicrobianas no ágar antes da incubação, ou aumentar o tamanho do poço, para que maior volume da amostra possa ser aplicado. A agregação, bacteriocinas não difundidas, proteases de inativação e concentração, podem levar a resultados falsos negativos no ensaio da diluição crítica (Lewus et al., 1991; Bromberg et al., 2004).

## **1.2. Bacteriocinas**

Bacteriocinas são um grupo heterogêneo de peptídeos antimicrobianos ou proteínas de síntese ribossomal (Jack et al., 1995; Gálvez et al., 2007), biologicamente ativos, que variam no seu espectro e modo de ação, massa molecular, origem genética, e propriedades bioquímicas (Abee et al., 1995). As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas são classificadas de acordo com seus mecanismos de ação e particularidades de sua estrutura molecular (Klaenhammer, 1993; Cotter et al., 2005; Deegan et al., 2006). De forma geral, três classes são descritas, as classes I e II, são peptídeos termoestáveis com peso molecular inferior a 10 kDa. A classe I é constituída pelos denominados lantibióticos, pequenos peptídeos (< 5 kDa) modificados pós-translacionalmente pela formação de aminoácidos desidratados, lantioninas e metilantionina. A classe II é composta por bacteriocinas que não contém resíduos de lantionina. A classe III são peptídeos de alto peso molecular e termolábeis, denominadas bacteriolisinas, pois contêm em sua estrutura molecular regiões específicas com diferentes funções para translocação, receptores de ligação e atividade letal (Cotter et al., 2005). A classe IV é uma classificação reservada para bacteriocinas que requerem porções não-protéicas para sua atividade, que são descritas em alguns trabalhos (Klaenhammer, 1993; Cotter et al., 2005), entretanto sem uma caracterização adequada e detalhada até o momento.



As bacteriocinas podem atuar inibindo os microrganismos sensíveis por diferentes mecanismos de ação. Os lantibióticos (classe I) podem agir de duas maneiras diferentes: podem se ligar ao lipídeo II (principal transportador das subunidades dos peptidoglicanos do citoplasma para a parede celular) e impedir a síntese correta da parede celular, levando à morte celular; ou podem usar o lipídeo II como uma molécula de acoplamento para iniciar o processo de inserção da membrana e formação de poros, que leva à morte celular rápida. A nisina é o lantibiótico mais estudado, e possui atividade por esses dois mecanismos, mas outras bacteriocinas são ativas apenas por um ou outro mecanismo. As bacteriocinas da classe II possuem estrutura helicoidal, que permite sua inserção na membrana da célula-alvo, levando a despolarização e morte. As bacteriolisinas (classe III) atuam diretamente na parede celular de bactérias Gram-positivas, lisando a célula alvo (Cotter et al., 2005).

Algumas propriedades apresentadas pelas bacteriocinas as tornam adequadas para o uso em alimentos pelas indústrias: são consideradas seguras para consumo (GRAS - Generally Regarded As Safe - geralmente reconhecidos como seguros), não são ativas ou tóxicas às células eucarióticas, são inativadas pelas proteases digestivas, tendo pouca influência sobre a microbiota gastrointestinal, são tolerantes a diferentes temperaturas e pH, possuem ação contra muitos patógenos e deteriorantes associados a alimentos, possuem modo de ação bactericida, atuando na membrana citoplasmática bacteriana, não gerando resistência cruzada com antibióticos, e seus determinantes genéticos são usualmente codificados por plasmídeos, facilitando sua manipulação genética (Gálvez et al., 2007). Dentre as diversas cepas de BAL já isoladas e identificadas, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* pode ser considerada como a espécie mais estudada pela capacidade de diversas cepas produzirem nisina, a bacteriocina melhor caracterizada e utilizada para o controle de patógenos em alimentos, e única considerada GRAS e aprovada legalmente para ser utilizada como aditivo em alimentos (Chen & Hoover, 2003; Cotter et al., 2005).

A aplicação das bacteriocinas na bioconservação dos alimentos oferece muitos benefícios, como o aumento da vida de prateleira e redução do risco de veiculação de microrganismos patogênicos. Ainda, podem ser usadas substituindo conservantes químicos, gerando alimentos livres de ingredientes artificiais, atendendo à crescente demanda dos consumidores por alimentos minimamente processados, com o mínimo de substâncias artificiais, com qualidade sensorial, e ausência de perigos microbiológicos (Gálvez et al., 2007; Castellano et al., 2008). Esses alimentos podem ser suplementados

por duas formas: por preparação da bacteriocina produzida *ex situ* ou pela inoculação do isolado bacteriocinogênico em condições que favoreçam a produção da bacteriocina *in situ* (Schillinger et al., 1996; Gálvez et al., 2007).

Essas vantagens de aplicação têm estimulado o desenvolvimento de diversas pesquisas que visam o isolamento e identificação de novos microrganismos naturalmente presentes em alimentos que sejam capazes de produzir bacteriocinas, especialmente em alimentos sem processamento, artesanais e de origem animal (Schillinger & Lücke, 1989; Benkerroum et al., 2000; Rodríguez et al., 2000; Herranz et al., 2001; Villani et al., 2001; Cheigh et al., 2002; Caridi, 2003; de Martinis et al., 2003b; Todorov & Dicks, 2004; Bromberg et al., 2005; 2006; Ghrairi et al., 2008; Alegría et al., 2010; Bello et al., 2010; Ortolani et al., 2010b).

Devido sua ação bactericida, as bacteriocinas eram frequentemente confundidas com os antibióticos na literatura (Hansen, 1993; Daw et al., 1996; Cleveland et al., 2001), o que limitava sua utilização como bioconservantes em alimentos. Cleveland et al. (2001) resumizou as diferenças existentes entre as bacteriocinas e os antibióticos (Tabela 1), permitindo uma evidente distinção entre essas substâncias.

Tabela 1. Diferenças entre as características apresentadas por bacteriocinas e antibióticos (Cleveland et al., 2001 modificado).

Características	Bacteriocinas	Antibióticos
Aplicação	Alimentos	Clínica
Síntese	Ribossomal	Metabólito secundário
Atividade	Espectro restrito	Espectro variável
Imunidade célula produtora	Sim	Não
Mecanismo da célula-alvo para resistência ou tolerância	Geralmente por adaptação das células afetadas	Geralmente por transmissão de determinantes genéticos
Requisitos para interação	Ancoragem das células	Alvos específicos
Modo de ação	Geralmente formação de poros	Membrana celular ou alvos intracelulares
Efeitos tóxicos	Nenhum conhecido	Sim

Algumas características apresentadas pelas bacteriocinas as tornam mais seguras para aplicação como ferramentas de segurança e qualidade microbiológica em alimentos. Mesmo assim, a utilização de bacteriocinas ou de isolados de BAL bacteriocinogênicos em alimentos deve ser comprovadamente segura e eficaz para controlar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

### **1.3. Sensibilidade enzimática de bacteriocinas**

Como já descrito, BAL são capazes de produzir diversas substâncias antimicrobianas. Para verificar se uma cepa de BAL é produtora ou não de bacteriocinas, deve ser realizada a verificação da natureza protéica da substância antimicrobiana que é produzida. As bacteriocinas possuem moléculas de proteína em sua constituição, que são as responsáveis pela inibição dos microrganismos indicadores (Daw et al., 1996; Bromberg et al., 2005). Porém, alguns outros constituintes da estrutura das bacteriocinas, como lipídeos e carboidratos, também podem ser importantes para a atividade das mesmas (Keppler et al., 1994; de Martinis et al., 2003b; Todorov & Dicks, 2009). Diferentes estudos têm demonstrado que as bacteriocinas também possuem em sua constituição traços de carboidratos (menos que 1%) e fósforos (menos que 0,1%) (Daw et al., 1996, de Martins et al., 2003b). A principal diferença entre as bacteriocinas está associada a sua composição de aminoácidos. Diferenças na sequência de aminoácidos foram encontradas entre bacteriocinas diferentes e dentro do mesmo grupo de bacteriocinas (Koebink & Braun, 1993; Daw et al., 1996).

Devido a sua natureza protéica, a produção de bacteriocinas por BAL pode ser demonstrada por testes de inibição com diferentes tipos de enzimas proteolíticas (Lewus & Montville, 1991; de Martinis et al., 2003b; Bromberg et al., 2005; 2006; Sharma et al., 2006; Bello et al., 2010; Moraes et al., 2010; Ortolani et al., 2010b). Além disso, a presença de moléculas de lipídeos e carboidratos pode ocorrer, por exemplo, nas bacteriocinas pertencentes à classe IV (Klaenhammer, 1993). Dessa forma, o estudo da sensibilidade utilizando diversas enzimas (não só aquelas proteolíticas) pode fornecer noções sobre a estrutura da molécula das bacteriocinas (Lewus et al., 1992; de Martinis et al., 2003b). Os padrões de sensibilidade apresentados podem sugerir a produção de uma ou mais bacteriocinas. Vários estudos já demonstraram isolados de BAL bacteriocinogênicos capazes de produzir substâncias que apresentaram diferentes padrões de sensibilidade às enzimas (Moreno et al., 2000; Rodríguez et al., 2000; de Martinis et al., 2003b; Bromberg et al., 2005; 2006; Sharma et al., 2006; Todorov & Dicks, 2006a).

A sensibilidade apresentada pelas bacteriocinas às diferentes enzimas é importante em relação ao uso dessas substâncias como bioconservantes em alimentos, devido à sua capacidade de serem facilmente degradadas no sistema digestivo dos seres humanos (Sharma et al., 2006).

Os protocolos mais comumente utilizados para verificação da natureza das substâncias antimicrobianas produzidas por BAL são o spot-on-the-lawn (Tagg et al., 1976; Lewus et al., 1991) e well-diffusion-assay (Tagg et al., 1971) combinados com a utilização das diferentes soluções enzimáticas. Comparando a utilização dos dois protocolos, Moraes et al. (2010) demonstraram que pela metodologia spot-on-the-lawn foi possível a identificação de maior frequência de isolados antagonistas produtores de bacteriocinas. Ainda, o protocolo spot-on-the-lawn é bastante utilizado para verificação da natureza protéica das substâncias antimicrobianas produzidas por BAL (Lewus & Montville 1991; Benkerroum et al., 2000; de Martinis et al., 2001; García-Almendarez et al., 2008; Ortolani et al., 2010b) e apresenta a vantagem de que essa identificação seja possível mesmo utilizando BAL produtoras de substâncias que determinam a formação de pequenos halos de inibição (Moraes et al., 2010). A partir dessa identificação, as substâncias antimicrobianas produzidas pela BAL podem ser consideradas bacteriocinas.

Ainda, a capacidade de produzir bacteriocinas por BAL pode ser confirmada utilizando métodos moleculares, visando a identificação de genes codificadores de bacteriocinas ou estruturas específicas das mesmas, como a lantionina. Dessa forma, esses resultados associados a testes de sensibilidade enzimática evidenciam isolados de BAL bacteriocinogênicos, que estão produzindo efetivamente bacteriocinas (Nes & Johnsborg, 2004; Gálvez et al., 2007).

#### **1.4. Fatores determinantes para produção e aplicação de bacteriocinas em alimentos**

Uma vez identificada a capacidade de produzir bacteriocinas, os isolados obtidos devem ser caracterizadas quanto a diversos aspectos para justificar o seu aproveitamento comercial e sua aplicabilidade nos alimentos. A sensibilidade enzimática das substâncias antimicrobianas produzidas deve ser considerada nesses estudos, uma vez que os diversos alimentos nos quais as bacteriocinas podem ser aplicadas possuem naturalmente diferentes enzimas que podem interferir em sua atividade antimicrobiana (Gálvez et al., 2007). Ainda, outros aspectos devem ser considerados, a fim de justificar sua utilização pela indústria de alimentos.

As bacteriocinas produzidas por BAL podem possuir atividade antimicrobiana contra um grupo específico de microrganismos indicadores pertencentes à mesma espécie (espectro de ação restrito), ou podem possuir atividade antimicrobiana contra

microrganismos de diferentes gêneros (amplo espectro de ação) (Arauz et al., 2009). Bacteriocinas que possuem espectro de ação restrito (Carr et al., 2002; Chen & Hoover, 2003; Cotter et al., 2005), podem ser inviáveis para utilização em alimentos dependendo do patógeno ou microrganismos deteriorantes que se pretende controlar. Entretanto, pode-se considerar que sob determinadas circunstâncias utilizar bacteriocinas com espectro de ação restrito pode ser mais desejável. Por exemplo, a sakacina P apresenta atividade limitada contra BAL, mas é bastante efetiva contra *Listeria*, podendo ser aplicada em produtos fermentados propensos à contaminação por esse patógeno (Eijsink et al., 1998; O'Sullivan et al., 2002; Chen & Hoover, 2003). De maneira geral, é preferível a utilização de cepas de BAL bacteriocinogênicas ou bacteriocinas que possuam ação contra diversos gêneros de microrganismos indicadores para uso na conservação de alimentos.

Muitas bacteriocinas produzidas por BAL possuem ação contra bactérias Gram-positivas, que são intimamente relacionadas ao microrganismo produtor (Bromberg et al., 2005), e também são capazes de inibir patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* (de Martinis et al., 2001; Castellano et al., 2008). Entretanto, isolados bacteriocinogênicos são imunes às próprias bacteriocinas, devido à produção de proteínas específicas de imunidade (Hoover & Steenson, 1993; Cotter et al., 2005). Em relação aos microrganismos Gram-negativos, a presença da membrana externa restringe a ação de bacteriocinas (Rodríguez et al., 2000; Bromberg et al., 2005; 2006; Deegan et al., 2006; Nero et al., 2008; Ortolani et al., 2010b). No entanto, é possível afetar a integridade dessa membrana através do choque de temperatura, alta pressão e quelantes, como o EDTA, para que ocorra a interação das bacteriocinas com estruturas da parede e membrana citoplasmática e consequente efeito antimicrobiano (Cotter et al., 2005; Deegan et al., 2006).

Segundo Lewus et al. (1991), os microrganismos indicadores que devem ser utilizados numa avaliação inicial deve refletir a aplicação final/proposta do isolado bacteriocinogênico ou da bacteriocina. *L. monocytogenes* e *Staphylococcus enterotoxigênicos* são patógenos usualmente associados a alimentos, como leite e derivados, e devem ser eliminados ou controlados em produtos destinados ao consumo humano (de Martinis et al., 2001; Castellano et al., 2008). Considerando que *Listeria* spp. é capaz de sobreviver em diversos ambientes, a contaminação nos alimentos pode ocorrer em diversas etapas da produção e processamento. Ainda, sua capacidade de se desenvolver em temperaturas de refrigeração e condições aeróbicas faz desse patógeno uma ameaça a

segurança microbiológica, podendo causar sintomas graves e até a morte quando ingerido. A contaminação por *Staphylococcus* spp. pode ocorrer na matéria-prima, no ambiente de processamento dos alimentos ou pela manipulação durante o preparo dos alimentos (Charlier et al., 2009).

Variações na sensibilidade do microrganismo indicador e o desenvolvimento de cepas resistentes e/ou adaptadas são uma das preocupações na aplicação das bacteriocinas. Por exemplo, nem todas as cepas de *L. monocytogenes* têm o mesmo grau de sensibilidade às bacteriocinas anti-listeria (Lewus et al., 1991; Bromberg et al., 2004). Por isso, é importante que as bacteriocinas produzidas por isolados de BAL possuam atividade antimicrobiana contra inúmeras cepas de *Listeria* spp e *Staphylococcus* spp. Ainda, é necessária a verificação da ação de bacteriocinas contra outras cepas de BAL, pois podem afetar aquelas que são aplicadas no alimento com algum propósito de transformação (Riley & Wertz 2002; Cotter et al. 2005). Por outro lado, podem ser importantes por inibir o desenvolvimento de algumas BAL com potencial patogênico, como algumas cepas de *Enterococcus* e BAL não-starters (NSLAB). NSLAB estão presentes na microbiota natural em muitos alimentos e podem se multiplicar levando alterações de sabores e produção de compostos indesejáveis (Cotter et al., 2005).

A maioria da bacteriocinas pertencentes à classe I é capaz de inibir bactérias estreitamente relacionadas, tais como espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, mas também inibem muitas outras bactérias Gram-positivas menos relacionadas, tais como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum*. Várias bacteriocinas desta classe, como nisina são capazes de prevenir o desenvolvimento de esporos de *B. cereus* e *C. botulinum* (Chen & Hoover, 2003). Bacteriocinas pertencentes à classe II são geralmente ativas contra a *Listeria* (O'Sullivan et al., 2002; Chen & Hoover, 2003). Além da comprovação desses dados, é importante a caracterização do espectro de ação de cada bacteriocina produzida em separado, pois o grau de sensibilidade varia de cepa para cepa (Chen & Hoover, 2003).

A Tabela 2 apresenta uma breve descrição do espectro de ação de algumas bacteriocinas produzidas pelos principais gêneros de BAL, potencialmente utilizados como bioconservadores em alimentos.

Tabela 2. Exemplos de bacteriocinas produzidas por gêneros de bactérias ácido lácticas com potencial bioconservador em alimentos (O’Sullivan et al., 2002 modificado).

Bacteriocinas	Espectro de ação	Classe	Microrganismos sensíveis	Referência
<i>Lactococcus</i> spp.				
Nisina	Ampla	I	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Listeria</i> , esporos de <i>Clostridium</i> e <i>Bacillus</i> , leveduras, fungos, <i>Pseudomonas fluorescens</i> (com EDTA) e <i>Staphylococcus</i>	Delves-Broughton, 1993
Lacticina 3147	Ampla	I	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> e <i>Clostridium</i>	McAuliffe et al., 1998; Piper et al., 2009
Lacticina 481	Médio	I	<i>Lactococcus</i> , alguns <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> e <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Piard et al., 1992
Lactococina A, B e M	Restrito	II	<i>Lactococcus</i>	Hugas, 1998
<i>Lactobacillus</i> spp.				
Sakacina A	Restrito	II	<i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> .	Hugas, 1998
Sakacina P	Restrito	II	<i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Enterococcus faecium</i>	Hugas, 1998
Plantaricina C	Ampla	I	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Clostridium sporogenes</i>	González et al., 1994
<i>Pediococcus</i> spp.				
Pediocina A	Ampla	II	<i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium botulinum</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .	Hugas, 1998; O’Sullivan et al., 2002
Pediocina AcH (PA-1)	Ampla	II	<i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium botulinum</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .	Hugas, 1998; O’Sullivan et al., 2002
<i>Leuconostoc</i> spp.				
Leucocina A-UAL187	Ampla	II	<i>Listeria</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> e outras BAL	Hugas, 1998
<i>Enterococcus</i> spp.				
Enterocina A	Restrito	II	<i>Listeria</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , alguns <i>Staphylococcus</i> e <i>Clostridium</i>	Hugas, 1998; Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008

Continuação da Tabela 2.

