

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ESTUDO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS
POR ESPÉCIES DE *ENTEROCOCCUS***

Alessandra Einsfeld Ferreira
Bióloga – PUCRS

Fevereiro, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ESTUDO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS
POR ESPÉCIES DE *ENTEROCOCCUS***

Alessandra Einsfeld Ferreira
Bióloga – PUCRS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre (RS), fevereiro de 2005.

AGRADECIMENTOS

À Dr. Gertrudes Corção pela orientação, paciência, amizade e perseverança, essenciais para a realização deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Dr. Marisa da Costa, Dr. Sueli T. Van Der Sand e Dr. Amauri Simonetti pelas sugestões e amizade.

Às colegas de laboratório 166 e amigas Daiane Fuentefria, Juliana Flach e Adriana Corrêa.

A Michele Hoeltz e Patrícia Valente pelas cepas de fungos filamentosos e leveduras utilizadas neste trabalho.

Aos amigos Mercedes Passos Geimba, Sílvia Dias de Oliveira e Ricardo Flores Casanova por me apresentarem a microbiologia.

Aos colegas do curso em especial para Raquel Lorentz pela amizade e companheirismo.

As estagiárias Daiana Morales e Natália Canal pela dedicação a este trabalho e principalmente pela amizade que tornaram estes dois anos de convívio especiais.

À minha família pelo apoio, incentivo e confiança.

Ao Juliano pelo amor, amizade, por acreditar e estar sempre presente, muito obrigada.

As minhas avós Maria Regina e Sílvia “in memória” pelo amor e por estar sempre ao meu lado. A elas dedico este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

ESTUDO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR ESPÉCIES DE *ENTEROCOCCUS*¹

Autora: Alessandra Einsfeld Ferreira

Orientadora: Dr. Gertrudes Corção

Resumo

As enterocinas são compostos de natureza protéica que apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos. Por esta razão, nos últimos anos, o interesse por estas substâncias tem aumentado devido ao seu uso potencial como biopreservante de alimentos. Realizando uma triagem com 352 cepas de *Enterococcus* spp para detectar atividade antimicrobiana, foram encontradas 18 cepas (5%) produtoras de enterocinas, pertencentes às espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. mundtii* todas provenientes de amostras de fezes de humanos. Destas cepas foram produzidos sobrenadantes livres de células e realizados testes para caracterização das enterocinas produzidas. As enterocinas produzidas pelas 18 cepas apresentaram o mesmo espectro de atividade antimicrobiana, inibindo 4 espécies do gênero *Listeria*, *Lactobacillus plantarum* e *Salmonella* Enteritidis. Todas foram parcialmente estáveis ao aquecimento (121°C por 10 minutos), a variações de pH de 2 a 10 e a estocagem por 60 dias a 4°C e a -20°C. A sensibilidade a proteases confirmou a natureza protéica destas substâncias antimicrobianas. Com cinco sobrenadantes livres de células foram realizadas curvas de produção de enterocinas e todas iniciaram a produção na fase logarítmica de crescimento, indicando cinética de metabólito primário. Com estes sobrenadantes foi determinado o peso molecular aproximado de 3 KDa, utilizando a técnica de SDS-PAGE. As cepas com atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células não apresentaram os genes para produção das enterocinas A e B, mas 14 cepas de *E. faecium* apresentaram o gene para enterocina A e 9 para enterocina B, sendo que apenas uma cepa apresentou ambos os genes. Nenhuma das 18 cepas produtoras de enterocinas apresentou atividade hemolítica e presença de adesinas, todas apresentaram cápsula. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que estas enterocinas demonstram um potencial aplicabilidade em novos estudos relacionados aos biopreservantes.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Biologia Molecular de Microrganismos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (114 p). Fevereiro de 2005.

THE STUDY OF BACTERIOCINS PRODUCED BY *ENTEROCOCCUS* SPECIES ¹

Autor: Alessandra Einsfeld Ferreira

Adviser: Dr. Gertrudes Corção

ABSTRACT

Enterocins are proteic compounds that exhibit antimicrobial activity against spoilage and food borne pathogenic bacteria. For this reason, the interest by these substances has increased a lot at the last few years, mainly because its use as food biopreservative. In order to check this antimicrobial activity, a survey with 352 strains of *Enterococcus* were carried out and 18 strains (5%) of bacteriocin producers were found. These strains belonged to *E. faecalis*, *E. faecium* and *E. mundtii* species, all of them isolated from human feces. Cell-free culture supernatants from these strains were produced and the characterization of the enterocins were done. The enterocins produced by these 18 strains showed the same antimicrobial activity spectrum, inhibiting four species of *Listeria*, *Lactobacillus plantarum* and *Salmonella* Enteritidis. They were all stable to heat (even 121°C for 10 minutes), pH variations from pH 2,0 to 10,0 and storing for 60 days at 4°C and -20°C. The inhibitory activity was abolished after treatment with proteases, so the proteic nature of these compounds was confirmed. The growth curve and production of enterocin was analysed for five of these supernatants and all start the enterocin production at logarithmic phase, indicating primary metabolite kinetics. A molecular weight around 3 KDa, were determined by SDS-PAGE electrophoresis of these five supernatants. The enterocin producers strains did not present *entA* and *entB* genes, responsible for enterocin A and enterocin B production. However, 14 strains of *E. faecium* presented *entA* gene and 9, *entB* gene and only one strain presented both. None of the 18 enterocin producers strains showed neither hemolytic activity nor presence of adhesins. The results obtained in the present study demonstrate that these enterocins maybe be useful as biopreservatives in the food industry.

¹ Master of Science Dissertation in Environmental and Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (114 p). February, 2005.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Gênero <i>Enterococcus</i>	03
2.2 Os <i>Enterococcus</i> spp. na indústria de alimentos	06
2.3 Bacteriocinas	10
2.4 Enterocinas	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Meios de cultura e soluções	25
3.2 Cepas de <i>Enterococcus</i> spp.	25
3.3 Recuperação das amostras e manutenção das culturas bacterianas	26
3.4 Triagem das cepas produtoras de enterocinas	27
3.5 Teste de produção de peróxido de hidrogênio	27
3.6 Teste de detecção de bacteriófago lítico	28
3.7 Obtenção do sobrenadante de cultura	29
3.7.1 Preparação do pré-inóculo	29
3.7.2 Obtenção do sobrenadante livre de células	29
3.8 Teste de atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células	30
3.9 Determinação do espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células	31
3.9.1 Microrganismos indicadores	31
3.9.2 Determinação do espectro de atividade	33
3.9.3 Teste de inibição cruzada	33
3.10 Quantificação da atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células	33
3.11 Manutenção da atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células	34
3.11.1 Estabilidade ao tratamento térmico	34
3.11.2 Estabilidade do sobrenadante livre de células frente à variação de pH	35
3.11.3 Manutenção da atividade antimicrobiana sob refrigeração e congelamento	36
3.11.4 Suscetibilidade a enzimas proteolíticas	36
3.12 Fatores de virulência	37
3.12.1 Produção de adesinas	37
3.12.2 Hemolisina	37
3.12.3 Gelatinase	38
3.12.4 Coloração de cápsula	38
3.13 Curva de produção de enterocinas	38
3.13.1 Preparação do pré-inóculo	39
3.13.2 Realização da curva de produção	39

3.14	Extração de DNA cromossomal	39
3.14.1	Preparação das cepas bacterianas para extração do DNA	39
3.14.2	Protocolo para extração de DNA cromossomal	40
3.15	Amplificação dos genes das enterocinas A e B	41
3.16	Análise dos genes das enterocinas A e B amplificados	42
3.17	Determinação do peso molecular das enterocinas	42
3.18	Análise estatística	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Triagem das cepas produtoras de enterocinas	43
4.2	Atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células	47
4.3	Determinação do espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células	50
4.4	Teste de inibição cruzada	57
4.5	Quantificação da atividade antimicrobiana	60
4.6	Estabilidade ao tratamento térmico	62
4.7	Estabilidade frente a variações de pH	67
4.8	Manutenção da atividade antimicrobiana sob refrigeração e congelamento	71
4.9	Suscetibilidade a enzimas proteolíticas	75
4.10	Fatores de virulência	75
4.11	Curva de produção de enterocinas	78
4.12	Amplificação dos genes das enterocinas A e B pela PCR	82
4.13	Determinação do peso molecular das enterocinas	87
5.	CONCLUSÕES	89
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
8.	APÊNDICE	100
8.1	Meios para recuperação e crescimento das bactérias	100
8.2	Reagentes para extração de DNA cromossomal	102
8.3	Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose	104
8.4	Reagentes para SDS-PAGE	105
8.5	Triagem das cepas provenientes de amostras de água contra cinco bactérias indicadoras.	108
8.6	Triagem das cepas provenientes de amostras de fezes de humanos contra cinco bactérias indicadoras.	110
8.7	Triagem das cepas provenientes de amostras de fezes de suínos contra cinco bactérias indicadoras.	112

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Número de cepas de <i>Enterococcus</i> spp. utilizadas neste trabalho, distribuídas quanto à espécie e local de origem.	26
2. Relação das culturas indicadoras utilizadas no teste de espectro de atividade antimicrobiana realizado com o sobrenadante livre de células produtor de enterocinas, meios de cultura utilizados para cada microrganismo indicador e temperatura de crescimento.	32
3. Número de cepas utilizadas neste trabalho por espécie e origem, resultados obtidos na triagem utilizando as cepas de <i>Enterococcus</i> spp. contra 5 bactérias indicadoras e após teste de produção de peróxido de hidrogênio.	46
4. Lista das 26 cepas de <i>Enterococcus</i> spp. com atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células.	49
5. Espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células das cepas de <i>Enterococcus</i> .	52 e 53
6. Resultados do teste de inibição cruzada entre os sobrenadantes livre de células e as cepas produtoras.	59
7. Resultados obtidos na quantificação da atividade antimicrobiana em UA/mL das triplicatas dos sobrenadantes livre de células das 18 cepas produtoras de enterocinas, utilizando a técnica de difusão em poços com <i>L. innocua</i> ATCC 33090 como bactéria indicadora, incubada a 35°C por 18 horas.	62
8. Resultados obtidos no cálculo da atividade residual em % para os sobrenadantes livre de células após tratamento térmico.	64
9. Resultados obtidos no cálculo da atividade residual em % para os sobrenadantes livre de células após exposição a diferentes pHs.	68
10. Atividade antimicrobiana em UA/mL dos sobrenadantes livres de células estacados sob refrigeração a 4°C.	73
11. Atividade antimicrobiana em UA/mL dos sobrenadantes livres de células estacados sob congelamento à -20°C.	74

12. Resultados obtidos nos teste de fatores de virulência para os 18 isolados com atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células. 78
13. Resultados obtidos no teste de triagem contra cinco bactérias indicadoras, teste de produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células (SLC) e presença do gene para produção das enterocinas A e B nas cepas de *E. faecium*. 86

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Técnica de difusão em poços: a) as ponteiras são fixadas em uma fina camada de ágar TSA; b) sobre a placa com as ponteiras, é vertida uma segunda camada de ágar TSA semi-sólido com o microrganismo indicador; c) o sobrenadante é adicionado nos poços.	31
2. Resultado da triagem utilizando a técnica de dupla camada com as cepas de <i>Enterococcus</i> spp. inoculadas em picada e uma camada da bactéria indicadora <i>L. innocua</i> ATCC 33090, com incubação a 35°C por 24 horas.	44
3. Ensaio mostrando os halos de inibição obtidos no teste de difusão em poços com os sobrenadante livre de células, utilizando <i>L. innocua</i> ATCC 33090 como bactéria indicadora, com incubação de 35°C por 18 horas.	48
4. Teste de difusão em poços com os 18 sobrenadantes e a bactéria indicadora <i>Xanthomonas anoxopodis</i> ATCC 8718, incubada a 35°C por 18 horas, mostrando os halos de crescimento da bactéria ao redor dos poços.	55
5. Teste de difusão em poços com a bactéria <i>Enterococcus faecium</i> 70, incubada a 35°C por 18 horas, mostrando os halos de inibição formados pelos sobrenadantes livre de células.	58
6. Resultado obtido no teste de determinação da atividade antimicrobiana em UA/mL, mostrando os halos de inibição formados pelo sobrenadante livre de células sem diluição (B) e diluído até 1/64. Foi utilizada técnica de difusão em poços com a bactéria indicadora <i>L. innocua</i> ATCC 33090 e incubação a 35°C por 18 horas.	60
7. Resultado da análise de variância utilizando os halos de inibição (mm) obtidos no teste de manutenção da atividade antimicrobiana após tratamento térmico para os 18 sobrenadantes, com um índice de confiança de 95%. Cada ponto representa a média dos halos de inibição de 18 sobrenadantes testados em triplicata e (0) – controle sem tratamento.	65
8. Resultados da análise de variância, cada ponto representa a média dos halos de inibição em milímetros obtidos no teste de manutenção da atividade antimicrobiana após tratamento térmico para os 18 sobrenadantes testados em triplicata das espécies: 1 – <i>E. faecalis</i> (9 sobrenadantes com n = 241), 2- <i>E. faecium</i> (5 sobrenadantes com n=135) e 3 – <i>E. mundtii</i> (4 sobrenadantes com n=108). Com índice de confiança de 95%.	66

9. Resultados da análise de variância utilizando os halos de inibição (mm) obtidos para os 18 sobrenadantes após teste de manutenção da atividade antimicrobiana em diferentes pHs, utilizando como índice de confiança 95%. (0) Controle sem tratamento de 2 a 10 os pHs testados. 69
10. Resultados da análise de variância utilizando o tamanho dos halos (mm) obtidos para os 18 sobrenadantes testados em triplicata após o teste de manutenção da atividade antimicrobiana em diferentes pHs para as espécies: 1 – *E. faecalis* (9 sobrenadantes com n = 241), 2- *E. faecium* (5 sobrenadantes com n=135) e 3 – *E. mundtii* (4 sobrenadantes com n=108). Com índice de confiança de 95%. 70
11. Curvas de produção de enterocinas com os resultados da atividade antimicrobiana em UA/mL, crescimento microbiano (ABS 620nm) e pH do meio de cultura (*) para as cepas de *E. faecalis* 119 (A), *E. faecium* 69 (B) e 70 (C), *E. mundtii* 39 (D) e 115 (E). A curva foi realizada em caldo MRS a 35°C por 18 horas, sendo ponto 0 o inicial. 81
12. Amplificação do gene da enterocina A em cepas de *Enterococcus faecium* em gel de agarose 1% com o marcador molecular DNA λ /Eco RI + Hind III (canaleta 1), controle da reação (canaleta 2), cepa de *E. mundtii* como controle negativo (canaleta 3) e cepas de *E. faecium* (canaletas de 4 a 8). 85
13. Amplificação do gene da enterocina B em cepas de *Enterococcus faecium* em gel de agarose 1% com o marcador molecular DNA λ /Eco RI + Hind III (canaleta 1), controle da reação (canaleta 2), cepa de *E. mundtii* como controle negativo (canaleta 3) e cepas de *E. faecium* (canaletas de 4 a 8). 85
14. Resultado obtido no teste de determinação do peso molecular das enterocinas. No gel à esquerda corado com Coomassie Blue e a direita o gel de atividade antimicrobiana utilizando a bactéria indicadora *L. innocua*. A seta indica a posição da zona de inibição. M= marcador de peso molecular. 88

1. INTRODUÇÃO

A fermentação de alimentos utilizando Bactérias Ácido Láticas (BAL) é uma forma de bioconservação utilizada há milhares de anos. Uma importante característica das BAL é sua habilidade de produzir compostos antimicrobianos chamados de bacteriocinas e, sendo no gênero *Enterococcus*, denominadas de enterocinas. Estes compostos de natureza protéica apresentam atividade antimicrobiana contra muitas bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos. Por esta razão, nos últimos anos, o interesse por estas substâncias tem aumentado devido ao seu potencial uso como preservante natural podendo substituir a utilização de preservantes químicos na produção de alimentos, aumentando seu tempo de prateleira e tornando-os mais seguros. A bacteriocina nisina produzida por *Lactococcus lactis* é utilizada em muitos países como biopreservante em diversos alimentos.

Algumas espécies de *Enterococcus* têm sido utilizadas como culturas “starter” e também em preparações probióticas. Na fabricação de alguns tipos de queijos os enterococos têm importante papel no desenvolvimento do sabor e, como probióticos, eles podem contribuir para melhorar o balanço microbial e para o tratamento de gastroenterites em humanos e animais. Além disso, muitas

cepas são produtoras de enterocinas, tem a capacidade de inibir bactérias deteriorantes de alimentos e patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp.

Antes de uma bacteriocina ser considerada para a aplicação na área de alimentos, informações como o espectro antimicrobiano, características bioquímicas e genéticas e a eficácia em alimentos devem ser conhecidas.

Desta forma, objetivo geral deste trabalho foi analisar as enterocinas produzidas por cepas de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras de água, fezes de humanos e fezes de suínos. Como objetivos específicos: 1- identificar cepas de *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. hirae* e *E. dispar* produtores de enterocinas, 2- caracterizar as enterocinas produzidas quanto ao espectro de atividade antimicrobiana, sensibilidade a proteases, estabilidade térmica, alterações de pH, atividade após estocagem, quantificação da atividade antimicrobiana e peso molecular, 3- determinar a curva de produção de algumas cepas produtoras de enterocinas, 4- verificar a presença dos genes codificadores das enterocinas A e B nas cepas de *E. faecium*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Enterococcus*

A bactéria mais comumente isolada das fezes de humanos foi primeiramente descrita em 1899 por Thiercelin e designada enterococos (Godfree et al., 1997). Os *Enterococcus* spp. sofreram diversas mudanças taxonômicas desde meados da década de 80, originalmente foram classificados como cocos Gram-positivos entéricos e posteriormente, incluídos no gênero *Streptococcus* (Murray, 1990). Com base na seqüência de nucleotídeos do rRNA 16S o gênero *Streptococcus* foi, então, subdividido em 3 gêneros: 1) *Streptococcus*, que compreende a maioria das espécies conhecidas; 2) *Enterococcus*, para o grupo de estreptococos entéricos e 3) *Lactococcus*, para os estreptococos lácticos (Devriese et al., 1993).

Pelos estudos realizados com o seqüenciamento do rRNA 16S a posição filogenética precisa do gênero *Enterococcus* foi elucidada. Baseado portanto, nas seqüências quase completas do rRNA 16S, mostraram-se pertencentes à subdivisão dos clostrídios das bactérias Gram-positivas, juntamente com os gêneros das Bactérias Ácido Lácticas (BAL) *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

Pediococcus, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagacoccus* (Collins et al., 1989).

O gênero *Enterococcus* apresenta as seguintes características fenotípicas: são cocos Gram-positivos, não formadores de esporos, ocorrem isolados, aos pares ou em pequenas cadeias. Eles são anaeróbios facultativos com necessidades nutricionais complexas e um metabolismo fermentativo que resulta em ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose. A maioria das espécies apresenta a capacidade de crescer a 10°C, a 45°C, na presença de 6,5% de NaCl e algumas são móveis (Hardie e Whiley, 1997).

Os *Enterococcus* podem ser encontrados no solo, alimentos, água, plantas, animais, pássaros e insetos. Esta diversidade de ambientes é provavelmente devido à sua disseminação pelas fezes de animais de sangue quente e por sua habilidade em crescer e sobreviver numa grande variedade de condições ambientais, incluindo temperaturas extremas e altas concentrações de sal (Hardie e Whiley, 1997).

Uma característica importante deste grupo de bactérias é a resistência ao estresse químico e físico e, ao contrário de outras bactérias fecais que são liberadas no ambiente (como *Escherichia coli*), os enterococos são capazes de sobreviver por longos períodos fora do ambiente intestinal de seu hospedeiro (Kühn et al., 2000).

Os *Enterococcus* são bactérias comensais que fazem parte da microbiota do trato gastrintestinal de seres humanos e de animais. Mesmo não sendo considerados como microrganismos altamente patogênicos, os

Enterococcus estão entre os organismos mais comumente encontrados em infecções nosocomiais (Kühn et al., 2000).

Enterococcus têm sido tradicionalmente reconhecidos como patógenos de baixo grau. Nas últimas décadas, eles têm emergido como um importante patógeno hospitalar em pacientes imunodeprimidos e em unidades de tratamento intensivo. A causa de infecções por enterococos adquiridas em hospitais é em parte devido ao aumento do uso de antibióticos de largo espectro. *E. faecalis* é o microrganismo isolado mais frequentemente, estando associado a 80-90% das infecções humanas, seguido pelo *E. faecium*, encontrado em 10-15% das infecções. Outros como *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. hirae*, *E. malodoratus* e *E. mundtii* são recuperados com pouca frequência de infecções humanas. As outras espécies raramente são isoladas de amostras biológicas humanas ou são primariamente encontradas no trato gastrointestinal de diferentes animais (Koneman et al., 2001).

A resistência a diversos agentes antimicrobianos também contribui efetivamente para sua patogenicidade. Esses organismos apresentam resistência intrínseca de baixo nível aos aminoglicosídeos e lincosaminas, respondem à CIM (Concentração Inibitória Mínima) de penicilina e cefalosporinas relativamente elevada e são resistentes à ação de sulfonamidas *in vivo* (Murray, 1990). Enterococos não são somente intrinsecamente resistentes a alguns antibióticos, mas são caracterizados como possuidores de uma potente e única habilidade de troca de material gênico (Giraffa, 2002). Um grande uso de drogas promotoras de crescimento em rações animais tem

causado um aumento na resistência aos antibióticos em enterococos de origem animal, sendo que esta resistência também parece ter-se propagado para enterococos em populações humanas (Kühn et al., 2003).