Bacteriocinas	Espectro de ação	Classe	Microrganismos sensíveis	Referência
<i>Carnobacterium</i> spp.				
Carnocina U149	Ampla	I	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus sake</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Carnobacterium</i> e <i>Staphylococcus epidermis</i>	Stoffels et al., 1992
Piscicolina 126	Ampla	II	<i>Listeria</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> e <i>Brochothrix</i>	Ennahar et al., 1999
Divercina V41	Ampla	II	<i>Listeria</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> e <i>Brochothrix</i>	Ennahar et al., 1999



Vários fatores interferentes na capacidade de produção e na atividade de bacteriocinas por BAL também devem ser bem caracterizados. Essa interferência depende, dentre outros, da espécie de BAL produtora, microrganismo alvo, alimento na qual será aplicada, condições de desenvolvimento, processos industriais e da forma de consumo. A resposta dos isolados testados e das bacteriocinas produzidas em relação a esses fatores também é bastante variável. A princípio, o próprio alimento do qual a BAL foi isolada seria a melhor escolha para sua aplicação (Schillinger & Lücke, 1989; Bromberg et al., 2006; Topisirovic et al., 2006), pela maior facilidade de adaptação e produção das substâncias antimicrobianas de interesse. Independente dessa recomendação deve ser verificado se a BAL selecionada apresenta boa capacidade de competição com a microbiota do alimento, sem causar aumento em sua taxa de deterioração.

A produção de bacteriocinas é muitas vezes induzida e depende da densidade celular e da concentração do indutor (que pode ser a bacteriocina em si). Portanto, uma concentração mínima de inóculo inicial do isolado de BAL bacteriocinogênico é muitas vezes necessária para se iniciar a produção de bacteriocina (de Martinis et al., 2003b; Todorov & Dicks, 2006a; Gálvez et al., 2007; Tomé et al., 2008b). As interações do fator de indução com a matriz alimentar (como a adsorção ou inativação) podem ter uma grande influência na produção de bacteriocinas. Por outro lado, a matriz alimentar pode também facilitar a concentração do fator de indução em células ou microcolônias formadas pelo isolado bacteriocinogênico no alimento. A presença de outros microrganismos também pode ser um fator que estimula a produção de bacteriocinas por BAL (Gálvez et al., 2007). Essa produção ainda pode estar associada às fases de desenvolvimento da BAL, que geralmente ocorre em toda fase de multiplicação e reduz no final da fase exponencial (às vezes antes do fim da fase de multiplicação), devido à degradação proteolítica e à agregação e/ou absorção das células (Parente & Ricciardi, 1999; Cheigh et al., 2002). Ainda, em condições específicas, BAL podem apresentar redução em sua capacidade biosintética, devido a degradações no genoma ocorridas durante sua evolução, ou por perderem ou reduzirem a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas (Pfeiler & Klaenhammer, 2007).

Pouco ainda se sabe sobre as condições de desenvolvimento requeridas pelas cepas de BAL com potencial bacteriocinogênico para produção ótima de muitas bacteriocinas (Todorov & Dicks, 2006b). Altos níveis de produção de bacteriocinas muitas vezes são obtidos em condições que diferem daquelas necessárias para a multiplicação

(Parente & Ricciardi, 1994; Aasen et al, 2000; Todorov et al, 2000). Dessa forma, a caracterização detalhada dos fatores que influenciam a produção de bacteriocinas é fundamental para a otimização da obtenção dessas substâncias. Para tanto, diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação podem ser avaliados (Todorov & Dicks, 2006b; Settanni et al., 2008; Tomé et al., 2008b).

A composição do meio de cultura, e até mesmo pequenas variações em alguns de seus constituintes, afetam consideravelmente a produção de bacteriocinas por BAL (Tagg et al., 1976; Carolissen-Mackay et al, 1997; Chen & Hoover, 2003). A produção de bacteriocinas é afetada pelo tipo e quantidade das fontes de carbono, carboidrato, nitrogênio, fosfato, cátions, surfactantes e inibidores presentes no meio de cultura (Parente & Ricciardi, 1999). Dessa forma, a suplementação do meio de cultura com fatores de multiplicação limitantes (carboidratos, fontes de nitrogênio, vitaminas, fosfato e potássio) ou ajuste do pH podem aumentar os níveis de produção da bacteriocina (Parente & Ricciardi, 1999; Todorov & Dicks, 2005). Kim et al. (1997) constataram uma máxima concentração de nisina quando se aumentou o teor de nitrogênio orgânico no meio de cultura. A cisteína, por exemplo, é muito importante para alguns gêneros de BAL, como bifidobactérias, por reduzir a tensão de oxigênio no meio de cultura, melhorando as condições anaeróbicas durante a redução do meio (Payne et al., 1999). Por essa razão pode ser adicionada para potencializar o desenvolvimento desse grupo.

Muitos estudos têm reportado que o melhor meio de cultura para desenvolvimento de BAL e produção de bacteriocinas é o de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Avonts et al., 2004; Todorov & Dicks, 2005; 2006b; Settanni et al., 2008). Cheigh et al. (2002), ao comparar o desempenho de uma cepa de *Lc. lactis* em diferentes meios de cultura obteve melhores resultados utilizando o meio M17. Entretanto, esses autores não controlaram o pH do meio de cultura durante o desenvolvimento da cepa avaliada, e grande parte da inibição observada pode ter sido derivada da produção de ácidos orgânicos a partir da alta concentração de lactose do M17. Alguns estudos relatam que grandes quantidades de açúcar no meio de cultura podem interferir na produção da bacteriocina, devido aumento da produção de ácidos e conseqüente redução do pH. É provável que em condições de stress (baixo pH), o tempo necessário para que a BAL alcance a fase estacionária seja maior e assim, a produção/atividade da bacteriocina será menor (Parente & Ricciardi, 1999; Tomé et al., 2008b). Em outro estudo comparativo entre meios de cultura, Moraes et al. (2010) avaliaram também o desempenho do meio MRS modificado (MRSm, contendo

0,5% de dextrose) e foi verificado que esse meio apresentou melhor performance na identificação de cepas de BAL produtoras de substâncias antimicrobianas e supostamente bacteriocinogênicas.

A capacidade de uma cepa de BAL apresentar maior ou menor produção de bacteriocinas em determinado meio de cultura depende da necessidade dessa cepa por nutrientes específicos (Todorov & Dicks, 2006b). Ainda, a composição do meio de cultura é um fator importante em ensaios em placa, que podem interferir diretamente na detecção adequada da atividade antimicrobiana das bacteriocinas produzidas pelos isolados em análise. Os agentes gelificantes utilizados em meios sólidos também podem interferir com a difusão da bacteriocina, limitando assim a eficácia dos protocolos realizados em laboratório (Chen & Hoover, 2003). Dessa forma, pode-se considerar que o meio de cultura ideal para produção de determinada bacteriocina, dependerá da cepa de BAL que está sendo utilizada. Por isso uma caracterização detalhada deve ser realizada para identificação do melhor meio de cultura para produção de bacteriocinas por BAL.

Mesmo após uma caracterização *in vitro* detalhada, quando aplicados em alimentos, as bacteriocinas tendem a apresentar atividade antimicrobiana menos eficaz (Schillinger et al., 1996; Gálvez et al., 2007). Muitas vezes é necessário que se aplique no alimento uma concentração dez vezes maior da bacteriocina para obter o efeito de inibição observado *in vitro*. A eficácia da bacteriocina em alimentos envolve outros fatores interferentes, como a composição do alimento, precipitação, inativação e distribuição da bacteriocina pela matriz alimentar (Gálvez et al., 2007).

Outro fator interferente na produção de bacteriocinas por BAL que deve ser caracterizado são diferentes tempos e temperaturas de incubação. Temperaturas de multiplicação e a produção de bacteriocinas estão correlacionadas, como observado em alguns estudos (Todorov & Dicks, 2006b; Todorov, 2008; Tomé et al., 2008b). A multiplicação de BAL a temperaturas ótimas geralmente resultam numa produção ótima de bacteriocinas, porém desenvolvimento a temperaturas sub-ótimas podem resultar num aumento da produção de bacteriocinas (Parente & Ricciardi, 1999). Muitas BAL são capazes de produzir mais de uma bacteriocina, e estas podem possuir diferentes temperaturas ótimas para sua produção (Parente & Ricciardi, 1999). Por isso, diferentes condições de tempo e temperatura de incubação podem ser utilizadas dependendo da bacteriocina de interesse. Assim, é necessária a caracterização detalhada de qual

temperatura é a ideal para incubação, dependendo da cepa de BAL utilizada ou da bacteriocina que é produzida.

A caracterização do espectro de ação, e dos possíveis fatores interferentes na produção de substâncias antimicrobianas por BAL é fundamental para que esses isolados sejam utilizados de forma adequada, visando à máxima exploração de seu potencial antimicrobiano e determinando a segurança alimentar desejada ao consumidor. A verificação desses fatores constitui etapa inicial em estudos de investigação de novos isolados bacteriocinogênicos ou bacteriocinas com potencial de aplicação na bioconservação de alimentos.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Verificar a natureza protéica e a interferência de condições de cultivo na produção de substâncias antimicrobianas por isolados de Bactérias Ácido Láticas (BAL) de leite cru e queijo.

### Objetivos específicos

1. Caracterizar a natureza protéica das substâncias antimicrobianas produzidas por BAL identificadas como antagonistas, considerando sua sensibilidade em relação a diferentes enzimas;
2. Caracterizar a atividade antimicrobiana das bacteriocinas produzidas por BAL contra diferentes cepas de *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. e outras BAL;
3. Caracterizar as melhores condições para produção de bacteriocinas por BAL considerando diferentes meios de cultura, tempos e temperaturas de incubação.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados no estudo estão descritos na Tabela 3. Foram utilizados para os testes de caracterização antimicrobiana 101 isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) de leite cru e queijo, previamente caracterizados como produtores de substâncias antimicrobianas com atividade contra *Listeria monocytogenes* (Moraes et al., 2010; Ortolani et al., 2010a). Os 101 isolados de BAL foram previamente submetidos à identificação molecular a partir do sequenciamento do gene 16S rDNA e pela realização de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando primers específicos para diferenciação de espécies (Moraes, 2011). As identificações obtidas para os isolados estão apresentados na Tabela 4. Diferentes cepas de *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. e BAL foram utilizados como indicadores nos testes de antagonismo descritos posteriormente.

As cepas de *Listeria* spp. e *Staphylococcus* spp. foram mantidas em caldo Trypticase de Soja (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) adicionado de Extrato de Levedura na concentração de 0,6% (TSB-YE) e as cepas de BAL em caldo de Man, Rogosa & Sharpe (MRS, Oxoid), suplementados com glicerol a 25% e mantidos a temperatura de -80 °C. No momento de uso, os microrganismos foram semeados em caldo MRS ou TSB-YE e incubados a 35 °C por 12h. Em seguida, foram estriados em ágar MRS ou ágar Trypticase de Soja suplementando com Extrato de Levedura a 0,6% (TSA-YE, Oxoid), com incubação overnight a 35 °C para verificação da pureza das culturas.

Para todos os testes de caracterização da atividade antimicrobiana, colônias isoladas das BAL utilizadas foram semeadas em caldo MRS e diluídas em escala seriada decimal até atingir uma concentração aproximada de  $3 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) (escala 1 de MacFarland). Em todos os ensaios, as cepas utilizadas foram diluídas em NaCl 0,85% e semeadas em duplicata e pour plate em ágar MRS, para enumeração da população inicial utilizada.

Em todas as etapas de caracterização da atividade antimicrobiana, *Lactobacillus sakei* 2a foi utilizado como controle positivo de BAL bacteriocinogênica (de Martinis & Franco, 1998).

Tabela 3. Microrganismos utilizados no estudo.

Grupos ou gêneros	Cepa (ATCC* número de referência da cepa)	Observações	Referências
Bactérias Ácido Láticas	<i>Lactobacillus sakei</i> 2a	Isolado de linguiça suína e utilizado como controle positivo nos testes de antagonismo	de Martinis & Franco, 1998
	<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962, ATCC 11007, <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433, <i>Lactobacillus delbrückii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 1184	Cepas referência utilizadas como indicadores nos testes de antagonismo	--
	<i>Enterococcus faecalis</i> (3) <i>Enterococcus</i> spp. (1), <i>Lactobacillus plantarum</i> (2)	Isolados de leite cru e queijo, e utilizados como indicadores nos testes de antagonismo	Ortolani et al., 2010a
	101 isolados	Isolados de leite cru e queijo e utilizadas no estudo	Ortolani et al., 2010a
<i>Listeria</i> spp.	<i>L. innocua</i> ATCC 33090, <i>L. ivanovi</i> ATCC 19119, <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313, ATCC 19112, ATCC 19117, ATCC 7644	Cepas referência utilizadas como indicadores nos testes de antagonismo	--
	<i>L. monocytogenes</i> (3), <i>L. seeligeri</i> (1), <i>L. innocua</i> (1), <i>L. welshimeri</i> (1)	Isolados de produtos cárneos e utilizados como indicadores nos testes de antagonismo	Barros et al., 2007
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i> ATCC 14458, ATCC 12598, ATCC 8095, ATCC 29213, ATCC 12600, <i>Staphylococcus</i> sp. ATCC 23235	Cepas referência utilizadas como indicadores nos testes de antagonismo	--
	<i>S. aureus</i> (6)	Isolados de leite cru e queijo, e utilizados como indicadores nos testes de antagonismo	Viçosa et al., 2010

\* ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Tabela 4. Identificação molecular dos 101 isolados de BAL utilizados no estudo (Moraes, 2011).

Gênero/espécie	n	Identificação**
<i>Lactococcus</i> spp.	27	
<i>Lc. lactis</i>	1	Lc02
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	22	Lc01, Lc03 a Lc15, Lc20 a Lc27
<i>Lc. garviae</i>	4	Lc16 a Lc19
<i>Lactobacillus</i> spp.	27	
<i>Lb. plantarum</i>	24	Lb01 a Lb09, Lb13 a Lb27
<i>Lb. sakei</i>	1	Lb12
<i>Lb. fermentum</i>	2	Lb10 e Lb11
<i>Enterococcus</i> spp.	43	
<i>En. faecalis</i>	13	En21 a En27, En29, En30, En40 a En43
<i>Enterococcus</i> spp.*	30	En01 a En20, En28, En31 a En39
Outros	4	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	Ot01
<i>Pediococcus</i> spp.*	1	Ot02
<i>Streptococcus</i> spp.*	1	Ot03
<i>Weisselia cibaria</i>	1	Ot04

n: número de isolados de bactérias ácido lácticas pertencentes ao respectivo gênero/espécie

\* Não identificados em nível de espécie

\*\* Código de identificação utilizado para os isolados de bactérias ácido lácticas usados no estudo

### 3.2. Caracterização da atividade antimicrobiana

#### 3.2.1. Sensibilidade enzimática

Os 101 isolados de BAL (Tabela 3) foram submetidos a testes para a confirmação da natureza das substâncias antimicrobianas produzidas, utilizando o método spot-on-the-lawn (Lewus et al., 1991; Moraes et al., 2010). Foram preparadas soluções de 20 mg/mL das seguintes enzimas:  $\alpha$ -quimotripsina de pâncreas de bovino (C4129), proteinase K de *Tritirachium album* (P8044), tripsina TPCK (T1426),  $\alpha$ -amilase, tipo XII-A (A3403), papaína (76220), protease de *Streptomyces griseus* (P5147), lipase de *Aspergillus niger* (62301), lisozima (L7651) e catalase (C1345) (todas da Sigma, Saint Louis, MO, USA).

Alíquotas de 2  $\mu$ L de cada cultura foram semeadas pontualmente em placas contendo 10 mL de ágar MRS modificado (MRSm, contendo 0,5% de dextrose), e incubadas a 25 °C por 24h em condições de anaerobiose (BBL GasPak, BD Brasil, São Paulo, SP, Brasil), para minimizar a produção de peróxido de hidrogênio. Após a



incubação, um poço de 2 mm de diâmetro foi cortado no ágar a 0,5 cm de distância de cada colônia formada, sendo cada um preenchido com 20 µL de uma das soluções de enzimas preparadas. Ainda, 20 µL de água milliQ estéril foram adicionados em um dos poços como controle negativo. As placas foram deixadas em repouso em temperatura ambiente para absorção e difusão das enzimas. Em seguida, cada placa recebeu uma sobrecamada de 8 mL de ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid) semi-sólido (ágar a 0,8%) contendo aproximadamente  $10^5$  UFC/mL do microrganismo indicador *L. monocytogenes* ATCC 7644 e incubadas a 35 °C por 24h. A confirmação da natureza da substância antimicrobiana produzida pelos isolados de BAL foi confirmada pela sensibilidade a uma ou mais enzimas testadas, identificada pela formação de um halo em formato de meia lua.

### 3.2.2. Atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos indicadores

As substâncias antimicrobianas produzidas pelos 101 isolados de BAL tiveram sua atividade testada contra 36 microrganismos indicadores (*Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. e BAL) apresentados na Tabela 3, utilizando o método spot-on-the-lawn (Lewus et al., 1991; Moraes et al., 2010). Aliquotas de 2 µL de cada cultura foram semeadas pontualmente na superfície de placas contendo ágar MRSm e incubadas a 25 °C por 24h em condições de anaerobiose (BBL GasPak).

Após incubação, cada placa recebeu uma sobrecamada de 8 mL de ágar MRS ou TSA-YE semi-sólido (dependendo do microrganismo indicador utilizado), inoculado com aproximadamente  $10^5$  UFC/mL de um dos microrganismos indicadores (Tabela 3). Após solidificação, as placas foram incubadas a 35 °C por 24h e examinadas quanto à formação do halo de inibição ao redor da cultura de BAL inoculada. Os diâmetros dos halos de inibição formados foram mensurados com auxílio de paquímetro e expressos em milímetros (mm).

A partir dos resultados obtidos, foram selecionados 15 isolados de BAL que apresentaram melhor desempenho pelo método spot-on-the-lawn, e suas atividades antimicrobianas foram avaliadas pelo método da diluição crítica (Mayr-Harting et al., 1972; Bromberg et al., 2006). As substâncias produzidas pelos isolados selecionados tiveram sua atividade antimicrobiana testada contra 36 microrganismos indicadores (Tabela 3). Após a padronização da população inicial de cada BAL na concentração aproximada de  $3 \times 10^8$  UFC/mL, estas foram diluídas em escala seriada decimal utilizando

NaCl a 0,85% até atingirem a concentração aproximada de  $10^2$  UFC/mL. A partir dessa concentração, alíquotas de 1 mL de cada cultura foram inoculadas em tubos falcon estéreis contendo 20 mL de caldo MRSm e incubadas a 25 °C por 48h.

Após incubação, os tubos contendo os inóculos foram submetidos à centrifugação a 6800 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi neutralizado utilizando solução de NaOH 1N até atingir o pH de 7,0, para eliminar a atividade antimicrobiana por ácidos produzidos. Em seguida, o sobrenadante foi esterilizado utilizando filtros de 0,22 µm (Millex SLGP033RS, Milipore, Bedford, MA, USA) e acondicionado em tubo estéril. Após todos os tratamentos necessários, o sobrenadante foi diluído em escala seriada na proporção de 1:2 (v/v) até 1:1.600 em solução tampão de sódio (PBS) a 10mM, pH 7,0.

Em seguida, poços de 5 mm de diâmetro foram cortados na superfície do ágar MRSm ou TSA-YE (dependendo do microrganismo indicador utilizado), sendo cada poço preenchido com 10 µL de cada diluição. As placas com ágar MRSm e TSA-YE foram previamente inoculadas com um dos microrganismos indicadores (Tabela 3) com população de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL. As placas foram deixadas em repouso em temperatura ambiente para absorção e difusão do sobrenadante e em seguida, foram incubadas a 35 °C por 24h. Após incubação foi verificada a formação de halos de inibição ao redor dos poços. O título da substância antimicrobiana produzida foi expresso em Unidade Arbitrária por mililitro (UA/mL), e foi definido com a recíproca da maior diluição que apresentou formação de halo de inibição, multiplicado por 100. Para cada BAL avaliada, o procedimento descrito foi realizado em 3 repetições.

### **3.3. Condições de incubação para produção de bacteriocinas**

#### *3.3.1. Interferência de meios de cultura*

Baseado nos resultados obtidos na etapa de avaliação da atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos indicadores, foram selecionados cinco isolados para avaliação da interferência dos meios de cultura na produção de bacteriocinas pelo método de diluição crítica (Mayr-Harting et al., 1972; Bromberg et al., 2006), como descrito anteriormente. Os microrganismos indicadores utilizados foram: *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* 26BP6, selecionados por apresentarem maior sensibilidade às bacteriocinas produzidas pelos

isolados de BAL na etapa da caracterização da atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos indicadores.

Alíquotas de 1 mL de cada cultura de BAL com população inicial de aproximadamente  $10^2$  UFC/mL foram inoculadas em tubos falcon contendo 20 mL de diferentes meios de cultura: MRS, MRSm, BHI e M17 (Tabela 5) (todos da Oxoid). Todos os meios de cultura foram testados adicionados ou não de solução de cisteína. Foi preparada solução com 50 mg/mL da cisteína e adicionada no meio de cultura na concentração final de 0,05%. Os meios de cultura inoculados foram incubados a 25 °C por 48h, e submetidos aos procedimentos de centrifugação, neutralização, filtração e diluição descritos anteriormente. Alíquotas de 10 µL foram inoculadas em poços previamente cortados em placas com ágar TSA ou MRSm previamente inoculados com um dos microrganismos indicadores. Após absorção, as placas foram incubadas a 35 °C por 24h, quando foi verificada a formação de halos de inibição ao redor dos poços. O título da substância antimicrobiana produzida foi expresso em UA/mL, como descrito anteriormente. Para cada BAL avaliada, o procedimento descrito foi realizado em 3 repetições.

Tabela 5. Composição dos meios de cultura utilizados no estudo (g/L).

Composição	MRS	MRSm	BHI	M17
Peptona	10	10	10	5
Extrato de carne	8	10	-	5
Extrato de levedura	4	5	-	2,5
Glicose	20	5	2	-
Polissorbato 80	1	1	-	-
Fosfato de potássio bibásico	2	2	-	-
Acetato de sódio	5	5	-	-
Citrato de amônia	2	2	-	-
Sulfato de magnésio	0,2	0,1	-	0,25
Sulfato de manganês	0,05	0,05	-	-
Infusão de cérebro	-	-	12,5	-
Infusão de carne e coração	-	-	5	-
Cloreto de sódio	-	-	5	-
Fosfato dissódico	-	-	2,5	-
Triptona	-	-	-	5
Ácido ascórbico	-	-	-	0,5
Glicerofosfato dissódico	-	-	-	19
Lactose	-	-	-	50

MRS: de Man, Rogosa & Sharpe; MRSm: MRS modificado; BHI: infusão de cérebro e coração

### 3.3.2. Interferência do tempo e temperatura de incubação

A atividade antimicrobiana das substâncias produzidas pelos 101 isolados de BAL (Tabela 3) foi avaliada considerando diferentes tempos e temperaturas de incubação utilizando o método spot-on-the-lawn (Lewus et al., 1991; Moraes et al., 2010). Os microrganismos indicadores utilizados foram: *Lb. sakei* ATCC 15521, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* 26BP6. Após incubação em caldo MRS a 35 °C por 24h, alíquotas de 2 µL de cada cultura de BAL foram inoculadas pontualmente na superfície de placas contendo ágar MRSm. Após absorção e difusão foram incubadas em anaerobiose nas diferentes condições de tempo e temperatura: a 25 °C por 12, 24, 48 e 72h e a 35 °C por 12, 24, 48 e 72h, para verificação da interferência de cada condição na produção das substâncias antimicrobianas.

Após cada um dos tempos de incubação, cada placa recebeu uma sobrecamada de 8 mL de MRS ou TSA-YE semi-sólido, contendo ágar a 0,8% inoculado com aproximadamente 10<sup>5</sup> UFC/mL do microrganismo indicador. Após solidificação, as placas foram incubadas a 35 °C por 24h e examinadas quanto à formação do halo de inibição ao redor da BAL inoculada. Ainda, para os 15 isolados previamente selecionados, os diâmetros dos halos de inibição formados foram mensurados com auxílio de paquímetro, sendo expressos em mm. Para cada BAL avaliada, o procedimento descrito foi realizado em 3 repetições. Os diâmetros dos halos mensurados foram obtidos pelas médias nas três repetições.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Sensibilidade enzimática

Os resultados para sensibilidade enzimática das substâncias produzidas pelos 101 isolados de BAL estão apresentados na Tabela 6. As substâncias antimicrobianas produzidas pela maioria dos isolados foram sensíveis a  $\alpha$ -quimotripsina, proteinase K e tripsina e algumas apresentaram sensibilidade a outras enzimas proteolíticas, como a lisozima, papaína e protease (Tabela 6). Esse padrão de sensibilidade apresentado indica a natureza protéica das substâncias antimicrobianas produzidas pelas isolados de BAL testados, o que os caracteriza como produtores de bacteriocinas. As bacteriocinas possuem moléculas de proteínas em sua constituição, que são responsáveis pela inibição dos microrganismos indicadores (Bromberg et al., 2005).

A variação nos padrões de sensibilidade das substâncias antimicrobianas produzidas sugere a produção de diferentes bacteriocinas (Tabela 6). Além de identificar esse potencial, o conhecimento da sensibilidade enzimática das bacteriocinas produzidas pela BAL é uma informação relevante para aplicação da mesma em alimentos e de sua estabilidade após ingestão. Essas substâncias podem ser degradadas por enzimas naturalmente presentes nos alimentos nos quais os isolados de BAL possam ser aplicados, comprometendo seu potencial antimicrobiano (Gálvez et al., 2007). Ainda, essas substâncias devem ser facilmente degradadas pelas enzimas do trato gastrintestinal, não comprometendo o equilíbrio da microbiota intestinal dos consumidores (Sharma et al., 2006).

Vinte isolados não produziram substâncias sensíveis às enzimas testadas, *Enterococcus* spp. (7), *Lactobacillus* spp. (4), *Lactococcus* spp. (7), *Streptococcus* spp. (1) e *Weisselia cibaria* (1) (Tabela 6), em alguns casos devido à ausência ou formação de halos de inibição muito pequenos durante as análises. Esses resultados sugerem ausência do potencial bacteriocinogênico desses isolados. Entretanto, é importante considerar que muitas cepas de BAL possuem genes de bacteriocinas que, dependendo das condições de cultivo, não são expressos (Chen & Hoover, 2003). Ainda, devido a mutações ou outros fatores genéticos, esses genes podem ser eliminados ou inativados resultando em perda da atividade antimicrobiana (Hoover & Steenson, 1993).

Algumas espécies pertencentes aos gêneros *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. produziram substâncias que também foram sensíveis a outras soluções de enzimas que não são proteases, como amilase, lipase e catalase (Tabela 6). Esses resultados indicam a produção de bacteriocinas que apresentam moléculas de lipídeos e carboidratos em sua estrutura. A presença de moléculas dessas substâncias ocorre nas bacteriocinas pertencentes à classe IV (Klaenhammer, 1993; Cotter et al., 2005). Outros trabalhos também identificaram cepas de BAL capazes de produzir bacteriocinas sensíveis a essas enzimas (Moreno et al., 2000; de Martinis et al., 2003a; Bromberg et al., 2004). A solução de catalase inibiu a atividade antimicrobiana das substâncias produzidas por 15 isolados, *Lc. lactis* subsp. *lactis* (2), *Lb. sakei* (1), *Lb. plantarum* (2) e *En. faecalis* (6) e *Enterococcus* spp. (4), indicando a produção de peróxido de hidrogênio, que pode ter sido produzido associado a outras bacteriocinas.

Essa variação dos padrões de sensibilidade enzimática já foi observada em estudos anteriores (Rodríguez et al., 2000; Bromberg et al., 2005; Sharma et al., 2006). O padrão de sensibilidade enzimática apresentado pelas bacteriocinas pode fornecer informações importantes sobre a estrutura das moléculas das substâncias produzidas (Lewus et al., 1991).

Tabela 6. Frequência de sensibilidade enzimática apresentada pelas substâncias antimicrobianas produzidas pelos 101 isolados de BAL, utilizando *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como microrganismo indicador.

Gênero/espécie de BAL	n	Proteinase K	Tripsina	$\alpha$ - quimotripsina	Pepsina	Papaína	Protease	Lisozima	Lipase	$\alpha$ -amilase	Catalase
<i>Lactococcus</i> spp.	27	11	7	11	ND	8	6	7	4	ND	2
<i>Lc. lactis</i>	1	ND	ND	ND	ND	1	1	1	ND	ND	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	22	11	7	11	ND	6	5	6	4	ND	2
<i>Lc. garviae</i>	4	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus</i> spp.	27	13	12	14	1	8	5	5	3	2	3
<i>Lb.s plantarum</i>	24	14	11	13	1	7	4	4	3	2	2
<i>Lb. sakei</i>	1	1	1	1	ND	1	1	1	ND	ND	1
<i>Lb.s fermentum</i>	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Enterococcus</i> spp.	43	24	22	28	2	12	17	19	13	2	10
<i>En. faecalis</i>	13	9	7	9	1	6	7	8	4	1	6
<i>Enterococcus</i> spp.*	30	15	15	19	1	6	10	11	9	1	4
Outros	4	2	1	2	ND	1	1	ND	ND	ND	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	1	1	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pediococcus</i> spp.*	1	1	ND	1	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Streptococcus</i> spp.*	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Weisselia cibaria</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

\* Não identificado em nível de espécie

BAL: bactéria ácido láctica; n: número de isolados de bactérias ácido lácticas pertencentes ao respectivo gênero/espécie; ND: não detectada sensibilidade enzimática

#### 4.2. Atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos indicadores

Os resultados obtidos para os 101 isolados de BAL quanto à atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos indicadores utilizando a metodologia spot-on-the-lawn são apresentados na Tabela 7. Todos os gêneros de BAL testados produziram substâncias com atividade antimicrobiana contra os grupos de microrganismos indicadores testados, sendo *Listeria* spp. o gênero que apresentou maior sensibilidade (Tabela 7). Muitos estudos têm demonstrado a ampla atividade antimicrobiana de bacteriocinas produzidas por isolados autóctones de produtos lácteos e cárneos contra *Listeria* spp. (Rodríguez et al., 2000; de Martinis et al., 2001; Carvalho et al., 2006; Bizani et al., 2008; Bello et al., 2010), e os resultados do presente estudo confirmam a sensibilidade deste gênero às bacteriocinas produzidas por BAL.

As substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. apresentaram maior atividade contra *Staphylococcus* spp. do que contra BAL. Dávila et al. (2006) também obtiveram ampla inibição de *S. aureus* por bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. Já *Enterococcus* spp. produziram bacteriocinas mais ativas contra BAL do que contra *Staphylococcus* spp. De acordo com outros autores, muitas bacteriocinas produzidas por BAL possuem atividade contra bactérias intimamente relacionadas ao microrganismo produtor e muitas vezes são capazes de inibir *Listeria* spp. (de Martinis et al., 2001), e poucas são efetivas contra *Staphylococcus* spp. (Moreno et al., 2000; Bromberg et al., 2005), como foi o caso das bacteriocinas produzidas pelos *Enterococcus* spp. no presente estudo.

Mesmo pertencendo ao mesmo gênero/espécie, as substâncias antimicrobianas produzidas pelos isolados de BAL testados apresentaram distinto perfil de atividade contra os microrganismos indicadores, confirmando sua capacidade de produzir diferentes bacteriocinas. Alguns isolados (um *Lb. plantarum* - Lb15, e três *Lc. lactis* subsp. *lactis* - Lc08, Lc10 e Lc11) produziram bacteriocinas capazes de inibir todos os 36 microrganismos indicadores testados (Tabela 8), indicando seu potencial para uso como bioconservantes em alimentos.

As bacteriocinas produzidas pelos isolados do gênero *Lactococcus* spp. apresentaram maior atividade contra os microrganismos indicadores do que as produzidas por *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp (Tabela 7). Diversas cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* são capazes de produzir nisina, bacteriocina que possui amplo espectro de ação



contra microrganismos Gram-positivos. Essa bacteriocina é a única considerada segura para consumo (GRAS, generally regarded as safe - geralmente reconhecidos como seguros), e essa limitação tem estimulado pesquisas de novos isolados de BAL bacteriocinogênicos a fim de explorar seu potencial bioconservador como ferramenta auxiliar para segurança alimentar (Cotter et al., 2005; Castellano et al., 2008). A abundância de cepas de BAL capazes de produzir bacteriocinas evidencia a importância dessas substâncias em produtos lácteos e fermentados (Castellano et al., 2008). Ainda, *Lactococcus* spp. são considerados seguros de serem aplicados em alimentos quando comparados a outras BAL, devido sua natureza não-patogênica (Guinane et al., 2005).

*Enterococcus* spp., apesar de isolados em alta frequência, apresentaram pior desempenho quanto à atividade antimicrobiana quando comparados com *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. (Tabela 7). Mesmo assim, muitos *Enterococcus* spp. são descritos como bacteriocinogênicos e capazes de inibir o desenvolvimento de certos patógenos (Gomes et al., 2008; Maldonado-Barragán et al., 2009; Valenzuela et al., 2009). Porém, seu uso em alimentos deve ser bem avaliado, pois muitas cepas são capazes de resistir a antibióticos e podem apresentar genes de virulência. A identificação de cepas patogênicas é bem difícil, pois os genes de virulência são facilmente transferidos entre elas (Gomes et al., 2008; Valenzuela et al., 2009).

As bacteriocinas produzidas por isolados de *Lactobacillus* spp. apresentaram ampla atividade contra os microrganismos indicadores utilizados, porém menor do que as produzidas por *Lactococcus* spp. (Tabela 7). *Lactobacillus* spp. já foram descritos como produtores de bacteriocinas, como diferentes variações de plantaricinas, pediocinas e sakacinas, que possuem atividade antimicrobiana contra muitos microrganismos (Chen & Hoover, 2003; Elegado et al., 2004; Hernández et al., 2005; Héquet et al., 2007). Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com estas características e com outros trabalhos (Messi et al., 2001; Elegado et al., 2004).

Considerando os resultados iniciais, 15 isolados foram selecionados e submetidos à metodologia de diluição crítica para quantificação da atividade antimicrobiana em relação aos 36 microrganismos indicadores (Tabela 3). Entre os isolados selecionados, seis foram *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Lc05, Lc08, Lc10, Lc11, Lc22 e Lc21), quatro *Enterococcus* spp. (En08, En09, En11 e En37), um *En. faecalis* (En42) e quatro *Lb. plantarum* (Lb01, Lb02, Lb07 e Lb15). Os resultados obtidos para esses isolados pela metodologia spot-on-

the-lawn (triagem inicial) e pela diluição crítica (teste complementar) são apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10.

As bacteriocinas produzidas pelos isolados de *Lactococcus* spp., Lc10, Lc11 e Lc08 apresentaram ampla atividade contra os 3 grupos de microrganismos indicadores, pelas duas técnicas testadas (Tabela 8), indicando novamente seu potencial para uso como bioconservador em alimentos. Bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* spp. apresentaram maior inibição contra *Listeria* spp. e BAL, com pouca ação contra *Staphylococcus* spp., como verificado pelo teste inicial (spot-on-the-lawn) (Tabelas 7 e 9). Bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* spp. apresentaram menor atividade antimicrobiana por diluição crítica, mantendo pouca atividade contra *Listeria* spp. e BAL, e nenhuma contra *Staphylococcus* spp. (Tabela 10). De forma geral, as bacteriocinas apresentaram redução da atividade antimicrobiana nos testes quantitativos de inibição, pelo método de diluição crítica, quando comparados aos resultados qualitativos, obtidos pelo método spot-on-the-lawn (Tabelas 7, 8, 9 e 10). Essa variação na atividade antimicrobiana considerando diferentes metodologias já foi observada em outros estudos similares (Hernández et al., 2005; Carvalho et al., 2006; Jones et al., 2008; Alegria et al., 2010; Moraes et al., 2010). O que pode ser decorrente de vários processamentos aos quais os sobrenadantes das culturas são submetidos para a mensuração da atividade antimicrobiana pela metodologia da diluição crítica, o que pode interferir na atividade das bacteriocinas produzidas (Moreno et al., 2000; Alegria et al., 2010; Moraes et al., 2010).

Considerando os resultados por diluição crítica, os microrganismos que foram mais sensíveis à ação das bacteriocinas produzidas por BAL foram *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Lb. sakei* ATCC 15521 e *S. aureus* 26BP6 (Tabelas 8, 9 e 10). *L. monocytogenes* foi o microrganismo mais sensível, resultado semelhante ao obtido por de Martinis et al. (2003a). A alta frequência de sensibilidade desses microrganismos sugere que os mesmos podem ser usados em ensaios para detecção de isolados de BAL com atividade bacteriocinogênica, reduzindo o risco de não se identificar uma cepa que seja potencial produtora dessas substâncias (Bromberg et al., 2004).

Segundo Lewus et al. (1991) os microrganismos indicadores que devem ser testados num ensaio inicial de inibição deve refletir a aplicação final/proposta da BAL produtora de bacteriocina. *Listeria* spp., é um microrganismo psicotrófico capaz de se desenvolver à temperaturas entre 1 a 45 °C, o que a torna muito difícil de ser controlada em alimentos (Albano et al., 2007; Bizani et al., 2008). Outro perigo microbiológico que

pode estar presente em leite e derivados são *Staphylococcus* spp., cuja contaminação pode ocorrer na matéria-prima (leite mastítico), no ambiente de processamento dos alimentos (formação de biofilme) ou pela manipulação durante a preparação dos alimentos (Charlier et al., 2009). Como podem ocorrer variações na sensibilidade do microrganismo indicador e o desenvolvimento de cepas resistentes e/ou adaptadas às bacteriocinas, foi importante a utilização de diversas cepas de *Listeria* spp. e *Staphylococcus* spp. para verificação da sensibilidade apresentada por cada uma.

As substâncias antimicrobianas produzidas pelos vinte isolados de BAL que previamente não apresentaram sensibilidade em relação às enzimas testadas apresentaram atividade antimicrobiana contra muitos dos microrganismos indicadores testados, indicando a produção de outras substâncias antimicrobianas que não são bacteriocinas por esses isolados.

Alguns isolados de BAL mesmo pertencendo a gêneros conhecidos como potenciais produtores de bacteriocinas, não produziram substâncias capazes de inibir o desenvolvimento dos microrganismos indicadores testados (Tabela 7). A perda transitória da atividade antimicrobiana por BAL ou não expressão de genes de bacteriocinas já foram previamente descritos. Além disso, podem ter ocorrido interferências das condições ambientais para a produção de bacteriocinas, e até mesmo falhas na excreção dessas substâncias (Gálvez et al., 2007). Dessa forma, diferentes condições ambientais e nutricionais podem ser avaliadas para verificação das melhores combinações necessárias para a produção de bacteriocinas.

Tabela 7. Frequência de inibição apresentada pelos gêneros de BAL contra os 36 microrganismos indicadores (12 *Listeria* spp., 12 *Staphylococcus* spp., 12 BAL) utilizando o método spot-on-the-lawn.