De acordo com sua comum ocorrência no trato gastrintestinal de animais, cepas de enterococos e outras do grupo D-estreptococos estão presentes em muitos alimentos, especialmente os de origem animal. Como consequência o isolamento de *E. faecalis* e *E. faecium* tem sido usado como indicadores de contaminação fecal em alimentos. A sobrevivência no ambiente e a resistência a trocas de pH ou altas concentrações de sal são pré-requisitos para estar presente como um organismo indicador. Atualmente, os enterococos estão sendo considerados como parte da microflora normal e não somente como indicadores de falta de higiene (Klein, 2003).

2.2 Os *Enterococcus* spp. na indústria de alimentos

Na indústria os enterococos têm sido utilizados em diferentes aplicações como culturas “starter” ou adjuvantes tais como inoculantes em silagens, culturas “starter” em leite, na fabricação de queijos e salames (Girrafa et al., 1997) e probióticos. Em alimentos, eles parecem ter um papel importante no desenvolvimento do sabor de alguns queijos (Centeno et al., 1996), enquanto como probiótico, eles podem contribuir para melhorar o balanço microbial e para tratamento de gastroenterites em humanos e animais (Franz et al., 1999 a).

A influência positiva dos enterococos em queijo é devido às características bioquímicas específicas tais como atividade lipolítica, utilização de citrato e produção de compostos aromáticos voláteis. Tem se demonstrado que cepas de enterococos isoladas de produtos lácteos não produzem hemolisina, sugerindo a ausência de atividade hemolítica como um critério de seleção de cepas para utilização na indústria do leite (Giraffa, 1995).

Diferentes espécies de enterococos são encontradas em produtos lácteos, mas *E. faecium* e *E. faecalis* são as espécies de maior importância (Franz et al., 1999 a; Gelsomino et al., 2001). Altos níveis de contaminação por *Enterococcus* spp. geralmente resultam da falta de higiene durante a fabricação e levam à deterioração das propriedades sensoriais de alguns queijos, mas podem empregar um papel importante na maturação e no desenvolvimento de aroma em outros tipos de queijos (Torri Tarelli et al., 1994; Centeno et al., 1996). Alguns enterococos isolados de leite têm sido identificados como produtores de bacteriocinas (enterocinas) que inibem bactérias deteriorantes de alimentos e patogênicas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp. (Giraffa, 2003).

Em alguns queijos, como Cebreiro, Kefalotyri, Manchego, Picante da Beira Baixa e Teleme, os enterococos são microrganismos predominantes durante toda a maturação do produto. Em outros queijos tradicionais, BAL tais como *Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides*, *Leuconostoc lactis* ou *Leuconostoc paracasei* predominam na maturação do produto.

Entretanto, os enterococos representam uma importante parcela da flora microbiana da maturação destes queijos (Franz et al., 1999a).

A concentração de sal aumenta durante a maturação do queijo, este é um importante fator de seleção para o crescimento de enterococos tolerantes ao sal durante o último estágio de maturação (Freitas et al., 1995). Enterococos mostram maior atividade proteolítica do que outras BAL, sendo considerados importantes para a maturação de queijos (Centeno et al., 1996). O efeito benéfico do enterococos na fabricação de queijos também tem sido atribuído à hidrólise da gordura do leite pelas esterases (Franz et al., 1999a). Em adição, enterococos produzem compostos típicos de sabor tais como acetaldeído, acetoína e diacetil. Este importante papel dos enterococos no desenvolvimento de aromas no queijo levou à inclusão de cepas de enterococos em certas culturas “starter” (Centeno et al., 1996).

Muitos queijos europeus se caracterizam por possuírem uma flora complexa de microrganismos em sua superfície, como leveduras, bactérias coriniformes, micrococos ou estafilococos coagulase-negativos. Enterobactérias e enterococos também são encontrados como bactérias contaminantes em menor quantidade (Bockelmann, 2002). Em estudos recentes sobre a microbiota bacteriana de maturação da superfície de queijos, foram encontradas cepas de enterococos. Estas inibiram cepas de *Listeria* sp. e foram indicadas como promissoras candidatas para o desenvolvimento de uma flora de maturação da superfície de queijo (Carnio et al., 1999). Claramente, os enterococos empregam um importante papel na produção de queijos típicos de algumas regiões (Girrafa, 1995).

A presença de enterococos no trato gastrintestinal de animais aumenta o potencial de contaminação de carnes. *E. faecalis* é o isolado predominante em carne bovina e suína. *E. faecium* é também freqüentemente isolado de bologna, um salame processado com carne de porco (Franz et al., 1999a). As atividades bioquímicas dos enterococos em salames não têm sido estudadas, embora possam contribuir para a aromatização do salame pelas suas atividades glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas (Sarantinopoulos et al., 2002).

A presença de enterococos em carne fermentada é constantemente citada na literatura. Apesar do interesse sobre a patogenicidade, recentes estudos indicam que enterococos em carnes e alimentos, especialmente *E. faecium*, têm uma patogenicidade potencial muito baixa em relação às cepas clínicas. *E. faecalis*, especialmente *E. faecium*, representam uma das espécies de BAL que podem ser encontradas em número relativamente alto durante a fermentação da carne. Eles podem contribuir, junto com os *Lactobacillus*, para a fermentação (Girrafa et al., 1997).

Em contraste com muitas fermentações de leite, fermentações de carne não iniciam de um material estéril (Hugas et al., 2003). Durante a maturação do salame, o maior risco microbiano a ser controlado são *Salmonella* sp., *E. coli* enterohemorrágica, *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Compostos antimicrobianos produzidos por BAL podem conferir uma vantagem adaptativa. No entanto, a produção de bacteriocinas por uma determinada cepa nem sempre é expressa na complexa matriz da fermentação de salames (Aymerich et al., 2000). Os principais fatores que afetam a

eficiência e a produção de bacteriocinas em carnes são: ambiente inadequado para crescimento e/ou produção de bacteriocina, perda da habilidade de produzir bacteriocinas, antagonismo pela microbiota, desenvolvimento de organismos resistentes a bacteriocinas e formação de complexos não ativos entre as bacteriocinas e macromoléculas. A eficiência da atividade antimicrobiana pode ser elevada pela combinação entre bacteriocinas (Schillinger et al., 1996) ou por cepas consideradas seguras (GRAS) com produção heteróloga de algumas bacteriocinas. *E. faecium* CTC492 é capaz de crescer na fermentação, mas não produz enterocinas em ambiente cárneo por causa do efeito inibitório do sal, temperos (pimenta) e do baixo pH (Aymerich et al., 2000). Todavia, *E. faecalis* AS48 apesar de não ser isolado de alimento, foi capaz de crescer e produzir bacteriocinas em carne (Hugas et al., 2003). A cepa de *E. faecium* F688 é uma cepa probiótica (European Patent Application 0508701^{A2}, 1991) em produtos de carne. Esta cepa também é bastante competitiva em salames, alcançando 10^7 UFC g⁻¹ no final da maturação (Franz et al., 1999).

2.3 Bacteriocinas

Alguns microrganismos produzem um extraordinário arsenal de sistemas defensivos. Esses incluem os clássicos antibióticos de amplo espectro, produtos do metabolismo como ácido lático, agentes líticos como lisozima, numerosos tipos de proteínas exotoxinas e bacteriocinas (Riley e Wertz, 2002).

O estudo de bacteriocinas teve início com a descoberta por Gratia em 1925, de um antibiótico altamente específico, produzido por uma cepa de *Escherichia coli* e ativo contra outras cepas da mesma espécie. Este primeiro artigo descrevia muito das características básicas do que foi posteriormente considerado um grupo de antibióticos similares produzidos por vários membros de Enterobacteriaceae e que foi chamado de colicinas proposto por Gratia e Fredericq (1946). Com a descoberta da produção de agentes aparentemente iguais em organismos não coliformes, Jacob et al. (1953) propuseram um termo mais geral, de bacteriocinas, para proteínas altamente específicas, produzidas por certas cepas de bactérias e ativas principalmente contra outras cepas de mesma espécie. O primeiro relato da produção de substâncias antimicrobianas por bactérias lácteas foi feito em 1928 por Rogers, que observou a atividade antimicrobiana de *Lactococcus lactis* contra *Lactobacillus delbrueckii*, e posteriormente foi denominada de nisina (Mayr-Harting et al., 1972).

Bacteriocinas são peptídeos e/ou proteínas com atividade bactericida ou bacteriostática. Estes compostos podem inibir ou eliminar o crescimento de espécies intimamente relacionadas (Bennik et al., 1998). Bactérias ácido lácticas (BAL), assim como suas bacteriocinas, são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), pois não afetam humanos nem outros eucariotos (Eijsink et al., 2002).

A produção de bacteriocinas tem sido descrita em vários gêneros de bactérias ácido lácticas incluindo *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (Franz et al., 1996).

O estudo de bacteriocinas produzidas por BAL tem atraído grande interesse nos últimos anos pelo seu uso potencial como biopreservante na indústria de alimentos, para eliminar bactérias patogênicas e deteriorantes (Cintas et al., 2000).

A aplicação das bacteriocinas no biocontrole de alimentos é principalmente orientada em duas direções: 1) o uso de BAL produtoras de bacteriocinas ou 2) a adição direta de preparações de bacteriocinas, sintética ou purificada de um sobrenadante de cultura da cepa produtora. A produção *in situ* de bacteriocinas pode aumentar a competitividade da cepa produtora na matriz do alimento e contribuir para a prevenção da degradação do alimento. Contudo, a microbiota endógena, a fórmula e a tecnologia podem influenciar o desempenho da cultura produtora (Hugas et al., 2003).

Klaenhammer (1988) classificou as bacteriocinas produzidas pelas BAL em duas classes, segundo o espectro antimicrobiano. A primeira classe engloba as bacteriocinas que inibem somente bactérias intimamente relacionadas à bactéria produtora, sendo a maioria das bacteriocinas pertencentes a esta classe. A segunda classe engloba bacteriocinas com espectro antimicrobiano mais amplo, embora atuem somente em bactérias Gram-positivas.

O espectro de atividade das bacteriocinas é, por definição, restrito a organismos intimamente relacionados (Tagg *apud* Holzapfel et al., 1995). Para BAL, este espectro limitado, implica em duas desvantagens: capacidade inibitória sobre culturas “starter” e de inatividade contra bactérias patogênicas e deteriorantes (Holzapfel et al., 1995).

Bacteriocinas são sintetizadas como precursores pelo ribossomo e o peptídeo maduro usualmente consiste de 20-60 aminoácidos. Existe uma grande variação entre os peptídeos, em geral em termos de comprimento, seqüência de aminoácidos, secreção e mecanismos de processamento, modificações pós-traducionais e atividade antimicrobiana (sozinha ou em combinação com outros peptídeos).

A classificação atual para as bacteriocinas as divide nas seguintes classes (Eijsink et al., 2002):

- CLASSE I (lantibióticos):

Tipo A: moléculas de forma alongada

Tipo B: moléculas globulares

- CLASSE II:

Subclasse IIa: bacteriocinas tipo pediocina

Subclasse IIb: bacteriocinas com 2 peptídeos

Subclasse IIc: outras bacteriocinas peptídeos

- CLASSE III: bacteriocinas proteínas

Os lantibióticos são peptídeos sintetizados pelo ribossomo, que sofrem modificações após a tradução e contêm aminoácidos modificados, tais como lantionina e metil-lantionina (McAuliffe et al., 2001). Este grupo apresenta moléculas pequenas (<5 KDa) e tem recebido maior atenção nos últimos anos devido à nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, utilizada como preservante de alimentos em muitos países (Kawamoto et al., 2002). Os lantibióticos têm sido subdivididos em dois tipos baseados na sua estrutura: Tipo A, inclui moléculas flexíveis e alongadas que têm carga positiva, atuando

na despolarização da membrana. Elas têm um peso molecular de 2 – 5 KDa. A nisina pertence a este grupo de lantibióticos. O Tipo B, são dos peptídeos globulares, com peso molecular de aproximadamente 2 KDa. Eles atuam interferindo nas reações enzimáticas celulares, como por exemplo, o lantibiótico mersacidina que interfere com a síntese da parede celular em bactérias Gram-positivas (Sahl e Bierbaum, 1998).

A Classe II é formada por bacteriocinas pequenas (<10 KDa), não modificadas, exceto pela clivagem do peptídeo líder, estáveis ao calor e divididas em 3 subgrupos (Cintas et al., 1997). A Classe IIa é a mais estudada atualmente, podendo ser considerada como o maior subgrupo de bacteriocinas produzidas por BAL, não somente pelo grande número de bacteriocinas identificadas, mas também pela sua atividade e seu potencial de aplicação. Este subgrupo é classificado com base na similaridade na seqüência de aminoácidos da parte N-terminal e sua forte atividade anti-listeriana. Por causa desta eficiência contra *Listeria* spp. este grupo tem significativo potencial como biopreservante em muitos alimentos. Em adição a todas as espécies de *Listeria*, espécies pertencentes aos seguintes gêneros têm se apresentado sensíveis a estas bacteriocinas: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Brochothrix*. Além disso, algumas destas bacteriocinas têm se mostrado eficientes contra a germinação de esporos e crescimento de células vegetativas de *Clostridium* sp. (Ennahar et al., 2000).

A classe IIb é formada pelas bacteriocinas, cuja atividade depende da ação complementar de dois peptídeos diferentes. Lantibióticos com dois

peptídeos também existem, mas essas bacteriocinas não têm sido classificadas como um tipo separado da classe I (Cintas et al., 1997).

A classe IIc contém todas as bacteriocinas não lantibióticas e que não pertencem as classes IIa e IIb e representam uma diversidade de bacteriocinas de várias BAL. Em definições prévias, a classe IIc abrangia bacteriocinas secretadas pelo caminho sec-dependente, mas hoje, o mecanismo de secreção não é mais usado como discriminador na classificação de não lantibióticos. É fato que algumas bacteriocinas da classe IIc apresentam seqüências significativamente similares, que não foram estabelecidas para outros subgrupos (Casaus et al., 1997; Franz et al., 1999a).

As bacteriocinas da classe III são proteínas grandes (>30 KDa) e estáveis ao calor. A Classe IV é formada por proteínas complexas que requerem associações com lipídeos e carboidratos para apresentarem atividade (Lauková et al., 1998a).

A produção de bacteriocinas é um processo dependente do crescimento e da atividade fisiológica da bactéria produtora (Leroy e De Vuyst, 2002; Yang e Ray, 1994), o que faz com que a quantidade de bacteriocina formada no meio seja correlacionada com a biomassa produzida. Logo, a composição do meio de cultura e a suplementação com nutrientes especiais, assim como a temperatura e o pH do processo são fatores que influenciam nos níveis de produção de bacteriocina (Yang e Ray, 1994). As condições ambientais que estimulam o crescimento de células freqüentemente melhoram a produção de bacteriocinas. No entanto, elevadas taxas de crescimento celular e alta concentração de massa celular não necessariamente aumentam

os níveis de produção de bacteriocina, pois podem causar uma baixa na produção por grama de célula. Conseqüentemente, existe uma relação complexa entre as condições ambientais e os níveis de atividade de bacteriocina; nenhuma generalização sobre as condições ótimas para a produção pode ser feita. Do ponto de vista ecológico pode se sugerir que o crescimento das células ao atingir um alto número, diminui a necessidade da produção de metabólitos de defesa. Quando a população percebe que determinada concentração de células foi alcançada, a produção de bacteriocinas pode ser inibida (Leroy e De Vuyst, 2002).

O baixo pH, altas concentrações de sal ou etanol afetam adversamente o crescimento e a produção de bacteriocinas. Na presença de 6,5% de NaCl ou de 7% de etanol, nenhuma produção de bacteriocina pode ser detectada (Nilsen et al., 1998).

Quanto à biossíntese, observa-se que enquanto muitos antibióticos (considerados metabólitos secundários) são sintetizados durante a fase estacionária de crescimento, quase todas as bacteriocinas produzidas pelas BAL manifestam cinética de metabólito primário, começando a serem produzidas na fase logarítmica de crescimento. Por serem substâncias de natureza protéica, são sintetizadas pelo mesmo mecanismo ribossomal de síntese de proteínas, envolvendo transcrição e tradução. A síntese das bacteriocinas está determinada pela estrutura genética de 4 genes diferentes, os quais codificam funções básicas requeridas para a produção da atividade antimicrobiana extracelular. Estes genes podem estar localizados no cromossomo, em plasmídeos ou transposons (Nes et al., 1996).

O gene estrutural codifica para a produção de um pré-peptídeo contendo uma seqüência líder N-terminal, cuja função é de prevenir a bacteriocina de ser biologicamente ativa dentro da célula produtora e fornecer um sinal de identificação para o sistema transportador.

O gene envolvido com a imunidade, localizado próximo ao gene estrutural sobre a mesma unidade de transcrição, é responsável pela proteção da bactéria produtora, a sua própria bacteriocina (Nes et al., 1996). As proteínas de imunidade dos peptídeos da classe II não são completamente específicas e, como demonstrado por alguns estudos, um gene de imunidade pode dar proteção para mais de uma bacteriocina (Eijsink et al. 1998; 2002). Muitas BAL produtoras de bacteriocinas contêm mais genes de imunidade do que o necessário para proteção contra sua própria bacteriocina. Genes de imunidade também têm sido observados em BAL que não produzem bacteriocinas. Estas características têm um papel importante na determinação de diferenças de sensibilidades às bacteriocinas entre cepas intimamente relacionadas (Eijsink et al., 2002). Muito pouco é conhecido sobre o modo de ação destas proteínas de imunidade e não existe um modelo confiável da sua ação (Ennahar et al., 2000).

O gene que codifica o transportador ABC e o gene das proteínas acessórias são responsáveis por externalizar a bacteriocina. Os produtos destes genes são requeridos no processo de translocação. Muitas bacteriocinas da classe I e II são transportadas através da membrana por um sistema de transporte ABC. Algumas exceções são encontradas nas

bacteriocinas da classe II que são transportadas pelo sistema sec-dependente (Nes et al., 1996).

As bacteriocinas geralmente atuam criando poros na membrana de suas células alvo. Isto tem efeito deletério tal como a dissipação da força proto motora, depleção de ATP e perda de nutrientes e metabólitos. Embora a formação de poros seja uma característica geral, o tamanho, a estabilidade e a condutividade desses poros, diferem consideravelmente entre bacteriocinas (Herranz et al., 2001). Para formar o poro, a bacteriocina tem que interagir com a membrana da célula alvo. Este processo é em parte governado por interações eletrostáticas entre as cargas positivas do peptídeo e lipídios aniônicos presentes em grande quantidade na membrana de bactérias Gram-positivas. A ligação da bacteriocina na membrana pode ser afetada por fatores como potencial de membrana da célula alvo e o pH. O potencial de membrana, supostamente aumenta a inserção da bacteriocina na membrana e também pode afetar a associação das moléculas de bacteriocina. Conseqüentemente, a sensibilidade à bacteriocina depende algumas vezes do estágio fisiológico da célula (Eijsink et al., 2002).

Alguns fatores podem contribuir para aumentar a resistência das células às bacteriocinas. A composição e a estrutura da parede e da membrana celular podem fazer com que a bacteriocina seja fisicamente incapaz de atingir o alvo, de outra forma, certos componentes celulares (receptores) que são essenciais para a ligação da bacteriocina, podem estar mutados. Uma possibilidade também especulada é a presença de proteases junto à célula

alvo que podem reduzir a efetividade da bacteriocina em alguns casos (Eijsink et al., 2002).

Bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação das bacteriocinas. Estes microrganismos possuem uma barreira adicional, a membrana externa. Esta membrana é impermeável à grande maioria das moléculas, porém a presença de poros permite a difusão de moléculas com massa molecular menor de 600 Da. As bacteriocinas produzidas por BAL possuem tamanho médio de 3 KDa, muito grandes para atravessar a membrana (Abee et al., 1995).

Para considerações de segurança, as cepas a serem usadas como “starter”, probiótico ou cultura biopreservante, devem ser testadas para a presença de diferentes fatores de virulência fenotípica e genotipicamente, uma vez que pode apresentar genes e estes não estarem se manifestando (Eaton e Gassen, 2001).

2.4 Enterocinas

As bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus* são comumente chamadas de enterocinas. As enterocinas geralmente são ativas contra outros enterococos e contra *Listeria* spp. A capacidade de inibir listeria é de grande interesse para a fabricação de queijos, por ser a *Listeria monocytogenes* um patógeno capaz de crescer em temperaturas de refrigeração e ter a habilidade de sobreviver às condições ácidas da fabricação dos queijos (Papagianni, 2003). Esta atividade anti-listeriana pode ser explicada pelo fato dos enterococos e as listerias serem filogeneticamente

relacionadas. Algumas enterocinas são ativas também contra outras BAL como *Clostridium butolinum*, *C. perfringens* e *C. tyrobutyricum*.

As enterocinas têm uma grande estabilidade a altas temperaturas e em ampla faixa de pH, são sensíveis a proteases e tem um espectro de atividade antimicrobiana semelhante, inibindo os gêneros *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* e poucas apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas.

Enterococcus produtores de enterocinas já foram isolados de diversas fontes como carnes fermentadas, produtos de leite, legumes e amostras clínicas (Franz et al., 1999a), sendo que a maior parte dos estudos foi realizada com cepas isoladas de alimentos. As enterocinas bem caracterizadas e conhecidas atualmente são produzidas por cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*, pois são as espécies, deste gênero, mais encontradas em alimentos (De Vuyst et al., 2002). Entre as outras espécies, apenas a enterocina de *E. mundtii*, chamada de munditocina, foi identificada e caracterizada (Kawamoto et al., 2002).