Microrganismo indicador	<i>Lactococcus</i> spp. (27)	<i>Lactobacillus</i> spp. (27)	<i>Enterococcus</i> spp. (43)	Outros (4)
<i>Listeria</i> spp.				
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	26	23	34	2
<i>L. ivanovi</i> ATCC 19119	16	19	26	1
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	19	23	25	2
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	19	21	31	2
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	26	23	36	1
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	27	27	41	1
<i>L. monocytogenes</i> 52	22	19	38	1
<i>L. monocytogenes</i> 55	26	23	33	3
<i>L. monocytogenes</i> 60	21	21	32	2
<i>L. seeligeri</i> 31	25	23	36	3
<i>L. innocua</i> 76	25	22	36	3
<i>L. welshimeri</i> 47	26	24	37	2
<i>Staphylococcus</i> spp.				
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	12	16	8	2
<i>S. aureus</i> ATCC 12598	23	25	38	3
<i>S. aureus</i> ATCC 8095	17	19	20	3
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	16	17	19	2
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	18	18	17	2
<i>Staphylococcus</i> spp. ATCC 23235	16	21	17	2
<i>S. aureus</i> 23ST1	18	23	27	2
<i>S. aureus</i> 26BP6	19	21	22	2
<i>S. aureus</i> 27AF1	21	20	21	2
<i>S. aureus</i> 21AF3	15	18	21	3
<i>S. aureus</i> 27ST1	11	17	12	2
<i>S. aureus</i> 31BP2	17	23	23	2
Bactérias Ácido Láticas				
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	12	3	4	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11007	7	4	15	ND
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	11	15	22	1
<i>En. faecalis</i> ATCC 19433	8	2	17	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962	11	15	22	1
<i>Lb. sakei</i> ATCC 15521	26	19	40	2
<i>En. faecalis</i> En30	26	24	39	3
<i>En. faecalis</i> En43	25	25	40	4
<i>En. faecalis</i> En41	16	4	16	ND
<i>Enterococcus</i> spp. En31	25	26	38	4
<i>Lb. plantarum</i> Lb07	8	2	11	ND
<i>Lb. plantarum</i> Lb01	7	2	12	ND

ND: não detectado formação de halo de inibição

Tabela 8. Resultados obtidos para os seis isolados de *Lactococcus* spp., quanto ao diâmetro do halo (mm) por spot-on-the-lawn e título da substância antimicrobiana produzida por diluição crítica (UA/mL).

Microrganismo indicador	Lc11		Lc10		Lc08		Lc22		Lc05		Lc21	
	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC
<i>Listeria</i> spp.												
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	17	100	13	100	10	100	11	ND	12	ND	9	ND
<i>L. ivanovi</i> ATCC 19119	21	200	23	> 1600	20	100	22	200	15	ND	10	400
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	10	100	11	100	10	100	10	ND	7	ND	10	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	21	ND	21	100	16	100	15	ND	11	200	9	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	20	ND	18	100	20	ND	21	ND	15	ND	13	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	26	400	30	> 1600	22	> 1600	30	> 1600	21	ND	20	ND
<i>L. monocytogenes</i> 52	20	200	21	> 1600	22	ND	23	200	15	ND	20	ND
<i>L. monocytogenes</i> 55	18	ND	17	200	14	100	15	100	12	ND	10	ND
<i>L. monocytogenes</i> 60	15	400	20	> 1600	17	ND	ND	200	14	ND	13	ND
<i>L. seeligeri</i> 31	16	ND	14	200	17	ND	17	ND	14	ND	12	ND
<i>L. innocua</i> 76	19	ND	17	100	17	ND	17	ND	19	ND	13	ND
<i>L. welshimeri</i> 47	19	ND	15	100	17	ND	21	ND	9	ND	17	ND
<i>Staphylococcus</i> spp.												
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	19	100	17	ND	20	ND	27	ND	12	ND	7	200
<i>S. aureus</i> ATCC 12598	25	400	28	400	23	ND	26	ND	15	ND	12	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 8095	14	100	21	ND	16	400	19	ND	11	ND	10	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	15	ND	15	ND	8	ND	13	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	23	ND	15	ND	14	ND	15	ND	9	ND	9	ND
<i>Staphylococcus</i> spp. ATCC 23235	13	200	17	ND	16	ND	14	100	9	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> 23ST1	20	200	20	200	20	200	22	ND	14	ND	10	ND
<i>S. aureus</i> 26BP6	23	400	25	200	22	200	25	200	15	ND	12	100
<i>S. aureus</i> 27AF1	22	100	22	200	21	200	23	100	11	ND	15	ND
<i>S. aureus</i> 21AF3	13	ND	19	ND	15	ND	18	ND	11	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> 27ST1	16	ND	21	100	17	200	18	100	11	ND	7	ND
<i>S. aureus</i> 31BP2	21	200	22	200	19	100	22	ND	13	ND	11	ND

Lc: *Lactococcus*; SOL: diâmetro dos halos de inibição obtido pelo método spot-on-the-lawn (mm); DC: título de atividade antimicrobiana obtido pelo método de diluição crítica (UA/mL); ND: não detectado formação de halo de inibição

Continuação da Tabela 8.

Microrganismo indicador	Lc11		Lc10		Lc08		Lc22		Lc05		Lc21	
	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC
Bactérias Ácido Lácticas												
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	17	100	18	ND	14	400	15	400	12	ND	12	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11007	30	800	27	> 1600	26	800	29	> 1600	20	ND	26	ND
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	30	800	34	> 1600	22	400	29	400	18	ND	17	ND
<i>En. faecalis</i> ATCC 19433	29	400	30	> 1600	23	400	29	400	18	100	12	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962	30	800	37	> 1600	27	800	30	> 1600	18	ND	17	ND
<i>Lb. sakei</i> ATCC 15521	35	400	35	> 1600	32	400	35	> 1600	24	ND	17	ND
<i>En. faecalis</i> En30	15	400	12	> 1600	11	800	12	400	12	ND	12	ND
<i>En. faecalis</i> En43	16	200	19	200	14	400	14	100	14	ND	12	ND
<i>En. faecalis</i> En41	24	800	27	> 1600	22	> 1600	25	400	14	ND	26	ND
<i>Enterococcus</i> spp. En31	21	400	24	> 1600	19	400	22	ND	12	ND	17	ND
<i>Lb. plantarum</i> Lb07	22	400	19	> 1600	23	400	28	400	16	ND	13	ND
<i>Lb. plantarum</i> Lb01	21	400	22	> 1600	22	400	23	400	20	ND	11	ND

Lc: *Lactococcus*; SOL: diâmetro dos halos de inibição obtido pelo método spot-on-the-lawn (mm); DC: título de atividade antimicrobiana obtido pelo método de diluição crítica (UA/mL); ND: não detectado formação de halo de inibição

Tabela 9. Resultados obtidos para os cinco isolados de *Enterococcus* spp., quanto ao diâmetro do halo (mm) por spot-on-the-lawn e título da substância antimicrobiana produzida por diluição crítica (UA/mL).

Microrganismo indicador	En11		En09		En42		En08		En37	
	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC
<i>Listeria</i> spp.										
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	17	ND	16	ND	10	ND	16	100	16	ND
<i>L. ivanovi</i> ATCC 19119	22	400	25	ND	17	100	21	100	22	200
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	11	200	11	ND	10	100	11	ND	11	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	19	100	20	ND	15	ND	19	100	14	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	18	100	19	ND	20	100	18	100	17	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	23	200	22	ND	29	400	22	200	22	400
<i>L. monocytogenes</i> 52	22	200	23	ND	19	ND	22	400	21	400
<i>L. monocytogenes</i> 55	20	100	21	ND	12	ND	20	100	10	200
<i>L. monocytogenes</i> 60	23	200	21	ND	21	100	25	200	25	400
<i>L. seeligeri</i> 31	15	ND	15	ND	15	ND	14	100	14	ND
<i>L. innocua</i> 76	15	100	16	ND	16	100	13	ND	15	ND
<i>L. welshimeri</i> 47	15	ND	15	ND	19	ND	14	100	13	ND
<i>Staphylococcus</i> spp.										
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	ND	ND	ND	ND	16	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 12598	10	ND	10	ND	20	ND	11	ND	11	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 8095	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	ND	ND	ND	ND	11	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	ND	ND	ND	ND	12	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus</i> spp. ATCC 23235	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> 23ST1	7	ND	7	ND	16	ND	7	ND	7	ND
<i>S. aureus</i> 26BP6	ND	ND	ND	ND	20	100	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> 27AF1	ND	ND	ND	ND	19	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> 21AF3	ND	ND	ND	ND	16	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> 27ST1	ND	ND	ND	ND	16	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> 31BP2	ND	ND	ND	ND	18	ND	ND	ND	ND	ND

En: *Enterococcus*; SOL: diâmetro dos halos de inibição obtido pelo método spot-on-the-lawn (mm); DC: título de atividade antimicrobiana obtido pelo método de diluição crítica (UA/mL); ND: não detectado formação de halo de inibição

Continuação da Tabela 9.

Microrganismo indicador	En11		En09		En42		En08		En37	
	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC
Bactérias Ácido Lácticas										
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	ND	ND	ND	100	16	200	ND	100	ND	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11007	14	ND	15	ND	25	400	15	100	14	100
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	17	ND	15	ND	26	200	15	ND	15	ND
<i>En. faecalis</i> ATCC 19433	14	ND	13	ND	26	200	15	ND	15	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962	21	ND	19	ND	25	200	20	ND	19	ND
<i>Lb. sakei</i> ATCC 15521	22	100	22	ND	27	200	23	800	19	400
<i>En. faecalis</i> En30	13	ND	14	ND	12	ND	13	100	13	ND
<i>En. faecalis</i> En43	11	ND	11	ND	13	200	11	100	11	ND
<i>En. faecalis</i> En41	ND	ND	12	100	25	> 1600	12	ND	ND	ND
<i>Enterococcus</i> spp. En31	12	ND	11	ND	17	400	9	ND	10	ND
<i>Lb. plantarum</i> Lb07	12	ND	12	ND	23	200	11	ND	11	ND
<i>Lb. plantarum</i> Lb01	ND	ND	14	ND	20	200	17	100	12	ND

En: *Enterococcus*; SOL: diâmetro dos halos de inibição obtido pelo método spot-on-the-lawn (mm); DC: título de atividade antimicrobiana obtido pelo método de diluição crítica (UA/mL); ND: não detectado formação de halo de inibição



Tabela 10. Resultados obtidos para os quatro isolados de *Lactobacillus* spp., quanto ao diâmetro do halo (mm) por spot-on-the-lawn e título da substância antimicrobiana produzida por diluição crítica (UA/mL).

Microrganismo indicador	Lb02		Lb07		Lb01		Lb15	
	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC
<i>Listeria</i> spp.								
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	13	ND	14	ND	13	100	13	100
<i>L. ivanovi</i> ATCC 19119	10	ND	15	100	12	ND	22	200
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	9	ND	ND	ND	7	100	10	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	14	ND	11	ND	13	ND	23	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	11	100	19	ND	9	ND	17	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	17	200	11	100	7	ND	25	100
<i>L. monocytogenes</i> 52	15	ND	13	ND	ND	ND	17	200
<i>L. monocytogenes</i> 55	12	ND	11	ND	11	200	18	ND
<i>L. monocytogenes</i> 60	15	ND	14	ND	ND	100	18	200
<i>L. seeligeri</i> 31	11	ND	15	ND	15	100	15	ND
<i>L. innocua</i> 76	13	ND	14	ND	16	ND	17	100
<i>L. welshimeri</i> 47	11	ND	8	ND	10	ND	16	ND
<i>Staphylococcus</i> spp.								
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	ND	ND	14	ND	8	ND	19	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 12598	12	ND	12	ND	12	ND	25	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 8095	9	ND	11	ND	8	ND	20	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	7	ND	9	ND	9	ND	15	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	10	ND	12	ND	8	ND	16	ND
<i>Staphylococcus</i> spp. ATCC 23235	10	ND	9	ND	ND	ND	24	ND
<i>S. aureus</i> 23ST1	7	ND	9	ND	10	ND	21	ND
<i>S. aureus</i> 26BP6	12	ND	10	ND	9	ND	21	ND
<i>S. aureus</i> 27AF1	13	ND	10	ND	9	ND	21	ND
<i>S. aureus</i> 21AF3	9	ND	10	ND	10	ND	17	ND
<i>S. aureus</i> 27ST1	ND	ND	9	ND	10	ND	18	ND
<i>S. aureus</i> 31BP2	13	ND	15	ND	9	ND	21	ND

Lb: *Lactobacillus*; SOL: diâmetro dos halos de inibição obtido pelo método spot-on-the-lawn (mm); DC: título de atividade antimicrobiana obtido pelo método de diluição crítica (UA/mL); ND: não detectado formação de halo de inibição

Continuação da Tabela 10.

Microrganismo indicador	Lb02		Lb07		Lb01		Lb15	
	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC	SOL	DC
Bactérias Ácido Lácticas								
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	13	ND	ND	100	ND	ND	18	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11007	7	ND	ND	ND	ND	ND	26	ND
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	13	ND	ND	ND	ND	ND	30	ND
<i>En. faecalis</i> ATCC 19433	11	ND	ND	ND	ND	ND	27	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962	15	ND	ND	ND	ND	ND	31	ND
<i>Lb. sakei</i> ATCC 15521	27	200	10	ND	10	200	37	100
<i>En. faecalis</i> En30	11	ND	13	ND	14	100	12	ND
<i>En. faecalis</i> En43	13	ND	15	ND	11	ND	19	ND
<i>En. faecalis</i> En41	18	ND	ND	ND	ND	ND	23	ND
<i>Enterococcus</i> spp. En31	14	ND	14	ND	15	ND	22	ND
<i>Lb. plantarum</i> Lb07	9	ND	ND	ND	ND	ND	15	ND
<i>Lb. plantarum</i> Lb01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25	ND

Lb: *Lactobacillus*; SOL: diâmetro dos halos de inibição obtido pelo método spot-on-the-lawn (mm); DC: título de atividade antimicrobiana obtido pelo método de diluição crítica (UA/mL); ND: não detectado formação de halo de inibição

### 4.3. Condições de incubação para produção das bacteriocinas

Segundo Todorov & Dicks (2006b), são muitas as variações das condições de desenvolvimento requeridas por BAL para produção ótima de bacteriocinas. Vários fatores podem interferir na produção dessas substâncias. Considerando esses fatores, testes de antagonismo foram conduzidos em duas etapas, a fim de verificar as condições mais favoráveis para produção de bacteriocinas, avaliando: 1) meios de cultura (considerando oito variações), e 2) condições de incubação (tempo e temperatura). Nessa etapa foram considerados os três microrganismos que apresentaram maior sensibilidade no teste de avaliação da atividade antimicrobiana: *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* 26BP6, e *Lb. sakei* ATCC 15521 (Tabelas 7, 8, 9 e 10).

#### 4.3.1. Interferência de meios de cultura

Um fator relevante que pode interferir na produção de bacteriocinas por BAL é a utilização de diferentes meios de cultura. Dependendo da composição do meio de cultura utilizado, pode ocorrer o favorecimento da produção de determinada substância antimicrobiana, o que pode ser controlado para evitar a produção de substâncias não desejadas na identificação de isolados bacteriocinogênicos, como ácidos e peróxido de hidrogênio (Bromberg et al., 2004; Bello et al., 2010; Moraes et al., 2010). Nessa etapa, quatro isolados de BAL que apresentaram os melhores resultados na etapa de verificação do espectro de ação por diluição crítica (Tabelas 8 e 9) foram selecionados e sua atividade antimicrobiana mensurada por diluição crítica considerando oito variações de meios de cultura. Foram selecionados três isolados de *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Lc10, Lc11 e Lc12) e um de *En. faecalis* (En42). Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 11, 12 e 13.

As bacteriocinas produzidas pelos isolados testados apresentaram melhores resultados de inibição contra *Lb. sakei* ATCC 15521 (Tabela 13). Os maiores títulos de inibição foram observados com os meios de cultura cuja base foi o caldo MRS, modificado ou não. A utilização do M17 não resultou em produção de bacteriocinas, exceto para os isolados Lc11 e Lc22, quando utilizado *Lb. sakei* ATCC 15521 como microrganismo indicador (Tabela 13). Bacteriocinas produzidas por En42 apresentaram atividade antimicrobiana apenas quando utilizado o meio MRSm, independente do microrganismo indicador utilizado (Tabelas 11, 12 e 13). Lc10 foi o isolado que apresentou melhor

desempenho de inibição, produzindo altos títulos de bacteriocinas contra todos os microrganismos indicadores, principalmente utilizando MRS como meio de cultura base (Tabelas 11, 12 e 13).

Tabela 11. Quantificação da produção de bacteriocinas pelo método da diluição crítica (UA/mL) nos diferentes meios de cultura utilizando *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como microrganismo indicador.

Meios de cultura	Lc11	Lc10	Lc22	En42
MRS	400	100	400	ND
MRS + cisteína	200	400	400	ND
MRSm	100	400	100	100
MRSm + cisteína	ND	400	200	ND
BHI	100	ND	100	ND
BHI + cisteína	ND	ND	ND	ND
M17	ND	ND	ND	ND
M17 + cisteína	ND	ND	ND	ND

MRS: de Man, Rogosa & Sharpe; MRSm: MRS modificado; BHI: infusão de cérebro e coração; Lc: *Lactococcus*, En: *Enterococcus*; ND: não detectado formação de halo de inibição

Tabela 12. Quantificação da produção de bacteriocinas pelo método da diluição crítica (UA/mL) nos diferentes meios de cultura utilizando *Staphylococcus aureus* 26BP6 como microrganismo indicador.

Meio de cultura	Lc11	Lc10	Lc22	En42
MRS	100	> 1600	400	ND
MRS + cisteína	200	400	200	ND
MRSm	200	800	100	100
MRSm + cisteína	ND	800	100	ND
BHI	ND	100	ND	ND
BHI + cisteína	ND	100	ND	ND
M17	ND	ND	ND	ND
M17 + cisteína	ND	ND	ND	ND

MRS: de Man, Rogosa & Sharpe; MRSm: MRS modificado; BHI: infusão de cérebro e coração; Lc: *Lactococcus*, En: *Enterococcus*; ND: não detectado formação de halo de inibição

Tabela 13. Quantificação da produção de bacteriocinas pelo método da diluição crítica (UA/mL) nos diferentes meios de cultura utilizando *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 como microrganismo indicador.

Meio de cultura	Lc11	Lc10	Lc22	En42
MRS	> 1600	> 1600	> 1600	ND
MRS + cisteína	> 1600	> 1600	> 1600	ND
MRSm	> 1600	> 1600	800	800
MRSm + cisteína	ND	> 1600	> 1600	ND
BHI	800	> 1600	> 1600	ND
BHI + cisteína	ND	> 1600	400	ND
M17	100	ND	100	ND
M17 + cisteína	400	ND	100	ND

MRS: de Man, Rogosa & Sharpe; MRSm: MRS modificado; BHI: infusão de cérebro e coração; Lc: *Lactococcus*, En: *Enterococcus*; ND: não detectado formação de halo de inibição

A suplementação dos meios de cultura com cisteína não melhorou a produção de bacteriocinas em nenhum dos casos. O título de bacteriocinas apresentado ao adicionar cisteína foi igual ou inferior aos resultados obtidos em outros meios sem adição dessa substância. A cisteína é considerada uma importante fonte para o desenvolvimento de BAL (Payne et al., 1999), podendo influenciar na produção de bacteriocinas. Entretanto, os resultados obtidos mostraram que para as BAL analisadas essa substância não foi relevante.