As enterocinas mais bem caracterizadas são P, A e B produzidas por cepas de *E. faecium* isoladas de carne fermentada (Aymerich et al., 1996; Casaus et al., 1997; Cintas et al., 1997). A enterocina P produzida por *E. faecium* P13 isolado de salame fermentado, apresenta um amplo espectro antimicrobiano, inibindo o crescimento de bactérias como: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus carnosus*, *S. aureus*, *Clostridium sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *Propionibacterium* spp. e *Listeria monocytogenes*, não apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas. A

enterocina P tem peso molecular de 4.493 Da e demonstra, além do espectro antimicrobiano, outras propriedades que criam um promissor preservante de alimentos. Essas propriedades incluem sensibilidade às proteases, estabilidade térmica, atividade em ampla faixa de pH e manutenção da atividade após congelamento, liofilização e estocagem (Cintas et al., 1997).

As enterocinas A e B produzidas pelo *E. faecium*, não apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas, entretanto, por atuarem sinergicamente, inibem um grande número de bactérias Gram-positivas deteriorantes de alimentos como *Clostridium sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *Propionibacterium spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Casaus et al., 1997). A enterocina A foi isolada pela primeira vez de salame fermentado, é uma bacteriocina da classe II da família pediocina, tem peso molecular de 4.829 Da e tem uma forte atividade contra o gênero *Listeria*, característico das bacteriocinas da classe II (Aymerich et al., 1996). A enterocina B também pertence a família pediocina, mas não apresenta a seqüência de aminoácidos YGNGVxC na região N-terminal, característica das bacteriocinas desta classe. Tem um peso molecular de 5.479 Da. Estas enterocinas também apresentam atividade antimicrobiana contra os gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* e *Enterococcus* (Casaus et al., 1997).

Ennahar e colaboradores (1998) identificaram uma nova enterocina produzida por *E. faecium* WHE 81 isolado de queijo e chamaram de enterocina 81. Após caracterização genética desta enterocina, os autores concluíram que não era uma nova enterocina, mas as enterocinas A e B que estavam sendo

produzidas pela cepa (Ennahar et al., 2001). O mesmo resultado foi encontrado para a enterocina 900, produzida por *E. faecium*, que após purificação e caracterização era idêntica a enterocina B (Franz et al., 1999b).

A enterocina I, produzida por *E. faecium* 6T1a foi isolado de azeitonas verdes fermentadas. Esta enterocina apresentou atividade contra a microbiota presente na fermentação da azeitona, incluindo *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Propionibacterium* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *E. faecalis*, *Listeria innocua* e *L. monocytogenes*. As bactérias Gram-negativas testadas (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp.) não foram inibidas pela enterocina I (Floriano et al., 1998).

O *E. mundtii* NFrl 7393, isolado de silagem produz a munditocina, que apresentou atividade antimicrobiana contra espécies de *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, sendo que as bactérias Gram-negativas foram resistentes a este enterocina. A munditocina foi estável a altas temperaturas e em amplas faixas de pH (Kawamoto et al., 2002).

Outro tipo de bacteriocina produzida por cepas de *E. faecalis* é a hemolisina/bacteriocina, que consiste de duas subunidades com ambas as atividades hemolítica e bactericida. Estas bacteriocinas são chamadas citolisinas e contém os resíduos lantionina e β -metil lantionina, sugerindo que pertençam à classe I (lantibióticos) das bacteriocinas (Franz et al., 1999b; Booth et al., 1996). Entretanto, ela difere dos lantibióticos por apresentar atividade em células eucarióticas. Com base na caracterização molecular desta bacteriocina

sugere-se que as atividades hemolítica e bactericida são atribuídas à mesma substância, por esta razão foi adotado o termo citolisina (Booth et al., 1996).

Cintas et al. (1998) identificaram uma bacteriocina não modificada com 2 componentes em *E. faecium* L50 (enterocina L50 A e L50 B). Nesta bacteriocina faltam algumas características da classe II e apresentam muitas características do pequeno grupo dos peptídeos citolíticos secretados por alguns estafilococos. Neste trabalho os autores concluíram que estas enterocinas pertencem a uma nova classe de bacteriocinas produzidas por BAL. A cepa de *E. faecium* L50, quando incubada a temperaturas entre 16°C e 25°C produz as enterocinas L50 A e L50 B, mas em temperaturas mais altas, entre 37°C e 47°C produz as enterocinas P, previamente identificada na cepa de *E. faecium* P13 e uma nova enterocina chamada de Q (Cintas et al., 2000).

Muitas enterocinas têm sido identificadas e purificadas, mas a falta da caracterização bioquímica e molecular inviabiliza a sua aplicação como biopreservante de alimentos. Além das enterocinas citadas anteriormente muitas outras estão sendo estudadas, alguns exemplos são: as enterocinas 1071A e 1071B produzida por *E. faecalis* BFE 1071 isolado de fezes de suínos (Balla et al., 2000); enterocina 4 produzida por *E. faecalis* FAIR-E 309 (Joosten et al., 1996); enterocina CCM4231 produzida por *E. faecium* CCM4231 (Lauková e Czikková, 1998); enterocina CRL35 produzida por *E. faecium* isolado de queijo (Minahk et al., 2000); enterocina RZS C5 produzida por *E. faecium* RZS C5, também isolado de queijo (Leroy e De Vuyst, 2002) e a enterocina ON-157 produzida pelo *E. faecium* NIAI 157 isolado de vegetais (Ohmomo et al., 2000).

O uso de bacteriocinas ou BAL produtoras de bacteriocinas para o controle de enterococos em alimentos não tem sido estudado. Enterocinas que são ativas contra uma ampla faixa de outros enterococos podem ser utilizadas para o controle destas bactérias. Os genes necessários para a produção da enterocina podem ser transferidos para outras BAL usadas como cultura “starter” e que sejam reconhecidas como seguras (GRAS). Deste modo, o crescimento de enterococos pode ser inibido pela enterocina produzida por um hospedeiro heterólogo e, com isso, a transmissão de enterococos potencialmente patogênicos em alimentos pode ser reduzida (Sabia et al., 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura e soluções utilizados na parte prática desta dissertação estão descritos nos Apêndices 8.1 a 8.4 .

3.2 Cepas de *Enterococcus* spp.

Na realização deste trabalho foram utilizadas cepas de *Enterococcus* de cinco espécies: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. hirae* e *E. dispar* provenientes de amostras de água superficial, fezes de humanos e fezes de suínos. As cepas pertencem à Coleção de bactérias do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo isoladas e identificadas em estudos prévios (Valar, 2002; Fuentesfria, 2004) e estocadas em caldo BHI (8.1.1) com 15% de glicerol à -20°C. As cepas estão distribuídas nas cinco espécies e três origens amostrais como mostrado na Tabela 1.

TABELA 1 – Número de cepas de *Enterococcus* spp. utilizadas neste trabalho distribuídas quanto à espécie e local de origem.

	ÁGUA ¹	FEZES DE HUMANOS ²	FEZES DE SUÍNOS ³	TOTAL
<i>E. faecalis</i>	29	74	48	151
<i>E. faecium</i>	25	22	35	82
<i>E. mundtii</i>	5	15	50	70
<i>E. hirae</i>	22	4	9	35
<i>E. dispar</i>	6	0	8	14
TOTAL	87	115	150	352

¹ – Amostras de água coletadas na Microbacia Hidrográfica do Arroio Feijó – RS.

² – Amostras provenientes de um laboratório de análises clínicas hospitalar de Passo Fundo - RS.

³ – Amostras de fezes de suínos coletadas na Região do Vale do Taquari e em granjas da Restinga – região da Grande Porto Alegre – RS.

3.3 Recuperação das amostras e manutenção das culturas bacterianas

As cepas mantidas em glicerol foram reavivadas em 2 mL de caldo BHI (8.1.1) e incubadas a 37°C por 24 horas. Para verificar se as culturas estavam puras realizou-se isolamento em placas contendo ágar TSA (8.1.2) e coloração de Gram.

Foram realizados repiques para a manutenção das culturas puras em tubos contendo ágar TSA inclinado (8.1.2). As cepas também foram mantidas estocadas em caldo BHI (8.1.1) com 15% de glicerol a – 20°C.

3.4 Triagem das cepas produtoras de enterocinas

Com as 352 cepas foram realizados testes para detectar quais apresentavam atividade antimicrobiana. Para isto foi utilizada a técnica de dupla camada segundo Tagg et al. (1971), utilizando cinco bactérias

indicadoras: *Listeria innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. welshimeri* DMIC/UFRGS, *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 e *Micrococcus luteus* ATCC 4698. As três espécies de *Listeria* foram escolhidas por este gênero ser considerado o mais sensível as enterocinas. As espécies *Corynebacterium fimi* e *Micrococcus luteus* foram escolhidas por serem sensíveis a todas bacteriocinas já testadas (Oliveira et al., 1998). Na técnica de dupla camada as cepas de enterococos são semeadas em picada numa placa contendo ágar TSA (8.1.2) e incubadas em estufa por 24 horas a 35°C. Após o período de incubação foi vertida uma segunda camada de ágar TSA semi-sólido (0,7% de ágar) previamente inoculada com a bactéria indicadora na concentração de 10⁶ células/mL (utilizando a escala de Mac Farland). A placa foi novamente incubada em estufa a 35°C por 24 horas e após, verificada a presença de halos de inibição.

As cepas que não apresentaram atividade contra pelo menos uma das cinco bactérias indicadoras testadas foram descartadas dos testes de produção de enterocinas.

3.5 Teste de produção de peróxido de hidrogênio

Este teste foi realizado segundo Lewus et al. (1991), para se verificar a produção de peróxido de hidrogênio com o objetivo de descartar a possibilidade da inibição detectada no teste de dupla camada (3.4) ser devido à sua produção pelos *Enterococcus* spp. As cepas de enterococos foram semeadas em picada em placas contendo ágar TSA (8.1.2) e em seguida foi vertida uma segunda camada de ágar TSA semi-sólido previamente inoculada com 10⁶ células/mL de *Listeria innocua* ATCC 33090 (utilizando escala de Mac

Farland). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil) por 24 horas em estufa a 35°C. Após este período foi verificada a presença de halos de inibição, as cepas que não apresentaram halos em anaerobiose foram consideradas como produtoras de peróxido de hidrogênio e descartadas dos testes de produção de enterocinas.

3.6 Teste de detecção de bacteriófago lítico

Com as cepas que apresentaram resultado positivo para o teste de atividade antimicrobiana e negativo para produção de peróxido de hidrogênio, foi realizado o teste de detecção de bacteriófago utilizando a técnica descrita por Lewus et al. (1991), com o objetivo de eliminar a possibilidade da inibição ser causada por este fator e não pela produção de enterocinas.

Para detectar a presença do bacteriófago, uma porção de ágar da zona clara de inibição (obtida no teste de dupla camada) é cortada em condições estéreis. Este pedaço de ágar é colocado em 3 mL de caldo TSB (8.1.2) e macerado com bastão de vidro estéril. A mistura é mantida a temperatura ambiente por uma hora. Em ágar TSA semi-sólido são inoculados 100 µL da bactéria indicadora *L. innocua* ATCC 33090, crescida até a concentração de 10^6 em caldo TSB (8.1.2), e 200 µL do TSB contendo o pedaço de ágar macerado. Este ágar semi-sólido é vertido em placa estéril e incubado em estufa a 35°C por 24 horas. A formação de halos de lise celular é indicativo da presença de bacteriófagos.

3.7 Obtenção do sobrenadante de cultura

As cepas que apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos uma das cinco indicadoras testadas e tiveram resultado negativo para os teste de peróxido de hidrogênio e bacteriófago foram utilizadas para a preparação do sobrenadante livre de células.

3.7.1 Preparação do pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado em balões de vidro de 50 mL contendo 10 mL de caldo MRS (8.1.3) e inoculados com 20 μ L da cultura de enterococos estocada em glicerol. Os balões foram incubados por 24 horas a 35°C com agitação constante (100 rpm).

3.7.2 Obtenção do sobrenadante livre de células

Uma alíquota do pré-inóculo na concentração de 10^7 células/mL foi transferida para um balão de 250 mL contendo 35 ml de caldo MRS (8.1.3). Os balões foram incubados por 18 horas a 35°C sob agitação constante (100 rpm). Posteriormente, o pH da cultura foi ajustado em 6,2 com NaOH 1M e a mesma centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi esterilizado por filtração em membrana de ésteres mistos com poro de 0,22 μ m, Schleicher & Schuell. O sobrenadante livre de células foi armazenado à – 20°C para a realização dos testes.

3.8 Teste de atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células

Para verificar a atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células foi utilizada a técnica de difusão em poços. Em placas contendo uma fina camada de ágar TSA (8.1.2) de volume definido, foram fixadas ponteiras de 1000 μL (Figura 1a). Sobre esta placa com as ponteiras fixadas foi vertida uma segunda camada de 10 mL de ágar TSA semi-sólido, previamente inoculada com a bactéria indicadora *L. innocua* ATCC 33090 na concentração de 10^6 células/mL (Figura 1b). Depois de solidificado o ágar TSA semi-sólido, as ponteiras foram retiradas. Em cada poço formado, foram adicionados 80 μL do sobrenadante livre de células (Figura 1c). Todo procedimento é realizado em câmara de fluxo laminar. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 18 horas. Posteriormente, era verificada a formação de halo de inibição. As cepas que apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante foram consideradas possíveis produtoras de enterocinas e foram realizados os testes de caracterização das enterocinas produzidas.

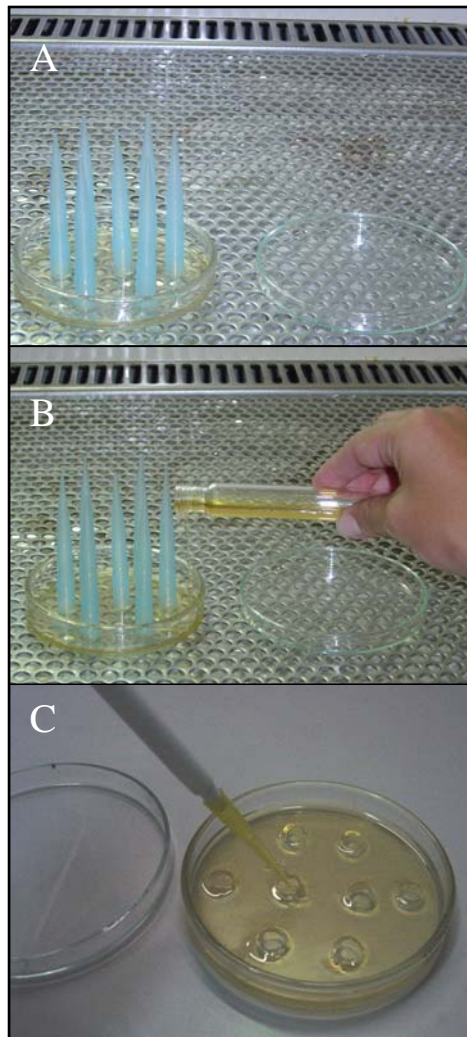


Figura 1 – Técnica de difusão em poços: a) as ponteiras são fixadas em uma fina camada de ágar TSA; b) sobre a placa com as ponteiras, é vertida uma segunda camada de ágar TSA semi-sólido com o microrganismo indicador; c) o sobrenadante é adicionado nos poços.

3.9 Determinação do espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células

3.9.1 Microrganismos indicadores

Os microrganismos indicadores escolhidos para a determinação do espectro de atividade antimicrobiana das enterocinas, foram principalmente

provenientes de isolados clínicos, água, solo, alimentos e bactérias padrão (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação das culturas indicadoras utilizadas no teste de espectro de atividade antimicrobiana realizado com o sobrenadante livre de células produtor de enterocinas, meios de cultura utilizados para cada microrganismo indicador e a temperatura de crescimento.

Culturas Indicadoras	Meios de Cultura	Temperatura (°C)
Gram Positivas		
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	TSA	35°C
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	TSA	35°C
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	TSA	35°C
<i>L. ivanovii</i> DMIC-UFRGS	TSA	35°C
<i>L. seeligeri</i> DMIC-UFRGS	TSA	35°C
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 10012	MRS	35°C
<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	MRS	35°C
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33018	TSA	35°C
<i>B. cereus</i> ATCC 33019	TSA	35°C
<i>B. subtilis</i> ATCC 23856	TSA	35°C
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659	TSA	35°C
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	TSA	35°C
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	TSA	35°C
<i>Paenibacillus peoriae</i> (solo)	TSA	35°C
<i>P. validus</i> (água)	TSA	35°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12692	TSA	35°C
Gram Negativas		
<i>Salmonella</i> Enteritidis (alimento)	TSA	35°C
<i>S. Enteritidis</i> DMIC-UFRGS	TSA	35°C
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	TSA	35°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23229	TSA	35°C
<i>E. coli</i> ATCC 25922	TSA	35°C
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	TSA	35°C
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 15175	TSA	35°C
<i>P. fluorescens</i> DMIC-UFRGS	TSA	35°C
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	TSA	35°C
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	TSA	35°C
<i>Xanthomonas anoxopodis</i> ATCC 8718	TSA	35°C
<i>Shigella sonnei</i> DMIC-UFRGS	TSA	35°C
Leveduras		
<i>Candida tropicalis</i> (clínico)	Sabourad	25°C
<i>C. albicans</i> (clínico)	Sabourad	25°C
Fungos Filamentosos		
<i>Aspergillus fumigatus</i> (arroz)	PDA	25°C
<i>A. orizae</i> (arroz)	PDA	25°C

DMIC-UFRGS – Coleção do Departamento de Microbiologia da UFRGS.

3.9.2 Determinação do espectro de atividade

Para realizar este teste foram preparadas culturas das bactérias indicadoras na concentração de 10^6 células/mL (segundo escala de Mac Farland). As bactérias indicadoras foram crescidas nos meios de cultura e temperaturas ideais por 24 horas. A atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células contra as bactérias indicadoras citadas na Tabela 2, foram avaliadas utilizando a técnica de difusão em poços descrita no item 3.8. Após a incubação das placas por 18 horas os halos de inibição formados eram foram medidos em milímetros. Todos os testes foram realizados em duplicata com três sobrenadantes diferentes.

3.9.3 Teste de inibição cruzada

Com as cepas de *Enterococcus* spp. que produziram enterocinas foi realizado o teste de inibição cruzada. Os sobrenadantes livre de células com atividade antimicrobiana foram testados contra as cepas produtoras. Para este teste foi realizada a técnica de difusão em poços (3.8) utilizando os sobrenadantes livre de células contra as cepas de *Enterococcus* spp. na concentração de 10^6 células/mL. As placas foram incubadas a 35°C por 18 horas.

3.10 Quantificação da atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células

A quantificação da atividade antimicrobiana foi determinada em Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/mL). Para isto foram realizadas diluições sucessivas do sobrenadante na proporção 1:1 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64)

em PBS (8.1.5). A determinação foi realizada utilizando a técnica de difusão em poços (3.8), com a bactéria indicadora, *L. innocua* ATCC 33090, na concentração de 10^6 células/mL. Alíquotas de 80 μ L destas diluições e do sobrenadante sem diluição (bruto) foram inoculadas nos poços. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 18 horas, posteriormente foram medidos em milímetros, os halos de inibição formados. Todos os testes foram realizados em duplicata com três sobrenadantes diferentes. O título designado como Unidade Arbitrária (UA/mL) foi definido como a recíproca da maior diluição que apresentou um halo de inibição maior que 2 mm (Kawamoto et al., 2002).

3.11 Manutenção da atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células

O sobrenadante livre de células (obtido no item 3.7) foi testado quanto à sua estabilidade frente a tratamento térmico, variações do pH, armazenamento sob refrigeração e a -20°C e enzimas proteolíticas, com o objetivo de caracterizar e determinar a natureza da substância antimicrobiana.

3.11.1 Estabilidade ao tratamento térmico

Alíquotas do sobrenadante livre de células (200 μ L) foram incubadas nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C em banho maria por 30 minutos e a 121°C (autoclave) por 10 e 20 minutos. Após os tratamentos a atividade remanescente foi determinada, utilizando a técnica de difusão em poços (item 3.8) com a indicadora *L. innocua* ATCC 33090, na concentração de 10^6 células/mL. Alíquotas de 80 μ L dos sobrenadantes após o tratamento foram inoculadas nos poços e um controle do sobrenadante sem tratamento térmico

também foi incubado, com o objetivo de se determinar a atividade antimicrobiana residual para cada temperatura. As placas foram incubadas por 18 horas em estufa à 35°C, os halos de inibição formados foram medidos em milímetros. Cada experimento foi realizado em duplicata com três sobrenadantes diferentes. A fórmula utilizada para calcular a atividade residual em porcentagem foi (Cladera-Oliveira, 2004):

$$\text{A.R. (\%)} = \frac{H_T - 9}{H_C - 9} \times 100$$

Sendo: H_T = Halo do sobrenadante após tratamento (mm)

H_C = Halo do controle (mm)

A.R. = Atividade Residual

9 = tamanho do poço

3.11.2 Estabilidade do sobrenadante livre de células frente à variação de pH

O sobrenadante livre de células foi incubado nos pHs entre 2 e 10. Em tubos estéreis uma alíquota de 200 µL do sobrenadante livre de células foi adicionada a 200 µL de tampão, os tubos foram incubados a 35°C por 2 horas em banho maria. Os tampões utilizados foram: tampão glicina para os pHs 2 e 3; tampão citrato para os pHs 4 e 5; tampão fosfato para os pHs de 6 a 8 e tampão Tris para os pHs 9 e 10, todos numa concentração de 0,25 M. Após o período de incubação foi realizado o teste de difusão em poços (3.8) com os sobrenadantes nos diferentes pHs, como bactéria indicadora foi utilizada *L. innocua* ATCC 33090. Para este teste foram preparados controles com 200 µL

do sobrenadante livre de células e mais 200 μ L de PBS (8.1.5), para o cálculo da atividade residual. Também foi realizado um controle incubando apenas os tampões de pH com a bactéria indicadora, para verificar se estes não provocavam inibição. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 18 horas, os halos de inibição foram medidos em milímetros. Os testes foram realizados em duplicata com três sobrenadantes diferentes.