Muitos estudos têm reportado que o MRS é o melhor meio de cultura para o desenvolvimento de BAL e produção de bacteriocinas, quando comparado a outros meios de cultura (Avonts et al., 2004; Todorov & Dicks, 2005; 2006b; Settanni et al., 2008; Moraes et al., 2010). Os resultados obtidos confirmam essas observações, principalmente em relação aos isolados de *Lactococcus* avaliados. Em relação ao isolado de *En. faecalis* (En42), a redução da quantidade de carboidrato na composição do MRS determinou a produção de bacteriocinas contra os três microrganismos indicadores avaliados.

Meios de cultura contendo baixos níveis de carboidratos, como o BHI (2% de glicose), são importantes nos testes de antagonismo pois a BAL irá produzir menor quantidade de ácidos, permitindo uma melhor identificação de cepas bacteriocinogênicas (Harris et al, 1989; Lewus et al., 1991; Lewus & Montville, 1991; de Martinis et al., 2001). Entretanto, esse meio de cultura, adicionado ou não de cisteína, não determinou a produção relevante de bacteriocinas pelas BAL avaliadas, apresentando desempenho similar ou inferior ao obtido pelo MRS e MRSm.

Em relação ao M17, a baixa frequência de produção de bacteriocinas e em títulos inferiores aos observados com outros meios de cultura, pode ser decorrente do alto nível de lactose em sua composição. Esse açúcar pode ter determinado produção excessiva de ácido láctico, levando à redução do pH durante a etapa de cultivo, inibindo a produção de bacteriocinas, ou mesmo interferindo em sua atividade (Parente & Ricciardi, 1999; Tomé et al., 2008b). Assim, após a etapa de neutralização, as bacteriocinas produzidas pela maioria dos isolados apresentou pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana. Quando essa etapa não é considerada, os resultados de inibição utilizando-se M17 como meio de cultura podem ser melhores (Cheigh et al., 2002). Em condições de stress (baixo pH), o tempo necessário para que a BAL avaliada alcance a fase estacionária é maior e assim, a produção/atividade da bacteriocina será menor, o que é compatível com os resultados obtidos.

Tanto para *Enterococcus* spp. quanto para *Lactococcus* spp., o meio de cultura MRSm foi adequado para que estes isolados produzissem bacteriocinas, mesmo que em baixas quantidades em alguns casos (Tabelas 11, 12 e 13). Esses resultados sugerem que o meio MRSm pode ser considerado adequado para identificação da atividade bacteriocinogêncica de um isolado de BAL, mesmo que em uma etapa inicial de identificação. Por conter uma menor concentração de carboidrato (0,5%), o MRSm determina uma menor produção de ácidos orgânicos e evita uma redução relevante do seu pH. Essas características determinam maior rapidez para as BAL em análise atingirem a fase estacionária e gerarem maior produção de bacteriocinas (Parente & Ricciardi, 1999).

#### 4.3.2. Interferência de tempo e temperatura de incubação

Os resultados obtidos quanto à frequência de atividade antimicrobiana apresentada pelas substâncias produzidas pelos 101 isolados de BAL nas diferentes combinações de tempo e temperatura são apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16. Considerando *L. monocytogenes* ATCC 7644 como microrganismo indicador (Tabela 14), foram observadas maiores frequências de isolados com produção de substâncias antimicrobianas após 24h de incubação a 25 °C, com resultados de frequência similares após 12h de incubação a 35 °C para *Lactococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. Resultados semelhantes foram observados quando utilizado *S. aureus* 26BP6 como microrganismo

indicador (Tabela 15), com maiores frequências de isolados produzindo bacteriocina após incubação por 24h a 25 °C.

Menores frequências de BAL produtoras foram observadas quando *Lb. sakei* ATCC 15521 (Tabela 16) foi utilizado como microrganismo indicador, quando comparadas aos demais (Tabelas 14 e 15). Porém, maiores frequências de atividade antimicrobiana foram observadas após incubação por 24h a 25 °C para *Lactococcus* spp. e *Enterococcus* spp. Em relação à *Lactobacillus* spp., as maiores frequências de isolados produtores foram observadas após 48h a 25 °C. Em relação aos demais gêneros identificados, poucas diferenças foram observadas entre as diferentes condições testadas e microrganismos indicadores considerados (Tabelas 14, 15 e 16). Esses resultados sugerem diferentes condições ideais para produção de diferentes substâncias antimicrobianas pelas BAL analisadas.

Considerando esses resultados, pode ser sugerida combinação dessas condições de incubação para otimização da produção de substâncias antimicrobianas pelos isolados de BAL avaliados, que seria a 25 °C por 24h. Ainda, muitos isolados apresentaram resultados similares com menor tempo de incubação, porém à temperatura de 35 °C (Tabelas 14, 15 e 16), o que indica a possibilidade de redução no período de incubação para obtenção das bacteriocinas produzidas. Como a produção de bacteriocinas é afetada por diferentes condições, como combinações de tempo e temperatura, a otimização da sua produção e desenvolvimento de sua atividade pode ter importante significado econômico (Cheigh et al., 2002).

Essa variação de comportamento apresentado pelos isolados de BAL dependendo das condições de tempo e temperatura de incubação já foi observada em outros estudos similares (Cheigh et al., 2002; Mataragas et al., 2003; Campos et al., 2006). No presente estudo, muitos isolados foram capazes de apresentar atividade antimicrobiana após 12h de incubação (Tabelas 14, 15 e 16). Segundo Mataragas et al. (2003), as bacteriocinas parecem ser os primeiros metabólitos a serem produzidos, assim a sua atividade já é detectável após 6h de desenvolvimento das culturas de BAL.

Tabela 14. Influência do tempo e temperatura de incubação na produção de bacteriocinas pelos 101 isolados de BAL, utilizando *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como microrganismo indicador.

Gênero/espécie	n	25°C				35°C			
		12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h
<i>Lactococcus</i> spp.	27	9	17	12	10	15	6	7	1
<i>Lc. lactis</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	22	7	15	11	10	13	4	6	ND
<i>Lc. garviae</i>	4	2	2	1	ND	2	2	1	1
<i>Lactobacillus</i> spp.	27	5	17	13	12	16	15	9	7
<i>Lb. plantarum</i>	24	4	15	12	11	13	14	9	6
<i>Lb. sakei</i>	1	1	1	ND	ND	1	ND	ND	ND
<i>Lb. fermentum</i>	2	ND	1	1	1	2	1	ND	1
<i>Enterococcus</i> spp.	43	10	31	18	24	26	20	11	10
<i>En. faecalis</i>	13	4	10	2	9	10	6	2	4
<i>Enterococcus</i> spp.*	30	6	21	16	15	16	14	9	6
Outros	4	2	3	2	2	3	3	2	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pediococcus</i> spp.*	1	ND	ND	1	ND	1	1	1	ND
<i>Streptococcus</i> spp.*	1	1	1	1	1	1	1	1	ND
<i>Weisselia cibaria</i>	1	1	1	ND	1	1	1	ND	1

\* Não identificado em nível de espécie

ND: não detectado formação de halo de inibição; n: número de isolados de bactérias ácido lácticas pertencentes ao respectivo gênero/espécie



Tabela 15. Influência do tempo e temperatura de incubação na produção de bacteriocinas pelos 101 isolados de BAL, utilizando *Staphylococcus aureus* 26BP6 como microrganismo indicador.

Gênero/espécie	n	25°C				35°C			
		12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h
<i>Lactococcus</i> spp.	27	6	13	10	5	10	5	3	1
<i>Lc. lactis</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	22	6	11	9	5	8	4	3	1
<i>Lc. garviae</i>	4	ND	2	1	ND	2	1	ND	ND
<i>Lactobacillus</i> spp.	27	6	18	19	8	12	16	10	7
<i>Lb. plantarum</i>	24	5	17	17	7	12	16	9	6
<i>Lb. sakei</i>	1	1	ND	1	1	ND	ND	ND	ND
<i>Lb. fermentum</i>	2	ND	1	1	ND	ND	ND	1	1
<i>Enterococcus</i> spp.	43	6	28	20	18	19	10	11	11
<i>En. faecalis</i>	13	2	12	10	9	9	6	5	6
<i>Enterococcus</i> spp.*	30	4	16	10	9	10	4	6	5
Outros	4	1	2	2	1	2	2	1	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pediococcus</i> spp.*	1	1	1	1	1	1	1	1	ND
<i>Streptococcus</i> spp.*	1	ND	1	1	ND	1	1	ND	ND
<i>Weisselia cibaria</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1

\* Não identificado em nível de espécie

ND: não detectado formação de halo de inibição; n: número de isolados de bactérias ácido lácticas pertencentes ao respectivo gênero/espécie

Tabela 16. Influência do tempo e temperatura de incubação na produção de bacteriocinas pelos 101 isolados de BAL, utilizando *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 como microrganismo indicador.

Gênero/espécie	n	25°C				35°C			
		12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h
<i>Lactococcus</i> spp.	27	1	8	4	6	9	5	1	2
<i>Lc. lactis</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	22	1	6	3	6	7	2	1	2
<i>Lc. garviae</i>	4	ND	2	1	ND	2	3	ND	ND
<i>Lactobacillus</i> spp.	27	2	6	11	2	9	3	1	5
<i>Lb. plantarum</i>	24	2	5	10	ND	8	3	1	5
<i>Lb. sakei</i>	1	ND	ND	1	2	ND	ND	ND	ND
<i>Lb. fermentum</i>	2	ND	1	ND	ND	1	ND	ND	ND
<i>Enterococcus</i> spp.	43	3	14	11	11	13	7	4	3
<i>En. faecalis</i>	13	2	6	5	6	2	5	ND	1
<i>Enterococcus</i> spp.*	30	1	8	6	5	11	2	4	2
Outros	4	1	1	2	1	1	ND	ND	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pediococcus</i> spp.*	1	1	ND	1	ND	1	ND	ND	ND
<i>Streptococcus</i> spp.*	1	ND	1	1	1	ND	ND	ND	ND
<i>Weisselia cibaria</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

\* Não identificado em nível de espécie

ND: não detectado formação de halo de inibição; n: número de isolados de bactérias ácido lácticas pertencentes ao respectivo gênero/espécie

Os 15 isolados de BAL previamente selecionados na etapa da avaliação da atividade antimicrobiana tiveram os diâmetros de seus halos de inibição mensurados nos diferentes tempos e temperaturas de incubação. Considerando que a população inicial de todas as BAL testadas foi padronizada em aproximadamente  $10^2$  UFC/mL, a comparação entre os diâmetros dos halos pode ser considerada adequada e relevante para se identificar diferenças de potencial antimicrobiano entre os isolados. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 17, 18 e 19.

Tabela 17. Diâmetros (mm) dos halos de inibição nos diferentes tempos e temperaturas utilizando *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como microrganismo indicador.

BAL avaliada	25 °C				35 °C			
	12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h
Lc11	5,8	5	5	8	5,7	ND	ND	ND
Lc10	ND	ND	8	8	5	ND	5	ND
Lc08	ND	ND	6	6	5	ND	6	ND
Lc22	ND	5	6	6	4,5	ND	6	ND
Lc05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lc21	ND	6	6	8	5	ND	ND	ND
En11	ND	6	ND	6	5	5	6	ND
En09	ND	6	ND	6	5	5	6	ND
En42	ND	5	7	7,3	5	6	ND	ND
En08	ND	5	5	ND	5	5	ND	ND
En37	ND	5	6	ND	ND	5	ND	ND
Lb02	ND	5	ND	8	ND	ND	ND	ND
Lb07	5	7	ND	16	10	6	7,3	6
Lb01	ND	ND	ND	6,7	6	6	ND	7
Lb15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

BAL: bactéria ácido láctica; Lc: *Lactococcus*; En: *Enterococcus*; Lb: *Lactobacillus*;  
 ND: não detectada formação de halo de inibição

Em relação à *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Tabela 17), bacteriocinas produzidas por Lb07 apresentaram maior potencial de inibição, apresentando halo de 16 mm de diâmetro após 12h de incubação. De maneira geral, a combinação 25 °C por 72h de incubação foi a que determinou maiores halos de inibição para todos os isolados testados. Lc05 e Lb15 não produziram substâncias antimicrobianas nesse teste contra o microrganismo indicador. Ainda, bacteriocinas produzidas por alguns isolados

apresentaram atividade antimicrobiana após incubação a 35 °C já em 48h, porém em menor frequência do que quando incubados a 25 °C.

Tabela 18 Diâmetros (mm) dos halos de inibição nos diferentes tempos e temperaturas utilizando *Staphylococcus aureus* 26BP6 como microrganismo indicador.

BAL avaliada	25 °C				35 °C			
	12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h
Lc11	5	5,5	4,7	10	ND	5	5	13
Lc10	ND	8,7	10,7	10	ND	ND	6	ND
Lc08	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND
Lc22	ND	5	5	ND	5	ND	6	ND
Lc05	ND	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND
Lc21	ND	6	8	5	4,8	ND	ND	ND
En11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
En09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
En42	ND	7	6	6	6	ND	ND	ND
En08	ND	ND	6	ND	ND	ND	ND	ND
En37	ND	ND	6	ND	4,5	ND	ND	ND
Lb02	ND	5	5	ND	5	5	ND	ND
Lb07	5	5,7	5	11	6,5	6	6	7,3
Lb01	ND	ND	6	ND	ND	ND	ND	ND
Lb15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

BAL: bactéria ácido láctica; Lc: *Lactococcus*; En: *Enterococcus*; Lb: *Lactobacillus*; ND: não detectada formação de halo de inibição

Considerando *S. aureus* 26BP6 como microrganismo indicador, foi observada menor frequência de resultados de atividade antimicrobiana (Tabela 18). Lc11 apresentou o melhor desempenho de inibição, após incubação a 35 °C por 72h. Quanto aos demais isolados, as melhores performances de inibição ocorreram com incubação a 25 °C em diferentes tempos. En11 e En09 não apresentaram atividade antimicrobiana nesse teste contra o microrganismo indicador.

Finalmente, em relação à *Lb. sakei* ATCC 15521 também foi observada menor frequência de atividade antimicrobiana pelas BAL testadas (Tabela 19). Os melhores resultados foram obtidos após incubação a 25 °C por 72h, exceto para En08 e Lb02 que apresentaram melhores performances de inibição a 35 °C por 72h.

Tabela 19. Diâmetros (mm) dos halos de inibição nos diferentes tempos e temperaturas utilizando *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 como microrganismo indicador.

BAL avaliada	25 °C				35 °C			
	12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h
Lc11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lc10	ND	8	ND	11,3	5	6	6	ND
Lc08	ND	ND	ND	16	ND	ND	ND	ND
Lc22	5	6	ND	14	5	ND	ND	10
Lc05	ND	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lc21	ND	5	ND	8,3	5	ND	ND	ND
En11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
En09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
En42	5	8	ND	12	ND	6	ND	ND
En08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6
En37	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lb02	ND	ND	6	ND	ND	5	ND	10
Lb07	ND	ND	8	ND	ND	ND	ND	ND
Lb01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lb15	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND

BAL: bactéria ácido láctica; Lc: *Lactococcus*; En: *Enterococcus*; Lb: *Lactobacillus*; ND: não detectada formação de halo de inibição

Os resultados obtidos sugerem que a produção máxima de bacteriocinas pelas diferentes BAL ocorre em diferentes condições de incubação. A produção de bacteriocinas usualmente ocorre durante a fase exponencial de multiplicação das BAL, atingindo seu potencial máximo ao final dessa fase ou durante a fase estacionária (Parente e Ricciardi, 1994; Cheigh et al., 2002; Campos et al., 2006). Considerando os resultados obtidos (Tabelas 17, 18 e 19), observa-se que os isolados testados apresentaram maiores halos de inibição após 48h ou 72h de incubação, supostamente nessas etapas de multiplicação.

Outros trabalhos realizados também demonstraram diferentes tempos e temperaturas ideais para produção máxima de diferentes bacteriocinas. Campos et al. (2006), observaram que para uma cepa de *Lc. lactis* subsp. *lactis* a produção máxima de bacteriocina se dava a 30 °C após 33h e 46h de incubação, em relação a duas cepas de *L. monocytogenes*, e após 21h contra *S. aureus*. Os mesmos autores observaram que uma cepa de *En. faecium* apresentou produção máxima de bacteriocinas após incubação a 30 °C por 21h contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Liu et al. (2005) observaram atividade antimicrobiana máxima de nisina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* a 31 °C contra outra

BAL (*Lb. leichmannii*). Mataragas et al. (2003) observaram que para uma cepa de *Lb. curvatus*, a temperatura ideal para produção máxima de bacteriocinas foi a 25 °C. Esses dados evidenciam a diversidade de comportamento antimicrobiano dependendo da cepa de BAL analisada, como observado no presente estudo.

A partir desses resultados, pode-se constatar que diferentes tempos e temperaturas de incubação interferem diretamente na produção/atividade das bacteriocinas produzidas por BAL. Assim, pode-se sugerir condições nas quais é possível detectar a produção de bacteriocinas para a maioria das cepas pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*. Entretanto, é importante considerar que essas condições podem variar de cepa para cepa, mesmo pertencendo ao mesmo gênero, dependendo das exigências de cada cepa em particular.

Estudos amplos de antagonismo, considerando diversos gêneros e espécies de BAL, são importantes para a definição das principais características e necessidades para produção de bacteriocinas por cepas isoladas de alimentos. A partir desses resultados, é possível uma triagem mais direcionada, permitindo a identificação de isolados com grande potencial bacteriocinogênico com maior segurança. Assim, estudos mais detalhados e específicos podem ser conduzidos com poucos isolados de BAL, aqueles que apresentaram resultados relevantes na triagem inicial e potenciais candidatos a serem utilizados como ferramentas de segurança alimentar em indústrias de alimentos.

A caracterização das substâncias antimicrobianas produzidas por BAL bacteriocinogênicas é o passo inicial para atender a atual tendência mundial de consumo de produtos naturais e minimamente processados. O que tem estimulado a indústria de alimentos a utilizar bacteriocinas, em conjunto ou não com os seus microrganismos produtores (BAL), na tentativa de reduzir o risco de contaminação natural por patógenos e deteriorantes (de Martinis & Freitas, 2003). Esse estudo demonstrou as melhores condições para obter a produção de bacteriocinas por isolados de BAL, e ainda demonstrou que as bacteriocinas produzidas por alguns isolados possuem ampla atividade contra microrganismos patogênicos frequentemente associados a doenças transmitidas por alimentos, indicando potencial aplicação em alimentos para o controle de *Listeria* spp. e *Staphylococcus* spp. Para tal aplicação, são necessários mais estudos para esclarecer como esses isolados irão se comportar quando aplicados nos alimentos.

## 5. CONCLUSÕES

- ✓ As substâncias produzidas pelos isolados avaliados apresentaram grande variação no padrão de sensibilidade enzimática de suas substâncias antimicrobianas produzidas, indicando a produção simultânea de diferentes bacteriocinas;
- ✓ As bacteriocinas produzidas pelos isolados avaliados apresentaram ampla atividade contra os microrganismos indicadores considerados, sendo *Listeria* spp. o grupo mais sensível e as substâncias produzidas pelos isolados identificadas como *Lactococcus* spp. tiveram maior atividade antimicrobiana;
- ✓ A produção de bacteriocinas foi mais facilmente evidenciada utilizando-se meios de cultura tradicionalmente utilizados para cultivo de BAL, como o MRS. Redução do teor de glicose para 0,05% no MRS e adição de cisteína não modificaram os resultados;
- ✓ As condições de tempo e temperatura de incubação das BAL interferiram diretamente na produção de bacteriocinas, com melhores performances a 25 °C por 24h. Os resultados obtidos variaram de acordo com as diferentes BAL testadas;
- ✓ Foram verificadas variações quanto à atividade antimicrobiana das bacteriocinas produzidas e quanto às condições ideais de produção de bacteriocinas. Essa variabilidade demonstra a complexidade da microbiota lática naturalmente presente em leite e queijo, bem como do seu potencial antimicrobiano, demandando estudos complementares para detalhamento das substâncias produzidas e a aplicabilidade das mesmas como bioconservantes em alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASEN, I.M.; MORETO, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; STORRO, I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. **Applied Microbiological Biotechnology**, v.53, p.159-166, 2000.
- ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.169-185, 1995.
- 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.
- ALEGRÍA, A.; DELGADO, S.; ROCES, C.; LÓPEZ, B.; MAYO, B. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p.61-66, 2010.
- ALVES, V.F.; MARTINEZ, R.C.R.; LAVRADOR, M.A.S.; DE MARTINIS, E.C.P. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science**, v.74, p.623-627, 2006.
- ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, P.G.; PENNA, T.C.V. Nisin biotechnological production and application: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.146-154, 2009.
- ASTERI, I.; KITTAKI, N.; TSAKALIDOU, E. The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat’s milk soft cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.2, p.234-242, 2010.
- AVONTS, L.; UYTVEN, E.V.; DE VUYST, L. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. **International Dairy Journal**, v.14, p.947-955, 2004.



- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMNEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. New York: Marcel Dekker Inc, 2004. p.01-66.
- BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; CAVALETTI, L.; OVÍDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, p.591-596, 2007.
- BELLO, B.D.; RANTSIOUA, K.; BELLIOB, A.; ZEPPAA, G.; AMBROSOLIA, R.; CIVERAB, T.; COCOLINA, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT. Food Science and Technology**, v.43, p.1151-1159, 2010.
- BENKERROUM, N.; OUBEI, H.; ZAHAR, M.; DILA, S.; FILALI-MALTOUF, A. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.960-968, 2000.
- BENKERROUM, N.; GHOUATI, Y.; GHALFI, H.; ELMEJDOUB, T.; ROBLAIN, D.; JACQUES, P.; THONART, P. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a model cultured milk (lben) by *in situ* bacteriocin production from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. **International Journal of Dairy Technology**, v.55, n.3, p.145-151, 2002.
- BIZANI, D.; MORRISSY, J.A.C.; DOMINGUEZ, A.P.M.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.229-233, 2008.
- BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C.L.; DELBONI, R.R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.137-144, 2004.
- BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C.; OLIVEIRA, P.T.V. Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC

- 204 and the effect of this compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.351-358, 2005.
- 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. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.135-144, 2006.
- CAMPOS, C.A.; RODRÍGUEZ, O.; CALO-MATA, P.; PRADO, M.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Research International**, v.39, p.356-364, 2006.
- CARIDI, A. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. **International Journal of Dairy Technology**, v.56, n.2, p.105-110, 2003.
- CAROLISSEN-MACKAY, V.; ARENDSE, G.; HASTINGSB, J.W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p.1-16, 1997.
- CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.4, p.281-370, 2002.
- CARVALHO, A.A.T.; PAULA, R.A.; MANTOVANI, H.C.; MORAES, C.A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. **Food Microbiology**, v.23, p.213-219, 2006.
- CASALTA, E.; MONTEL, M.C. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.271-273, 2008.
- CASALTA, E.; SORBA, J.M.; AIGLE, M.; OGIER, J.C. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, n.3, p.243-251, 2009.

- 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**, p.79, v.483-499, 2008.
- CHARLIER, C.; CRETENET, M.; EVEN, S.; LOIR, Y.L. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. **International Journal of Food Microbiology**, v.131, n.1, p.131-139, 2009.
- CHEIGH, C.; CHOI, H.; PARK, H.; KIM, S.; KOOK, M.; KIM, T.; HWANG, J.; PYUN, Y. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. **Journal of Biotechnology**, v.95, p.225-235, 2002.
- CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews Food Science**, v.2, p.82-100, 2003.
- 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.
- CORDANO, A.M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.175-178, 2001.
- COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P.R. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.777-788, 2005.
- DÀVILA, E.; ZAMORA, L.M.; PLA, M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Identification and antagonistic activity of lactic acid bacteria occurring in porcine blood from industrial slaughterhouses - a preliminary study. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.207-211, 2006.
- DAW, M.A.; FALKINER, F.R. Bacteriocins: Nature, Function and Structure. **Micron**, v.27, n.6, p.467-479, 1996.
- DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.119-126, 1998.

- DE MARTINIS, E.C.P.; PÚBLIO, M.R.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.32-37, 2001.
- DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.114-119, 2003a.
- DE MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados à vácuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.195-199, 2003b.
- DE MARTINIS, E.C.P.; FREITAS, F.Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin production. **Food Control**, v.14, p.197-200, 2003.
- DEEGAN, L.H.; 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.
- DELVES-BROUGHTON, J. The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards Gram negative bacteria. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.32, p.87-97, 1993.
- EIJSSINK, V.G.H.; SKEIE, M.; MIDDELHOVEN, P.H.; BRURBERG, M.B.; NES, I.F. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. **Applied Environment Microbiology**, v.64, n.32, p.75-81, 1998.
- ELEGADO, F.B.; GUERRA, M.A.R.V.; MACAYAN, R.A.; MENDOZA, H.A.; LIRAZAN, M.B. Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, p.11-18, 2004.
- ENNAHAR, S.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: Antibacterial activity and food preservation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, n.6, p.705-716, 1999.

- FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v.19, p.3-11, 2009.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.51-70, 2007.
- GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E.; CANN, I.K.O.; MARTIN, S.E.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; REGALADO, C. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v.19, p.670-680, 2008.
- GHRAIRI, T.; FRERE, J.; BERJEAUD, J.M.; MANAI, M. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Food Control**, v.19, p.162-169, 2008.
- GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C.; FELIS, G.E.; SECHI, L.A.; FRANCO, B.D.G.M.; DE MARTINIS, E.C.P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v.25, p.668-675, 2008.
- GONZÁLEZ, B.; ARCA, P.; MAYO, B.; SUAREZ, J.E. Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2158-2163, 1994.
- 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 of Applied Microbiology**, v.98, p.1316-1325, 2005.
- HAN, B.Z.; MENG, Y.; LI, M.; YANG, Y.-X.; REN, F.-Z.; ZENG, Q.-K.; NOUT, M.J.R. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. **Food Control**, v.18, p.742-746, 2007.
- HANSEN, J.N. Antibiotics synthesized by post translational modification. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.535-564, 1993.

- 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.51, p.29-31, 1989.
- HÉQUET, A.; LAFFITTE, V.; SIMON, L.; DE SOUZA-CAETANO, D.; THOMAS, C.; FREMAUX, C.; BERJEAUD, J. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.67-74, 2007.
- HERNÁNDEZ, D.; CARDELL, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.77-84, 2005.
- HERRANZ, C.; CASAUS, P.; MUKHOPADHYAY, S.; MARTINEZ, J.M.; RODRÍGUEZ, J.M.; NES, I.F.; HERNÁNDEZ, P.E.; CINTAS, L.M. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. **Food Microbiology**, v.18, p.115-131, 2001.
- HERREROS, M.A.; ARENAS, R.; SANDOVAL, M.H.; CASTRO, J.M.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. **International Dairy Journal**, v.17, n.4, p.328-335, 2007.
- HOLZAPFEL, H.W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.365S-373S, 2001.
- HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. New York: Academic Press, 1993.
- HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p.S139-S150, 1998.

- JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v.59, p.171-200, 1995.
- JAY, J.M. Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods OR, why did human listeriosis and hemorrhagic colitis become foodborne diseases? **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.15, n.11, p.674-677, 1995.
- JAY, J.M. Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. **Meat Science**, v.43, p.S59-S66, 1996.
- JONES, R.J.; HUSSEIN, H.M.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL, G.; TAGG, J.R. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. **Food Microbiology**, v.25, p.228-234, 2008.
- KEPPLER, K.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W.H. An  $\alpha$ -amylase sensitive bacteriocin of *Leuconostoc carnosum*. **Food Microbiology**, v.11, p.39-45, 1994.
- KIM, W.S.; HALL, R.J.; DUNN, N.W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiological Biotechnology**, v.48, p.449-453, 1997.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.39-86, 1993.
- KOEBINK, R.; BRAUN, V. Insertion derivatives containing segments of up to 16 amino acids identify surface and periplasm exposed regions of the outer membrane receptor of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v.3, p.826-839, 1993.
- KONGO, J.M.; GOMES, A.P.; MALCATA, F.X. Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of São Jorge, a Portuguese traditional cheese from raw cow's milk. **Journal of Food Protection**, v.71, n.5, p.986-992, 2008.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.67-78, 2004.

- LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, n.6, p.1683-1688, 1991.
- LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.13, p.145-150, 1991.
- LEWUS, C.B.; SUN, S.; MONTVILLE, T.J. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, p.143-149, 1992.
- LIU, X.; CHUNG, Y-K.; YANG, S-T.; YOUSEF, A.E. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. **Process Biochemistry**, v.40, p.13-24, 2005.
- MALDONADO-BARRAGÁN, A.; CABALLERO-GUERRERO, B.; JIMÉNEZ, E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; RUIZ-BARBA, J.L.; RODRÍGUEZ, J.M. Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, p.105-112, 2009.
- MARTÍNEZ, B.; SUÁREZ, J.E.; RODRÍGUEZ, A. Antimicrobials produced by wild lactococcal strains isolated from homemade cheeses. **Journal of Food Protection**, v.58, p.1118-1123, 1995.
- MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J.; GALIOTOU, M.; DROSINOS, E.H. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Science**, v.64, p.265-271, 2003.
- MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (ed.) **Methods in Microbiology**. New York: Academic Press Inc., 1972. v.7A, p.315-422.
- MCAULIFFE, O.; RYAN, M.P.; ROSS R.P.; HILL, C.; BREEUWER, P.; ABEE, T. Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.439-445, 1998.



- MESSI, P.; BONDI, M.; SABIA, C.; BATTINI, R.; MANICARDI, G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.193-198, 2001.
- MORAES, P.M.; PERIN, L.M.; ORTOLANI, M.B.T.; YAMAZI, A.K., VIÇOSA, G.N.; NERO, L.A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT. Food Science and Technology**, v.43, p.1320-1324, 2010.
- MORAES, P.M. Identificação molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo frescal, pesquisa de genes associados à produção de bacteriocinas e detecção de fatores de patogenicidade em *Enterococcus* spp. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2011.
- MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; BALDINI, V.L.S.; LEITÃO, M.F.F. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.184-192, 2000.
- MORGAN, F.; BONNIN, V.; MALLEREAU, M-P.; PERRIN, G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, n.1-2, p.217-221, 2001.
- MORGAN, F.; MASSOURAS, T.; BARBOSA, M.; ROSEIRO, L.; RAVASCO, F.; KANDARAKIS, I.; BONNIN, V.; FISTAKORIS, M.; ANIFANTAKIS, E.; JAUBERTA, G.; RAYNAL-LJUTOVAC, K. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. **Small Ruminant Research**, v.47, n.1, p.39-49, 2003.
- NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BARROS, M.A.F.; BELOTI, V.; FRANCO, B.D.G.M. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. **Microbiological Research**, v.162, p.397-401, 2007.

- 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* spp. 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.
- NES, I.F.; JOHNSBORG, O. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.100-104, 2004.
- NILSSON, L.; GRAM, L.; HUSS, H.H. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. **Journal of Food Protection**, v.62, n.4, p.336-342, 1999.
- O'SULLIVAN, L.; ROSS, R.P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Bioquímie**, v.84, p.593-604, 2002.
- ORTOLANI, M.B.T.; YAMAZI, A.K.; MORAES, P.M.; VIÇOSA, G.N.; NERO, L.A. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, p.175-180, 2010a.
- ORTOLANI, M.B.T.; MORAES, P.M.; PERIN, L.M.; VIÇOSA, G.N.; CARVALHO, K.G.; SILVA JÚNIOR, A.; SESMA, F.; FRANCO, B.D.G.M.; NERO, L.A. Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.2880-2886, 2010b.
- PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. **Letters of Applied Microbiology**, v.19, p.12-15, 1994.
- PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Microbiological Biotechnology**, v.52, p.628-638, 1999.
- PAYNE, J.F.; MORRIS, A.E.J.; BEERS, P. Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.353-358, 1999.

- PFEILER, E.A.; KLAENHAMMER, T.R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v.15, p.546-553, 2007.
- PIARD, J.-C.; MURIANA, P.M.; DESMAZEAUD, M.J.; KLAENHAMMER, T.R. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.1, p.279-284, 1992.
- PIPER, C.; DRAPER, L.A.; COTTER, P.D.; ROSS, P.; HILL, C.A. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, p.546-551, 2009.
- RILEY, M.A.; WERTZ, J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Reviews in Microbiology**, v.56, p.117-137, 2002.
- RODRÍGUEZ, E.; GONZÁLEZ, B.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v.10, p.07-15, 2000.
- ROSA, C.M.; FRANCO, B.D.G.M.; MONTVILLE, T.J.; CHIKINDAS, M.L. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate, *Lactobacillus sake* 2a. **Journal of Food Safety**, v.22, p.39-54, 2002.
- ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.915-923, 2008.
- SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.-K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1901-1906, 1989.
- SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPPEL, W.H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological biopreservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.71, p.58-64, 1996.
- SETTANNI, L.; VALMORRI, S.; SUZZI, G.; CORSETTI, A. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin like inhibitory substances (BLIS)

- production by *Enterococcus mundtii* strains. **Food Microbiology**, v.25, p.722-728, 2008.
- SHARMA, N.; KAPOOR, G.; NEOPANEY, B. Characterization of a new bacteriocin produced from a novel isolated strain of *Bacillus lentus* NG121. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.89, p.337-343, 2006.
- 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.
- STOFFELS, G.; NISSEN-MEYER, J.; GUDMUNSDOTTIR, A.; SLETIEN, K.; HOLO, H.; NES, I.F. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. **Applied And Environmental Microbiology**, v.58, n.5, p.1417-1422, 1992.
- TAGG, J.R.; MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, v.21, n.5, p.943, 1971.
- TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiology Review**, v.40, p.722-756, 1976.
- TODOROV, S.D.; GOTCHEVA, B.; DOUSSET, X.; ONNO, B.; IVANOVA, I. Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* ST31. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.14, p.50-55, 2000.
- TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.323-329, 2004.
- TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Growth parameters influencing the production of *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocins ST461BZ and ST462BZ. **Annals of Microbiology**, v.55, n.4, p.283-289, 2005.
- TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. **Microbiological Research**, v.161, p.102-108, 2006a.

- TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. **Process Biochemistry**, v.41, p.11-19, 2006b.
- TODOROV, S.D. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.1, p.178-187, 2008.
- TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. **Anaerobe**, v.15, p.65-73, 2009.
- TOMÉ, E.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P.C. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.285-294, 2008a.
- TOMÉ, E.; PEREIRA, V.L.; LOPES, C.I.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P.C. In vitro tests of suitability of bacteriocin producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. **Food Control**, v.19, p.535-543, 2008b.
- TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p.230-235, 2006.
- VALENZUELA, A.S.; BEN-OMAR, N.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; VELJOVIC, K.; CAÑAMERO, M.M.; TOPISIROVIC, M.K.L.; GÁLVEZ, A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. **Food Control**, v.20, p.381-385, 2009.
- VIÇOSA, G.N.; MORAES, P.M.; YAMAZI, A.K.; NERO, L.A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and soft cheese: an evaluation of baird-parker agar, rabbit plasma fibrinogen agar and the Petrifilm staph express count system. **Food Microbiology**, v.27, p.447-452, 2010.

VILLANI, F.; APONTE, M.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; PEPE, O.; MOSCHETTI, G. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.430-439, 2001.

WOUTERS, J.T.; AYAD, E.H.E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.12, n.2-3, p.91-109, 2002.

# **ANEXOS**

## Meios de cultura e reagentes utilizados

- Ágar e caldo de Man, Rogosa & Sharpe (MRS)
  - CM361, Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hampshire, England)
  - CM359, Oxoid Ltd.
- Caldo infusão de cérebro e coração (BHI)
  - CM225, Oxoid Ltd.
- Ágar e Caldo Trypticase de Soja (TSA)
  - CM131, Oxoid Ltd.
  - CM129, Oxoid Ltd.
- Ágar e Caldo Trypticase de Soja (TSA) suplementado com Extrato de Levedura (YE)
  - CM0019A, Oxoid Ltd.
  - Suplementar o YE na concentração de 0,6 %
- Ágar M17
  - CM817, Oxoid Ltd.
- Geradores de anaerobiose
  - BBL GasPak, BD Ltd.
- Tampão fosfato de sódio 10 mM
  - 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  monobásico
  - 4 g NaCl
  - 0,1 g KCl
  - 0,58 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
  - 500 mL água destilada
  - Dissolver, ajustar o pH em 7,0 e completar para 1000 mL
  - Autoclavar convencionalmente
- Solução cisteína
  - Preparar solução com 50 ng/mL da cisteína
  - Esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland)
  - Utilizar 0,05 g da solução de cisteína em 100 mL do meio de cultura previamente autoclavado



- Ágar MRS modificado
  - 10 g Peptona de protease 3
  - 10 g Extrato de carne
  - 5 g Extrato de levedura
  - 5 g Dextrose
  - 1 g Polissorbato 80
  - 2 g Citrato de amônia
  - 5 g Acetato de sódio
  - 0,1 g Sulfato de magnésio
  - 0,05 g Sulfato de manganês
  - 2 g Fosfato de potássio bibásico
  - 1000 mL água destilada
  - Dissolver todos os componentes e autoclavar convencionalmente
- Catalase
  - C1345, catalase de fígado bovino. Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
  - 1 mg em 1 mL de tampão fosfato: concentração final de 100 UI/mL
  - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore)
- Pepsina
  - P7012, pepsina de mucosa gástrica de suíno. Sigma-Aldrich Co.
  - 20 mg em 1 mL de água destilada
  - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore)
- $\alpha$ -quimotripsina
  - C4129,  $\alpha$ -quimotripsina de pâncreas bovino tipo II. Sigma-Aldrich Co.
  - 20 mg em 1 mL de água destilada
  - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore)
- Proteinase K
  - P8044, proteinase K de *Tritirachium album*. Sigma-Aldrich Co.
  - 20 mg em 1 mL de água destilada
  - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore)

- Tripsina
  - T1426, tripsina de pâncreas de bovino. Sigma-Aldrich Co.
  - 20 mg em 1 mL de água destilada
  - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore)
- Lipase
  - 62301, lipase de *Aspergillus niger*. Sigma-Aldrich Co.
  - 20 mg em 1 mL de água destilada
  - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore)
- Papaína
  - 76220. Sigma-Aldrich Co.
  - 20 mg em 1 mL de água destilada
  - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore)
- $\alpha$ -amilase
  - A3403, tipo XII-A (*Bacillus Icheniformis*). Sigma-Aldrich Co.
  - 20 mg em 1 mL de água destilada
  - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore)
- Lisozima
  - L7651. Sigma-Aldrich Co.
  - 20 mg em 1 mL de água destilada
  - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore)
- Protease
  - P5147, protease de *Streptomyces griseus*. Sigma-Aldrich Co.
  - 20 mg em 1 mL de água destilada
  - Após solubilização, esterilizar por filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore)

## Resultados detalhados

Tabela 1. Código inicial e código utilizado no estudo para os isolados de bactérias ácido lácticas de leite cru e queijo e respectivas identificações por testes moleculares.