3.11.3 Manutenção da atividade antimicrobiana sob refrigeração e congelamento

Alíquotas das triplicatas dos 18 sobrenadantes livre de células foram estocadas por dois meses sob refrigeração (4°C) e congelamento (-20°C). Em intervalos de 15 dias foi determinada a atividade antimicrobiana em UA/mL (3.10) dos sobrenadantes, estes testes foram realizados em duplicata utilizando a técnica de difusão em poços com a bactéria indicadora *L. innocua* ATCC 33090. As placas foram incubadas por 18 horas a 35°C.

3.11.4 Suscetibilidade a enzimas proteolíticas

Para o teste de suscetibilidade da enterocina a enzimas proteolíticas, uma alíquota do sobrenadante livre de células foi tratada com as enzimas: tripsina, proteinase K e lisozima nas concentrações finais de 0,1 mg/mL e 1 mg/mL. Estas foram incubadas durante 2 horas na temperatura ideal de cada protease. Após incubação os sobrenadantes tratados com as enzimas foram submetidos a 80°C por 10 minutos para inativação das proteases. Foram preparados tubos controle da protease e PBS (8.1.5), sobrenadante livre de células incubado a 80°C e sem aquecimento.

Para verificar a atividade antimicrobiana foi realizado o teste de difusão em poços com *L. innocua* ATCC 33090, como bactéria indicadora na concentração de 10^6 células/mL, as placas foram incubadas a 35°C por 18 horas.

3.12 Fatores de virulência

Com as cepas que apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células foram realizados testes para verificar a presença de fatores de virulência como produção de adesinas, hemolisina, gelatinase e cápsula.

3.12.1 Produção de adesinas

As cepas foram crescidas em ágar m-Enterococos (8.1.4) à 37°C por 24 horas. Em uma lâmina de microscópio, foi adicionada uma gota de solução de eritrócitos a 1% em PBS (8.1.5) mais uma alçada de células bacterianas. Em seguida foi feita visualização ao microscópio em um aumento de 100 x, para observar o aparecimento de grumos de eritrócitos em cepas que apresentavam produção de adesinas. Controle negativo utilizado foi a solução de eritrócitos sem células bacterianas.

3.12.2 Hemolisina

As cepas foram semeadas em estria e picada em ágar Columbia suplementado com 5% de sangue humano. As placas depois de semeadas foram incubadas à 37°C por 24 horas. Após a incubação, a atividade citolítica

foi observada através da α ou β - hemólise ao redor das colônias bacterianas (Ike et al., 1987; Elsner et al., 2000).

3.12.3 Gelatinase

A atividade da enzima gelatinase foi detectada usando ágar TSA suplementado com 3% de gelatina. As cepas foram semeadas e as placas incubadas por 48 horas à 37°C. A formação de um precipitado branco opaco ao redor do crescimento bacteriano caracteriza a degradação da gelatina, sendo considerado resultado positivo (Elsner et al., 2000).

3.12.4 Coloração de cápsula

Neste teste descrito por Seeley et al. (1991), as bactérias foram primeiramente cultivadas em caldo TSB (8.1.2). Posteriormente foi feito um esfregaço, utilizando 2 gotas da solução de vermelho congo e duas gotas de suspensão de bactérias. Após secar em temperatura ambiente, foram adicionadas algumas gotas de solução de Maneval por um minuto. O resultado foi observado ao microscópio ótico. Nas bactérias que apresentavam cápsula, verificou-se um fundo azul escuro, a cápsula sem coloração e as células bacterianas vermelhas.

3.13 Curva de produção de enterocinas

As cepas produtoras de enterocinas que apresentaram uma melhor atividade antimicrobiana e foram mais estáveis ao aquecimento e alterações de pH, foram escolhidas para realização da curva de crescimento microbiano e produção de enterocinas.

3.13.1 Preparação do pré-inóculo

As cepas produtoras de enterocinas foram semeadas em balões de 50 mL contendo 10 mL de caldo MRS (8.1.3) e incubadas por 18 horas a 35°C sob agitação constante de 100 rpm.

3.13.2 Realização da curva de produção

Em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo MRS (8.1.3) foi inoculado o pré-inóculo na concentração de 10^7 células/mL, este sendo considerado o ponto zero da curva de produção. Alíquotas foram retiradas a cada hora, durante 18 horas de incubação. O crescimento microbiano foi determinado em fotolorímetro na absorbância de 620 nm. Em cada ponto retirado foi determinada a atividade antimicrobiana em UA/mL, conforme item 3.10, e o pH da cultura foi acompanhado com fita universal de pH (MERCK).

3.14 Extração de DNA cromossomal

3.14.1 Preparação das cepas bacterianas para extração do DNA

As cepas da espécie *E. faecium* foram utilizadas para a análise molecular, por serem a espécie onde foram encontrados os genes das enterocinas a serem testadas.

Uma alíquota de 20 µl do estoque de glicerol de cada cepa foi inoculada em balões volumétricos contendo 10 mL de caldo TSB (8.1.2) e incubados por 18 horas a 37°C sob agitação em incubadora Certomat BS-1.

3.14.2 Protocolo para extração de DNA cromossomal

A extração de DNA cromossomal seguiu o protocolo de Gevers et al. (2001), com algumas modificações.

Uma alíquota de 4 mL da cultura previamente crescida em caldo TSB (8.1.2) foi centrifugada a 15500g por 5 minutos (centrifuga Sigma 2K15) em eppendorfs, para obtenção do precipitado de células. Este precipitado foi congelado a -20°C por 24 horas. Após, o precipitado de células foi descongelado e lavado com 1 mL de tampão TES (8.2.12), centrifugado a 15500g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 300µL de tampão STET (8.2.13). Após adicionou-se 75 µL de tampão de lise (8.2.14) e realizou-se incubação a 37°C por 1 hora. Posteriormente, adicionou-se 40 µL de uma solução pré-aquecida (37°C) de 20% SDS (8.2.7). As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 60 segundos e incubadas a 37°C por 10 minutos, seguida de uma incubação de 10 minutos a 65°C. Após o período de incubação adicionou-se 100 µL de tampão TE (8.2.11) e 1 volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (8.2.10 e 8.2.15). Centrifugou-se por 15 minutos a 15500g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o procedimento de extração repetido duas vezes. A fase aquosa foi cuidadosamente misturada com 75 µL de NaCl 5M (8.2.6) e 1 mL de isopropanol (8.2.16). O DNA foi precipitado em gelo por 20 minutos. Após, realizou-se uma centrifugação (20.000 g, 30 minutos, 4°C). Posteriormente, o pellet foi lavado com 100 µL etanol 70% (8.2.17) resfriado em gelo e novamente centrifugado (15500 g, 2 minutos). O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente. O precipitado de DNA foi seco em estufa a 37°C

por 45 minutos e ressuspendido em 30 μ L de TE (8.2.11) (30 minutos a 55°C). Após o período de incubação adicionou-se 1 μ L de RNase (10 mg/mL) (8.2.8) e incubou-se a 37°C por 15 minutos.

3.15 Amplificação dos genes das enterocinas A e B

O gene da enterocina A foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: EntAF – GGTACCACTCATAGTGGA e EntAR – CTGGAATTGCTCCACCTA. O gene da enterocina B foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores: EntBF – GTAAAAGAATTAAGTACG e EntBR – GTATACATTTGCTAACCC (De Vuyst et al., 2002).

As reações foram realizadas em misturas contendo 3,5 mM de $MgCl_2$ (Lab Trade), 0,2 mM de dNTP's (Amersham Biosciences), 1 μ M de cada oligonucleotídeo (Invitrogen), 1U Taq DNA polimerase (Lab Trade), 1x de tampão de reação da Taq polimerase (Lab Trade) e 100 ng de DNA bacteriano em um volume final de reação de 20 μ L.

As reações de amplificação foram realizadas em um aparelho termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C para a enterocina A e 47°C para enterocina B por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e um ciclo final de extensão de 72°C por 8 minutos.

3.16 Análise dos genes das enterocinas A e B amplificados

Os genes das enterocinas A e B amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% (8.3.1), corado com brometo de etídeo. O gel foi analisado sob luz ultravioleta e fotografado em câmera digital Kodak 1D (versão 3.5.2).

3.17 Determinação do peso molecular das enterocinas

O peso molecular das enterocinas foi determinado a partir do sobrenadante livre de células, analisado por eletroforese em SDS-PAGE 16% (8.4.1), segundo Ausubel et al. (1987). Duas alíquotas de cada sobrenadante livre de células foram aplicadas em gel de poliacrilamida, após a eletroforese o gel foi cortado e metade foi corada com Coomassie blue para observação do peso molecular. A outra metade foi lavada com água destilada estéril e colocada sobre uma placa contendo uma fina camada de ágar TSA (8.1.2). Sobre o gel foi vertida uma camada de ágar TSA semi-sólido previamente inoculado com a bactéria indicadora *L. innocua* ATCC 33090. A placa foi incubada durante 18 horas a 35°C para observação de zonas de inibição.

3.18 Análise estatística

Com os dados obtidos em milímetros nos testes de manutenção da atividade antimicrobiana em diferentes pHs e aquecimento foi realizada análise estatística. Foram utilizados para os testes os dados em duplicata para os três sobrenadantes produzidas para cada cepa de *Enterococcus* spp. O teste utilizado foi ANOVA com delineamento fatorial hierárquico e modelo misto com nível de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Triagem das cepas produtoras de enterocinas

Após o teste de triagem com as 352 cepas de *Enterococcus* spp., utilizando o teste de dupla camada com cinco bactérias indicadoras (Figura 2), 175 (50%) cepas apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos uma das bactérias indicadoras (Apêndice 8.5, 8.6 e 8.7). Destes, 87 (25%) cepas eram provenientes de fezes de humanos, 53 (15%) de água e 35 (10%) de fezes de suínos. A espécie *E. faecalis* teve o maior número de cepas positivas na triagem 84 (24%), a segunda espécie *E. faecium* teve aproximadamente a metade 44 cepas (12,5%). As espécies *E. hirae*, *E. mundtii* e *E. dispar* apresentaram 21 (6%), 15 (4%) e 11 (3%) cepas positivas, respectivamente. Na espécie *E. dispar*, 11 das 14 cepas apresentaram atividade antimicrobiana na triagem, enquanto que *E. mundtii* apenas 15 das 70 cepas apresentaram atividade (Tabela 3).