Código inicial	Código utilizado	Identificação
52m8	En31	<i>Enterococcus</i> spp.
12k1	En05	<i>Enterococcus</i> spp.
12m2	En32	<i>Enterococcus</i> spp.
51m6	En09	<i>Enterococcus</i> spp.
04m1	En14	<i>Enterococcus</i> spp.
04m6	En15	<i>Enterococcus</i> spp.
07k8	En16	<i>Enterococcus</i> spp.
12k3	En06	<i>Enterococcus</i> spp.
12k8	En04	<i>Enterococcus</i> spp.
12m4	En33	<i>Enterococcus</i> spp.
17m8	En34	<i>Enterococcus</i> spp.
22m8	En35	<i>Enterococcus</i> spp.
31m4	En07	<i>Enterococcus</i> spp.
47k8	En28	<i>Enterococcus</i> spp.
51m3	En11	<i>Enterococcus</i> spp.
51m8	En36	<i>Enterococcus</i> spp.
52m5	En37	<i>Enterococcus</i> spp.
52m6	En08	<i>Enterococcus</i> spp.
53m3	En38	<i>Enterococcus</i> spp.
53m5	En39	<i>Enterococcus</i> spp.
54m2	En10	<i>Enterococcus</i> spp.
46k2	En18	<i>Enterococcus</i> spp.
12k2	En12	<i>Enterococcus</i> spp.
12k6	En13	<i>Enterococcus</i> spp.
12k7	En01	<i>Enterococcus</i> spp.
12m6	En03	<i>Enterococcus</i> spp.
17m5	En20	<i>Enterococcus</i> spp.
35k7	En19	<i>Enterococcus</i> spp.
38k2	En17	<i>Enterococcus</i> spp.
39k2	En02	<i>Enterococcus</i> spp.
03m3	En40	<i>Enterococcus faecalis</i>
03m4	En41	<i>Enterococcus faecalis</i>
03m5	En23	<i>Enterococcus faecalis</i>
03m7	En25	<i>Enterococcus faecalis</i>

Continuação da Tabela 1.

Código inicial	Código utilizado	Identificação
04m2	En22	<i>Enterococcus faecalis</i>
05m6	En27	<i>Enterococcus faecalis</i>
12m1	En42	<i>Enterococcus faecalis</i>
17m2	En43	<i>Enterococcus faecalis</i>
19m3	En29	<i>Enterococcus faecalis</i>
19m7	En24	<i>Enterococcus faecalis</i>
35k3	En21	<i>Enterococcus faecalis</i>
46k7	En26	<i>Enterococcus faecalis</i>
48m3	En30	<i>Enterococcus faecalis</i>
01m8	Lb10	<i>Lactobacillus fermentum</i>
02m3	Lb11	<i>Lactobacillus fermentum</i>
03m8	Lb13	<i>Lactobacillus plantarum</i>
04m5	Lb14	<i>Lactobacillus plantarum</i>
07k6	Lb15	<i>Lactobacillus plantarum</i>
25m6	Lb16	<i>Lactobacillus plantarum</i>
29m1	Lb17	<i>Lactobacillus plantarum</i>
31m7	Lb18	<i>Lactobacillus plantarum</i>
32m3	Lb03	<i>Lactobacillus plantarum</i>
35m2	Lb19	<i>Lactobacillus plantarum</i>
35m4	Lb20	<i>Lactobacillus plantarum</i>
35m6	Lb21	<i>Lactobacillus plantarum</i>
35m7	Lb06	<i>Lactobacillus plantarum</i>
39k6	Lb22	<i>Lactobacillus plantarum</i>
43m1	Lb08	<i>Lactobacillus plantarum</i>
43m2	Lb04	<i>Lactobacillus plantarum</i>
43m3	Lb07	<i>Lactobacillus plantarum</i>
44m7	Lb02	<i>Lactobacillus plantarum</i>
46m3	Lb23	<i>Lactobacillus plantarum</i>
46m6	Lb24	<i>Lactobacillus plantarum</i>
51m2	Lb25	<i>Lactobacillus plantarum</i>
51m5	Lb09	<i>Lactobacillus plantarum</i>
52m1	Lb26	<i>Lactobacillus plantarum</i>
53m6	Lb01	<i>Lactobacillus plantarum</i>
54m1	Lb05	<i>Lactobacillus plantarum</i>
54m3	Lb27	<i>Lactobacillus plantarum</i>
32m4	Lb12	<i>Lactobacillus sakei</i>
23m4	Lc17	<i>Lactococcus garviae</i>
23m7	Lc16	<i>Lactococcus garviae</i>

Continuação da Tabela 1.

Código inicial	Código utilizado	Identificação
31m6	Lc18	<i>Lactococcus garviae</i>
31m8	Lc19	<i>Lactococcus garviae</i>
35k2	Lc02	<i>Lactococcus lactis</i>
07k2	Lc20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
12k5	Lc10	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
12m3	Lc07	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
12m5	Lc01	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
12m7	Lc21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
17m1	Lc22	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
17m3	Lc05	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
17m4	Lc08	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
19m2	Lc14	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
19m4	Lc23	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
20m2	Lc24	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
21m4	Lc25	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
29m3	Lc04	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
32m2	Lc09	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
33m7	Lc06	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
35k4	Lc26	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
35k5	Lc27	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
37m1	Lc13	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
38m3	Lc15	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
41k6	Lc03	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
41m5	Lc12	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
48m5	Lc11	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
47k2	Ot01	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
35m3	Ot02	<i>Pediococcus</i> spp.
31m3	Ot03	<i>Streptococcus</i> spp.
38m2	Ot04	<i>Weissella cibaria</i>

Tabela 2. Sensibilidade enzimática das substâncias antimicrobianas produzidas pelos 101 isolados de BAL, utilizando *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como microrganismo indicador.

Código BAL	Identificação	Proteinase K	Tripsina	$\alpha$ - quimotripsina	Pepsina	$\alpha$ -amilase	Papaína	Protease	Lipase	Lisozima	Catalase
En31	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
En05	<i>Enterococcus</i> spp.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
En32	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
En09	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
En14	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
En15	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
En16	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
En06	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
En04	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
En33	<i>Enterococcus</i> spp.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
En34	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
En35	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
En07	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
En28	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
En11	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
En36	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
En37	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
En08	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
En38	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
En39	<i>Enterococcus</i> spp.	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
En10	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
En18	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
En12	<i>Enterococcus</i> spp.	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
En13	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
En01	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
En03	<i>Enterococcus</i> spp.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

+: sensibilidade enzimática; -: ausência de sensibilidade enzimática; BAL: bactéria ácido láctica

Continuação da Tabela 2.

Código BAL	Identificação	Proteinase K	Tripsina	$\alpha$ - quimotripsina	Pepsina	$\alpha$ -amilase	Papaína	Protease	Lipase	Lisozima	Catalase
En20	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
En19	<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
En17	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
En02	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
En40	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
En41	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
En23	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
En25	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
En22	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
En27	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
En42	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
En43	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
En29	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
En24	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
En21	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
En26	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
En30	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb10	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lb15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Lb17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Lb03	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: sensibilidade enzimática; -: ausência de sensibilidade enzimática; BAL: bactéria ácido láctica

Continuação da Tabela 2.

Código BAL	Identificação	Proteinase K	Tripsina	$\alpha$ - quimotripsina	Pepsina	$\alpha$ -amilase	Papaína	Protease	Lipase	Lisozima	Catalase
Lb21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb06	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Lb22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb08	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb04	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb07	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb02	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Lb23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Lb24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb09	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb26	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Lb01	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Lb05	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lb27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
Lb12	<i>Lactobacillus sakei</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Lc17	<i>Lactococcus garviae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lc16	<i>Lactococcus garviae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lc18	<i>Lactococcus garviae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lc19	<i>Lactococcus garviae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lc02	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Lc20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lc10	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Lc07	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lc01	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Lc21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Lc22	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lc05	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: sensibilidade enzimática; -: ausência de sensibilidade enzimática; BAL: bactéria ácido láctica



Continuação da Tabela 2.

Código BAL	Identificação	Proteinase K	Tripsina	$\alpha$ - quimotripsina	Pepsina	$\alpha$ -amilase	Papaína	Protease	Lipase	Lisozima	Catalase
Lc08	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Lc14	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lc23	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Lc24	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lc25	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lc04	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Lc09	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lc06	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lc26	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Lc27	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lc13	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lc15	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lc03	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Lc12	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lc11	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ot01	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ot02	<i>Pediococcus</i> spp.	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Ot03	<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ot04	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: sensibilidade enzimática; -: ausência de sensibilidade enzimática; BAL: bactéria ácido láctica

Tabela 3. Códigos utilizados para os 36 microrganismos indicadores utilizados no estudo e suas respectivas identificações.

Código	Identificação
Li	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090
355	<i>Listeria ivanovi</i> ATCC 19119
353	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313
326	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112
327	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117
266	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644
Lm52	<i>Listeria monocytogenes</i> 52
Lm55	<i>Listeria monocytogenes</i> 55
Lm60	<i>Listeria monocytogenes</i> 60
Ls31	<i>Listeria seeligeri</i> 31
Li76	<i>Listeria innocua</i> 76
Lw47	<i>Listeria welshimeri</i> 47
SA58	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458
SA98	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598
SA95	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 8095
SA13	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
SA00	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600
SSP	<i>Staphylococcus</i> sp. ATCC 23235
23ST1	<i>Staphylococcus aureus</i> 23ST1
26BP6	<i>Staphylococcus aureus</i> 26BP6
27AF1	<i>Staphylococcus aureus</i> 27AF1
21AF3	<i>Staphylococcus aureus</i> 21AF3
27ST1	<i>Staphylococcus aureus</i> 27ST1
31BP2	<i>Staphylococcus aureus</i> 31BP2
CR3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842
CR9	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11007
CR11	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
CR13	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433
CR19	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962
Lb	<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521
48M3	<i>Enterococcus faecalis</i> En30
17M2	<i>Enterococcus faecalis</i> En43
3M4	<i>Enterococcus faecalis</i> En41
52M8	<i>Enterococcus</i> spp En31
43M3	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb07
53M6	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb01

Tabela 4. Diâmetro dos halos (mm) apresentados pelos 101 isolados de BAL contra 12 cepas de *Listeria* spp., utilizando o método spot-on-the-lawn.

	Li	355	353	326	327	266	Lm52	Lm55	Lm60	Ls31	Li76	Lw47
52m8	15	ND	9	19	19	22	17	18	21	15	13	15
12k1	ND	ND	ND	8	7	ND	10	ND	ND	ND	ND	8
12m2	11	9	9	7	11	15	17	11	11	10	9	12
51m6	16	25	11	20	19	22	23	21	21	15	16	15
04m1	8	ND	ND	ND	9	13	7	10	10	10	11	ND
04m6	8	ND	6	ND	10	11	7	8	10	11	12	ND
07k8	15	ND	ND	ND	7	14	12	ND	13	9	12	10
12k3	ND	ND	8	7	7	11	ND	11	ND	ND	10	8
12k8	8	7	8	10	9	9	9	ND	ND	8	ND	8
12m4	9	11	ND	11	13	17	15	11	ND	9	13	12
17m8	12	18	ND	14	18	9	20	15	15	14	13	18
22m8	11	15	9	13	11	15	10	11	9	10	10	10
31m4	9	10	9	ND	12	13	12	8	ND	12	10	11
46k2	8	ND	ND	ND	7	7	ND	ND	10	10	10	9
47k8	ND	ND	ND	ND	ND	9	ND	8	8	ND	9	ND
51m3	17	22	11	19	18	23	22	20	23	15	15	15
51m8	15	ND	9	18	21	22	17	13	22	16	13	19
52m5	16	22	11	14	17	22	21	10	25	14	15	13
52m6	16	21	11	19	18	22	22	20	25	14	13	14
53m3	8	ND	ND	11	11	10	17	9	15	12	9	13
53m5	22	8	ND	9	19	25	19	25	19	21	21	19
54m2	13	16	7	19	16	12	17	16	20	14	14	15
03m3	ND	11	ND	ND	10	10	15	9	15	7	7	6
03m4	9	8	ND	7	ND	8	15	9	ND	9	7	7
03m5	9	10	ND	9	11	15	17	9	18	12	9	11
03m7	7	ND	ND	9	12	13	17	9	18	10	9	7
04m2	13	11	7	12	10	9	15	9	12	12	9	9
05m6	12	11	9	7	14	17	21	ND	21	11	12	15
12m1	10	17	10	15	20	29	19	12	21	15	16	19
17m2	12	13	9	11	10	13	14	11	15	10	8	9
19m3	8	10	7	7	8	14	15	10	15	10	10	10
19m7	9	9	8	7	7	12	7	11	13	14	13	ND
35k3	ND	ND	ND	ND	7	9	ND	10	11	8	11	12
46k7	ND	7	10	10	ND	9	10	ND	9	9	ND	8
48m3	8	9	10	9	9	10	8	9	ND	8	ND	10
12k2	8	12	ND	9	13	13	17	9	17	11	8	13
12k6	ND	ND	8	7	ND	7	9	ND	ND	ND	8	8
12k7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12m6	8	7	8	ND	ND	9	9	ND	ND	ND	ND	8
17m5	23	ND	ND	ND	9	10	17	9	11	9	9	10
35k7	8	9	9	9	9	25	8	7	8	10	10	11
38k2	11	ND	11	ND	14	12	10	14	19	10	16	12
39k2	ND	ND	ND	8	ND	8	9	ND	ND	ND	ND	ND

ND: não detectado formação de halo de inibição

Continuação da tabela 4.

	Li	355	353	326	327	266	Lm52	Lm55	Lm60	Ls31	Li76	Lw47
01m8	10	10	10	12	10	11	13	7	10	12	10	9
02m3	ND	ND	7	ND	ND	7	ND	ND	ND	7	7	ND
03m8	9	11	ND	9	9	12	15	ND	14	11	7	13
04m5	9	ND	8	8	10	11	10	13	18	12	13	11
07k6	13	22	10	23	17	25	17	18	18	15	17	16
25m6	10	12	9	10	11	16	13	10	ND	10	11	12
29m1	9	11	9	8	10	10	12	9	ND	12	10	11
31m7	10	12	10	11	8	9	19	10	15	9	8	13
32m3	10	10	ND	ND	7	7	10	9	7	10	11	13
35m2	ND	ND	9	9	ND	10	ND	9	7	ND	ND	ND
35m4	ND	7	11	9	10	15	ND	12	17	ND	11	9
35m6	ND	ND	9	9	9	10	ND	9	7	ND	ND	7
35m7	7	ND	10	9	9	7	ND	11	7	11	11	10
39k6	8	7	ND	ND	ND	7	9	ND	9	9	ND	9
43m1	11	ND	10	11	10	13	ND	9	7	10	ND	11
43m2	11	9	9	12	14	15	10	9	10	12	11	11
43m3	14	15	ND	11	19	11	13	11	14	15	14	8
44m7	13	10	9	14	11	17	15	12	15	11	13	11
46m3	10	10	10	12	7	9	13	ND	ND	ND	9	ND
46m6	11	10	10	10	9	9	10	9	ND	8	8	10
51m2	11	12	10	11	12	9	15	10	12	9	ND	10
51m5	11	14	10	12	9	17	16	11	15	11	12	9
52m1	16	ND	15	ND	9	6	ND	16	17	13	15	10
53m6	13	12	7	13	9	7	ND	11	ND	15	16	10
54m1	11	11	9	ND	ND	18	17	13	20	10	11	11
54m3	13	ND	7	ND	12	17	15	14	15	16	15	9
32m4	15	9	12	7	20	12	12	16	19	13	12	8
23m4	9	11	ND	8	12	14	ND	9	ND	8	11	12
23m7	8	ND	7	ND	7	9	7	9	ND	12	11	8
31m6	8	ND	8	ND	15	7	15	15	15	16	13	12
31m8	14	ND	9	ND	18	15	16	15	15	12	15	13
35k2	14	ND	12	9	12	18	ND	14	15	13	13	9
07k2	7	8	ND	8	8	12	10	ND	9	ND	9	8
12k5	13	23	11	21	18	30	21	17	20	14	17	15
12m3	9	10	9	ND	9	10	ND	10	ND	9	9	10
12m5	9	13	9	10	10	19	20	12	13	11	15	16
12m7	9	10	10	9	13	20	20	10	13	12	13	17
17m1	11	22	10	15	21	30	23	15	ND	17	17	21
17m3	12	15	7	11	15	21	15	12	14	14	19	9
17m4	10	20	10	16	20	22	22	14	17	17	17	17
19m2	15	9	10	7	13	12	8	11	13	14	16	ND
19m4	8	10	11	12	12	13	13	10	10	9	10	1
20m2	7	ND	ND	ND	9	8	10	7	9	11	ND	9
21m4	ND	ND	ND	9	9	21	10	7	9	8	ND	10
29m3	8	12	11	12	12	14	13	11	ND	10	11	12

ND: não detectado formação de halo de inibição

Continuação da tabela 4.

	Li	355	353	326	327	266	Lm52	Lm55	Lm60	Ls31	Li76	Lw47
32m2	9	10	9	ND	11	13	ND	8	ND	11	11	11
33m7	8	11	13	10	11	13	12	10	ND	11	12	12
35k4	10	ND	ND	ND	9	9	6	9	11	9	12	10
35k5	13	ND	ND	ND	12	9	9	10	12	11	15	13
37m1	15	ND	7	ND	ND	19	11	13	16	14	17	9
38m3	12	10	9	9	10	15	ND	11	12	9	13	11
41k6	17	ND	ND	ND	22	9	ND	19	18	ND	14	15
41m5	9	ND	ND	ND	7	11	9	12	12	9	7	7
48m5	17	21	10	21	20	26	20	18	15	16	19	19
47k2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8	10	ND	9	ND
35m3	ND	ND	10	9	ND	ND	ND	9	8	9	11	9
31m3	8	11	10	9	12	14	10	8	ND	9	12	12
38m2	8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8	ND	ND

ND: não detectado formação de halo de inibição

Tabela 5. Diâmetro dos halos (mm) apresentados pelos 101 isolados de BAL contra 12 cepas de *Staphylococcus* spp., utilizando o método spot-on-the-lawn.

	SA58	SA98	SA95	SA13	SA00	SSP	23ST1	26BP6	27AF1	21AF3	27ST1	31BP2
52m8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND
12k1	ND	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND	7
12m2	ND	9	ND	ND	ND	9	9	ND	ND	ND	ND	ND
51m6	ND	10	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND
04m1	ND	8	6	ND	ND	ND	8	9	10	ND	ND	7
04m6	ND	10	7	ND	ND	8	8	9	8	ND	ND	7
07k8	ND	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12k3	ND	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND	ND
12k8	ND	11	10	7	8	8	8	8	ND	8	ND	9
12m4	ND	9	9	ND	ND	ND	9	11	8	7	ND	ND
17m8	19	21	15	11	14	13	18	21	19	13	16	12
22m8	ND	9	8	8	12	7	ND	9	9	ND	ND	7
31m4	8	10	8	11	10	9	10	9	8	9	7	7
46k2	ND	8	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	7	ND	ND
47k8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
51m3	ND	10	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND
51m8	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND
52m5	ND	11	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND
52m6	ND	11	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND
53m3	ND	10	8	7	11	7	12	9	ND	10	8	8
53m5	ND	12	8	6	ND	ND	6	ND	7	6	ND	6
54m2	ND	6	6	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND	8
03m3	ND	10	ND	7	6	ND	ND	ND	8	ND	ND	7
03m4	10	10	ND	7	7	ND	7	ND	9	ND	8	7
03m5	ND	10	ND	7	10	7	10	11	ND	9	ND	8
03m7	ND	10	8	7	10	7	11	10	ND	10	7	9
04m2	8	9	10	12	7	ND	8	ND	8	8	7	9
05m6	ND	8	13	ND	ND	ND	ND	7	ND	9	7	ND
12m1	16	20	ND	11	12	10	16	20	19	16	16	18
17m2	8	8	9	7	7	7	9	9	9	10	8	11
19m3	7	8	7	8	7	7	8	8	6	ND	7	9
19m7	ND	11	7	6	8	8	7	9	7	7	ND	7
35k3	ND	7	ND	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
46k7	ND	10	ND	ND	ND	ND	8	ND	ND	ND	ND	8
48m3	ND	9	8	8	ND	8	9	8	9	8	10	9
12k2	ND	11	ND	7	10	7	10	9	ND	10	8	8
12k6	ND	13	9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8
12k7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND
12m6	ND	11	ND	ND	8	8	8	9	8	8	ND	ND
17m5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9	7	8	8	ND	ND
35k7	11	13	8	8	ND	7	8	12	ND	10	ND	ND
38k2	ND	7	ND	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
39k2	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND	ND

ND: não detectado formação de halo de inibição

Continuação da Tabela 5.

	SA58	SA98	SA95	SA13	SA00	SSP	23ST1	26BP6	27AF1	21AF3	27ST1	31BP2
01m8	ND	13	11	7	ND	10	9	10	11	ND	11	11
02m3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
03m8	ND	11	9	7	10	7	11	12	ND	9	ND	11
04m5	ND	11	8	7	8	9	8	11	7	7	9	7
07k6	19	25	20	15	16	24	21	21	21	17	18	21
25m6	7	12	8	ND	10	11	10	10	13	10	7	9
29m1	7	8	ND	ND	9	9	10	9	8	ND	ND	ND
31m7	7	7	8	7	ND	7	8	ND	8	7	9	10
32m3	ND	ND	ND	9	8	8	8	ND	ND	ND	8	7
35m2	7	12	9	ND	9	8	7	9	7	9	11	7
35m4	7	13	9	7	9	8	9	9	8	10	9	7
35m6	7	11	9	7	11	8	7	ND	8	ND	9	7
35m7	7	11	10	8	10	8	8	8	11	ND	9	7
39k6	ND	10	ND	ND	ND	ND	8	10	ND	ND	ND	11
43m1	7	12	11	8	10	9	ND	ND	10	8	7	11
43m2	8	18	14	10	13	11	11	11	11	13	11	11
43m3	14	12	11	9	12	9	9	10	10	10	9	15
44m7	ND	12	9	7	10	10	7	12	13	9	ND	13
46m3	ND	9	10	ND	9	10	7	ND	ND	ND	ND	9
46m6	7	10	8	ND	ND	8	9	10	10	8	7	8
51m2	9	12	10	7	10	10	10	10	7	13	10	12
51m5	8	16	13	8	10	10	11	10	10	9	12	12
52m1	ND	10	ND	ND	ND	ND	7	9	ND	ND	ND	ND
53m6	8	12	8	9	8	ND	10	9	9	10	10	9
54m1	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND
54m3	ND	9	ND	ND	ND	7	7	13	8	ND	ND	10
32m4	ND	9	7	ND	ND	ND	ND	8	9	7	ND	7
23m4	ND	10	ND	ND	10	10	10	9	10	ND	ND	ND
23m7	ND	9	6	ND	7	8	ND	7	9	7	ND	7
31m6	ND	9	7	ND	ND	ND	ND	ND	6	ND	ND	ND
31m8	ND	10	7	7	8	8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35k2	ND	7	ND	6	ND	ND	6	10	12	ND	ND	9
07k2	ND	11	8	7	7	ND	ND	ND	7	ND	ND	7
12k5	17	28	21	15	15	17	20	25	22	19	21	22
12m3	ND	ND	9	ND	ND	ND	9	7	9	10	ND	ND
12m5	12	16	ND	8	11	12	12	14	11	11	12	11
12m7	7	12	10	ND	9	ND	10	12	15	ND	7	11
17m1	27	26	19	13	15	14	22	25	23	18	18	22
17m3	12	15	11	ND	9	9	14	15	11	11	11	13
17m4	20	23	16	8	14	16	20	22	21	15	17	19
19m2	ND	10	9	7	8	11	7	ND	7	8	6	7
19m4	9	12	15	13	ND	7	8	8	9	ND	ND	ND
20m2	ND	10	ND	ND	8	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND
21m4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29m3	7	12	9	ND	10	10	10	10	12	10	7	9

ND: não detectado formação de halo de inibição

Continuação da Tabela 5.

	SA58	SA98	SA95	SA13	SA00	SSP	23ST1	26BP6	27AF1	21AF3	27ST1	31BP2
32m2	11	ND	10	11	10	9	11	10	8	11	8	11
33m7	10	11	9	ND	9	9	10	12	9	9	8	9
35k4	ND	7	ND	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35k5	ND	9	ND	6	7	ND	ND	8	ND	ND	ND	ND
37m1	ND	14	ND	6	ND	7	7	17	12	6	ND	14
38m3	7	12	9	7	10	8	9	11	11	9	ND	11
41k6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
41m5	ND	9	ND	6	ND	ND	6	9	7	ND	ND	9
48m5	19	25	14	15	23	13	20	23	22	13	16	21
47k2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND
35m3	7	11	9	7	10	8	8	8	9	ND	9	7
31m3	7	8	9	ND	10	9	10	8	10	9	7	ND
38m2	ND	9	10	10	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	9

ND: não detectado formação de halo de inibição



Tabela 6. Diâmetro dos halos (mm) apresentados pelos 101 isolados de BAL contra 12 cepas de Bactérias Ácido Láticas, utilizando o método spot-on-the-lawn.

	CR3	CR9	CR11	CR13	CR19	Lb	48M3	17M2	24M2	52M8	43M3	53M6
52m8	ND	14	13	14	15	17	12	11	13	ND	ND	10
12k1	ND	ND	ND	ND	ND	7	9	8	11	10	ND	ND
12m2	ND	12	14	ND	ND	11	11	11	11	9	11	9
51m6	ND	15	15	13	19	22	14	11	10	11	12	14
04m1	ND	ND	ND	ND	ND	8	7	11	11	8	ND	ND
04m6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	7	10	9	ND	ND
07k8	13	ND	ND	ND	ND	15	9	9	7	8	ND	ND
12k3	ND	ND	ND	ND	13	17	9	ND	11	ND	13	ND
12k8	ND	ND	9	ND	ND	13	9	10	10	9	ND	ND
12m4	ND	13	13	14	13	17	12	12	13	11	9	ND
17m8	14	23	22	25	26	31	12	15	19	17	22	20
22m8	10	12	13	11	14	20	13	13	10	12	11	12
31m4	ND	ND	ND	ND	ND	9	12	11	12	15	ND	ND
46k2	ND	ND	ND	ND	ND	15	11	9	11	11	ND	ND
47k8	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	7	9	ND	ND	ND
51m3	ND	14	17	14	21	22	13	11	12	12	12	ND
51m8	ND	15	13	15	15	17	12	12	12	13	ND	10
52m5	ND	14	15	15	19	19	13	11	11	10	11	12
52m6	ND	15	15	15	20	23	13	11	11	9	11	17
53m3	ND	ND	10	13	12	17	10	9	12	11	ND	ND
53m5	17	ND	6	ND	ND	21	20	18	9	20	ND	9
54m2	ND	15	15	12	13	17	14	10	9	11	10	9
03m3	ND	14	12	8	11	22	8	8	ND	13	ND	8
03m4	ND	8	8	10	8	15	8	10	8	ND	ND	ND
03m5	ND	ND	11	12	11	17	10	11	13	13	ND	ND
03m7	ND	10	10	10	12	17	9	ND	13	10	ND	ND
04m2	ND	ND	ND	ND	ND	21	12	11	12	12	ND	ND
05m6	ND	ND	13	ND	10	21	11	12	12	10	ND	ND
12m1	16	25	26	26	25	27	12	13	21	17	23	20
17m2	ND	ND	ND	ND	ND	12	12	ND	12	14	ND	ND
19m3	ND	ND	ND	ND	ND	17	10	9	8	11	ND	ND
19m7	ND	ND	ND	ND	6	12	15	8	7	9	ND	ND
35k3	ND	ND	ND	ND	ND	12	8	9	10	8	ND	ND
46k7	ND	ND	7	ND	ND	14	9	9	10	8	ND	ND
48m3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8	10	9	ND	ND
12k2	ND	ND	ND	10	10	17	10	10	11	12	ND	ND
12k6	ND	ND	ND	ND	11	15	9	9	9	10	ND	ND
12k7	ND	ND	ND	ND	ND	13	ND	9	ND	ND	ND	ND
12m6	ND	ND	ND	ND	ND	16	9	10	10	10	ND	ND
17m5	ND	ND	ND	ND	ND	7	12	11	13	9	ND	ND
35k7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11	9	14	12	ND	ND
38k2	ND	ND	ND	ND	ND	17	15	9	10	8	ND	ND
39k2	ND	ND	9	ND	10	15	ND	10	10	9	ND	ND

ND: não detectado formação de halo de inibição

Continuação da Tabela 6.

	CR3	CR9	CR11	CR13	CR19	Lb	48M3	17M2	24M2	52M8	43M3	53M6
01m8	ND	ND	9	ND	9	15	13	11	12	10	ND	ND
02m3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8	ND	ND	ND	ND
03m8	ND	ND	ND	ND	ND	12	13	11	12	13	ND	ND
04m5	ND	ND	ND	ND	6	11	10	9	11	12	ND	ND
07k6	18	26	30	27	31	37	12	19	28	22	15	25
25m6	ND	ND	ND	ND	ND	13	11	14	13	14	ND	ND
29m1	ND	ND	ND	ND	ND	9	8	9	12	13	ND	ND
31m7	ND	ND	ND	ND	ND	11	10	12	13	10	ND	ND
32m3	ND	ND	ND	ND	ND	10	9	9	11	13	ND	ND
35m2	ND	ND	12	ND	13	ND	9	10	11	12	ND	ND
35m4	ND	ND	12	ND	11	ND	9	11	9	13	ND	ND
35m6	ND	ND	13	ND	15	ND	9	9	9	13	ND	ND
35m7	ND	ND	12	ND	13	ND	11	11	9	13	ND	ND
39k6	ND	ND	7	ND	ND	15	10	10	10	9	ND	ND
43m1	ND	ND	12	ND	12	ND	9	9	9	12	ND	ND
43m2	ND	ND	12	ND	16	ND	11	15	11	14	ND	ND
43m3	ND	ND	ND	ND	ND	10	13	15	15	14	ND	ND
44m7	13	7	13	11	15	27	11	13	14	14	9	ND
46m3	ND	ND	13	ND	ND	11	ND	ND	9	9	ND	ND
46m6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9	9	14	13	ND	ND
51m2	ND	ND	10	ND	13	19	12	11	12	12	ND	ND
51m5	ND	ND	13	ND	15	15	ND	13	12	12	ND	ND
52m1	ND	8	8	ND	8	12	12	11	10	13	ND	ND
53m6	ND	ND	ND	ND	ND	10	14	11	16	15	ND	ND
54m1	ND	ND	ND	ND	ND	15	11	11	14	13	ND	ND
54m3	12	6	9	ND	11	25	12	11	14	13	ND	8
32m4	ND	ND	ND	ND	7	15	17	15	10	11	ND	ND
23m4	ND	ND	ND	ND	ND	11	11	9	13	13	ND	ND
23m7	ND	ND	ND	ND	ND	12	12	10	10	10	ND	ND
31m6	ND	ND	ND	ND	ND	11	8	8	10	12	ND	ND
31m8	ND	ND	ND	ND	ND	13	10	8	10	ND	ND	ND
35k2	7	ND	ND	ND	ND	16	12	9	8	12	ND	ND
07k2	ND	ND	15	ND	15	19	10	10	11	12	16	ND
12k5	18	27	34	30	37	35	12	19	20	24	19	22
12m3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11	11	15	11	ND	ND
12m5	12	19	19	19	19	25	12	11	18	13	15	15
12m7	12	26	17	12	17	17	12	12	18	17	13	11
17m1	15	29	29	29	30	35	12	14	20	22	28	23
17m3	12	20	18	18	18	24	12	14	15	12	16	20
17m4	14	26	22	23	27	32	11	14	20	19	23	22
19m2	ND	ND	ND	ND	ND	12	18	11	9	10	ND	ND
19m4	ND	ND	ND	ND	ND	15	12	10	13	13	ND	ND
20m2	ND	ND	ND	ND	ND	12	11	9	13	12	ND	ND
21m4	ND	ND	ND	ND	ND	10	9	ND	13	13	ND	ND
29m3	ND	ND	ND	ND	ND	11	15	11	13	14	ND	ND
32m2	ND	ND	ND	ND	ND	13	11	11	12	14	ND	ND
33m7	ND	ND	ND	ND	ND	13	12	11	12	15	ND	ND
35k4	ND	ND	ND	ND	ND	10	13	9	9	9	ND	ND
35k5	ND	ND	ND	ND	ND	15	15	12	10	10	ND	ND
37m1	13	ND	11	7	12	25	13	12	12	13	ND	ND
38m3	11	ND	14	ND	15	ND	9	13	11	13	ND	ND
41k6	16	ND	ND	ND	ND	20	21	12	12	14	ND	ND

ND: não detectado formação de halo de inibição

Continuação da Tabela 6.

	CR3	CR9	CR11	CR13	CR19	Lb	48M3	17M2	24M2	52M8	43M3	53M6
41m5	6	ND	6	ND	9	19	ND	ND	ND	ND	ND	ND
48m5	17	30	30	29	30	35	15	16	21	21	22	21
47k2	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	7	10	8	ND	ND
35m3	ND	ND	11	ND	13	ND	9	10	9	12	ND	ND
31m3	ND	ND	ND	ND	ND	13	11	11	11	13	ND	ND
38m2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9	9	9	13	ND	ND

ND: não detectado formação de halo de inibição

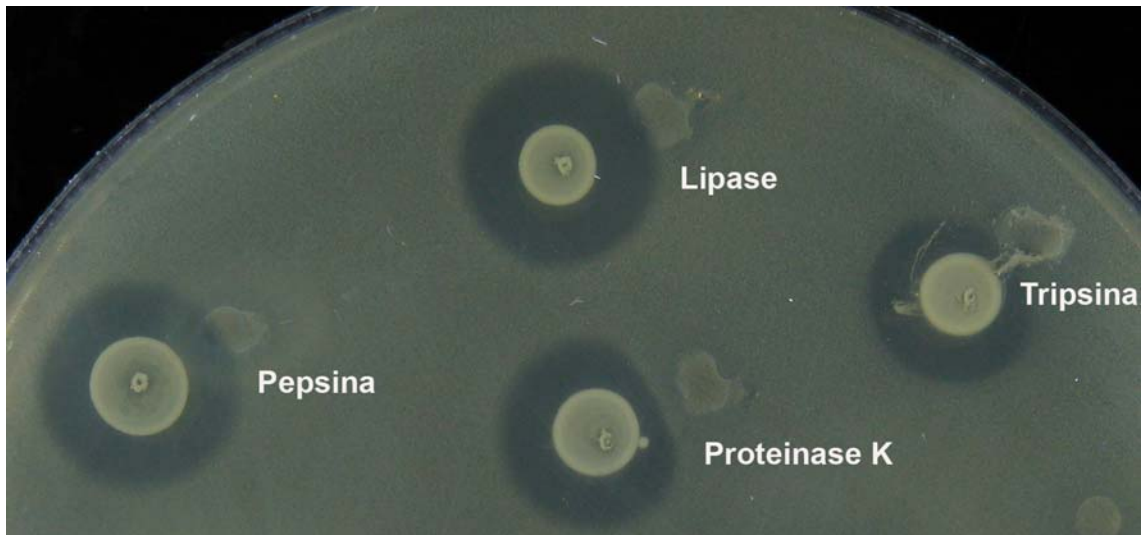


Figura 1. Teste de sensibilidade enzimática das substâncias antimicrobianas produzidas pelo isolado En01. Microrganismo indicador de sensibilidade: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

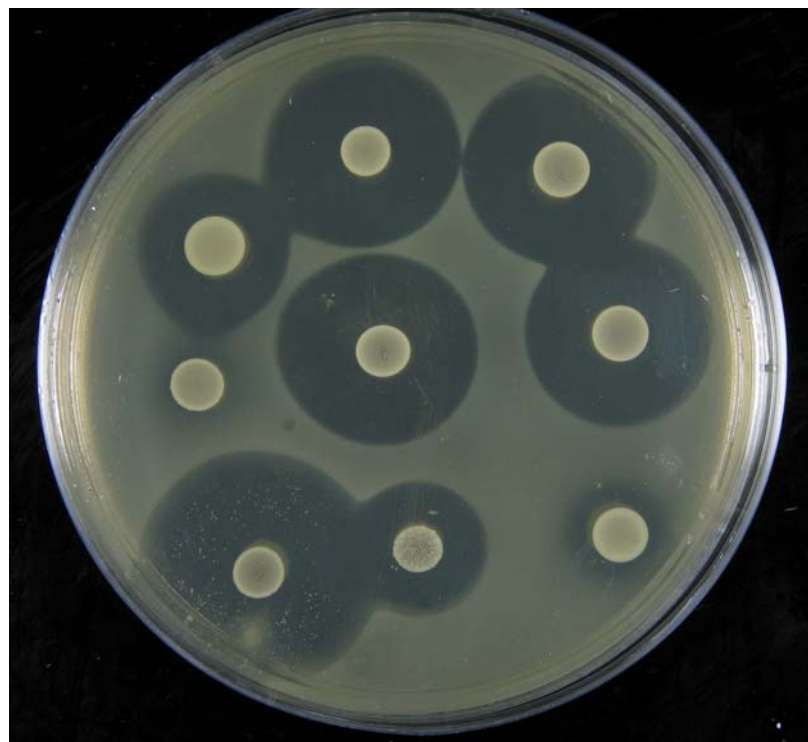


Figura 2. Halos de inibição observados por bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo utilizando o método spot-on-the-lawn. Microrganismo indicador de sensibilidade: *Lactobacillus sakei* ATCC 15521.

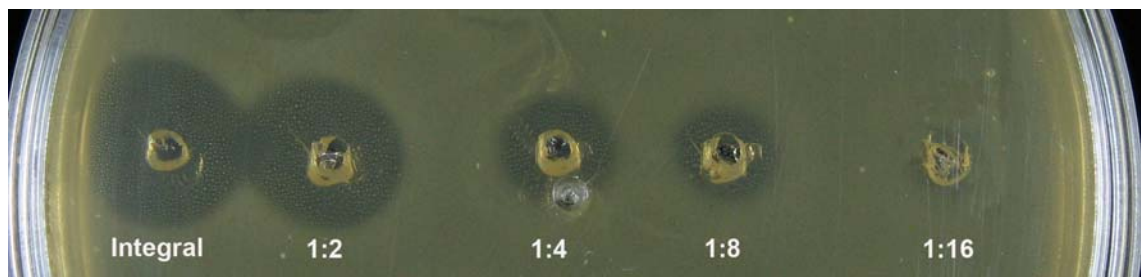


Figura 3. Halos de inibição observados pelo isolado Lc10 utilizando o método diluição crítica. Microrganismo indicador de sensibilidade: *Staphylococcus aureus* 26BP6.