As três espécies do gênero *Listeria* foram às indicadoras mais sensíveis às cepas de *Enterococcus* spp., sendo a *L. innocua* ATCC 33090 a mais sensível para as cepas de fezes de humanos, fezes de suínos e de água,

inibida por 39%. Nenhum padrão de inibição das cinco indicadoras pôde ser determinado quanto à espécie das cepas ou a sua origem.

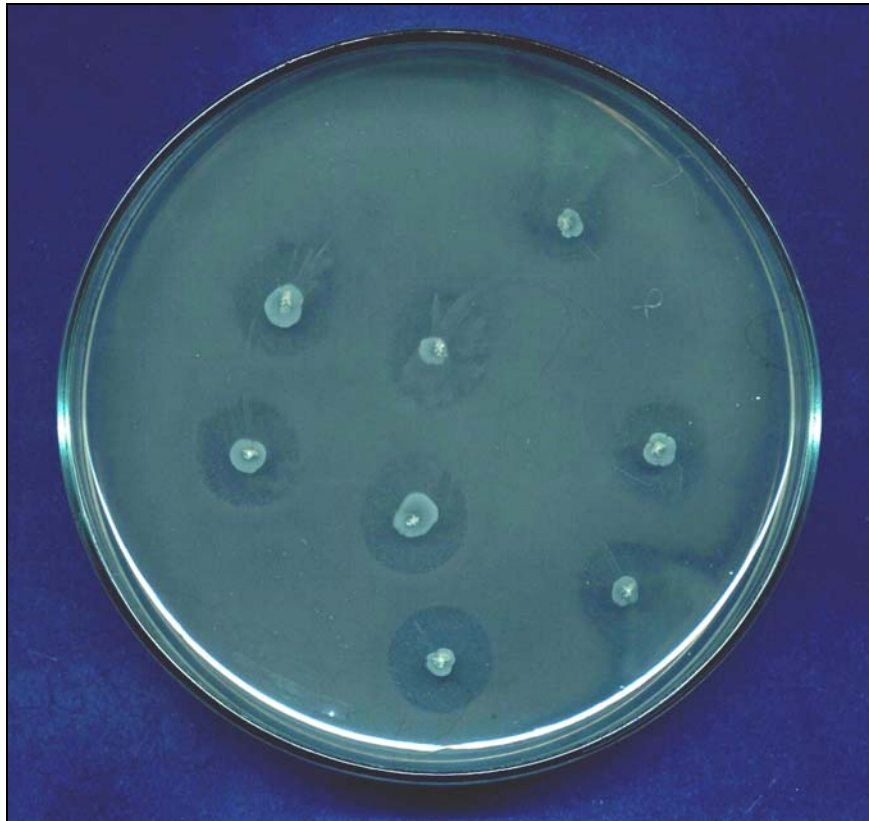


Figura 2 – Resultado da triagem utilizando a técnica de dupla camada com as cepas de *Enterococcus* spp. inoculadas em picada e uma camada da bactéria indicadora *L. innocua* ATCC 33090, com incubação a 35°C por 24 horas.

Nas cepas isoladas de água, as espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. mundtii* não inibiram *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 e *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e 49% das cepas de fezes de suínos e 6 das 7 cepas de *E. mundtii* de fezes de humanos inibiram as cinco bactérias indicadoras.

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram encontrados por Del Campo et al. (2001), onde de 218 cepas de *Enterococcus* spp., isoladas de

diversas origens, foram testadas contra 33 bactérias indicadoras e 102 (46,8%) inibiram pelo menos uma das bactérias indicadoras utilizadas, sendo a maioria de *E. faecalis* (80%) e *E. faecium* (20%). O trabalho realizado por De Vuyst et al. (2002) também encontrou um número alto de isolados positivos para produção de enterocinas. De 426 isolados de *Enterococcus* spp. de diversas origens, utilizando os gêneros *Listeria*, *Clostridium* e *Propionibacterium* como bactérias indicadoras, 122 (29%) apresentaram atividade contra pelo menos uma das indicadoras, sendo 63 de *E. faecium* e 41 de *E. faecalis* e o restante dividido em mais 6 espécies de enterococos.

Em 408 isolados de bactérias ácido lácticas provenientes de azeitonas pretas, apenas 11 (3%) apresentaram atividade antimicrobiana durante a triagem, utilizando as bactérias indicadoras: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (Franz et al., 1996). No trabalho realizado por Sabia et al. (2002) apenas 7,6% dos isolados de *Enterococcus* spp., isolados de salame, apresentaram atividade antimicrobiana contra microrganismos taxonomicamente relacionados. Estes resultados indicam que estudos realizados com *Enterococcus* spp., proveniente de diversas origens, apresentam um maior número de cepas produtoras de bacteriocinas, do que os resultados obtidos em trabalhos realizados com isolados provenientes apenas de alimentos (Du Toit et al., 2000; Del Campo et al., 2001; De Vuyst et al., 2002).

Das 175 cepas positivas na triagem, 88 apresentaram resultado negativo para produção de peróxido de hidrogênio, indicando que a inibição estava sendo causada por outra substância. Destas 88, a maioria era de *E.*

faecalis e *E. faecium* com 39 (44%) e 24 (27%) cepas, respectivamente. *E. mundtii* e *E. hirae* tiveram 8 (9%) cepas cada e 9 (10%) de *E. dispar* (Tabela 3).

No teste para detecção de bacteriófago nenhuma cepa apresentou resultado positivo. Segundo Tagg et al. (1971) o teste de dupla camada realizado na triagem, elimina a possibilidade de inibição por bacteriófago, pelo fato destes microrganismos não serem móveis, não podendo formar halos de inibição na segunda camada de ágar contendo a bactéria indicadora.

Tabela 3 – Número de cepas utilizadas neste trabalho por espécie e origem, resultados obtidos na triagem utilizando as cepas de *Enterococcus* spp. contra 5 bactérias indicadoras e após teste de produção de peróxido de hidrogênio.

Fonte	sp.	Nº Total	Triagem	Peróxido de Hidrogênio*
Fezes de Humanos	<i>E. faecalis</i>	74	60	28
	<i>E. faecium</i>	22	19	10
	<i>E. mundtii</i>	15	7	6
	<i>E. hirae</i>	4	1	1
	<i>E. dispar</i>	0	0	0
	Total		115	87
Fezes de Suínos	<i>E. faecalis</i>	48	12	9
	<i>E. faecium</i>	35	4	3
	<i>E. mundtii</i>	50	4	2
	<i>E. hirae</i>	9	7	7
	<i>E. dispar</i>	8	8	8
	Total		150	35
Água	<i>E. faecalis</i>	29	12	2
	<i>E. faecium</i>	25	21	11
	<i>E. mundtii</i>	5	4	0
	<i>E. hirae</i>	22	13	0
	<i>E. dispar</i>	6	3	1
	Total		87	53
Total		352	175	88

* Número de cepas com resultado negativo para o teste de peróxido de hidrogênio.

4.2 Atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células

Com as 88 cepas que apresentaram resultado negativo no teste de peróxido de hidrogênio, foi preparado o sobrenadante livre de células e verificada a atividade antimicrobiana utilizando a técnica de difusão em poços, com *L. innocua* ATCC 33090 como bactéria indicadora, por esta ser sensível a todas as cepas utilizadas neste teste (Figura 3). Das 88 cepas testadas, 26 apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células, sendo 22 provenientes de amostras de fezes de humanos, duas de fezes de suínos e uma de amostra de água. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* apresentaram o maior número de cepas com 11 e 6, respectivamente (Tabela 4). Estas 26 cepas foram consideradas possíveis produtoras de enterocinas e correspondem a apenas 7% das 352 cepas testadas inicialmente. As outras cepas que não apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células, possivelmente produziram outra substância antimicrobiana que não às enterocinas, durante a triagem.

O baixo número de cepas consideradas produtoras de enterocinas neste estudo é bastante semelhante aos valores encontrados em outros trabalhos. Du Toit et al. (2000) testou o sobrenadante livre de células de 92 cepas de *Enterococcus* spp., destas 7 (7,6%) eram produtoras de enterocinas. Jennes et al., (2000) em estudo realizado com 77 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas do trato gastrointestinal de avestruz, apenas 3 (4%) apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células, inibindo cepas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* e *Salmonella*.



Figura 3 – Ensaio mostrando os halos de inibição obtidos no teste de difusão em poços com os sobrenadante livre de células utilizando *L. innocua* ATCC 33090 como bactéria indicadora, com incubação de 35°C por 18 horas.

No trabalho realizado por De Vuyst et al. (2002) dos 122 isolados selecionados na triagem foram preparados sobrenadantes livres de células e testados contra 52 bactérias indicadoras. Destes, 50 cepas não produziram bacteriocinas e 62 apresentaram atividade antimicrobiana, correspondendo a 14% dos 426 isolados que foram utilizados neste trabalho. As espécies encontradas em maior número neste trabalho também foram *E. faecalis* (68%) e *E. faecium* (58%).

Tabela 4 – Lista das 26 cepas de *Enterococcus* spp. com atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células.

ESPÉCIE	CEPA	ORIGEM
<i>E. faecalis</i> *	17	fezes de humanos
<i>E. faecalis</i>	19	fezes de humanos
<i>E. faecalis</i>	24	fezes de humanos
<i>E. faecalis</i>	27	fezes de humanos
<i>E. faecalis</i>	28	fezes de humanos
<i>E. faecalis</i>	43	fezes de humanos
<i>E. faecalis</i>	45	fezes de humanos
<i>E. faecalis</i>	56	fezes de humanos
<i>E. faecalis</i>	101	fezes de humanos
<i>E. faecalis</i>	119	fezes de humanos
<i>E. faecalis</i>	126	fezes de humanos
<i>E. faecium</i>	6	fezes de humanos
<i>E. faecium</i>	12	fezes de humanos
<i>E. faecium</i>	40	fezes de humanos
<i>E. faecium</i>	65	fezes de humanos
<i>E. faecium</i>	69	fezes de humanos
<i>E. faecium</i>	70	fezes de humanos
<i>E. mundtii</i>	4	fezes de humanos
<i>E. mundtii</i>	5	fezes de humanos
<i>E. mundtii</i>	39	fezes de humanos
<i>E. mundtii</i>	42	fezes de humanos
<i>E. mundtii</i>	115	fezes de humanos
<i>E. dispar</i>	48	fezes de suínos
<i>E. dispar</i>	55	fezes de suínos
<i>E. dispar</i>	76	água
<i>E. hirae</i>	81	fezes de humanos

* As cepas marcadas em cinza são as 18 que mantiveram a atividade antimicrobiana nos novos sobrenadantes livre de células.

Novos sobrenadantes livres de células das 26 cepas foram preparados em maior volume, para a caracterização das enterocinas produzidas. Das 26 cepas, apenas 18 (5% das 352 cepas testadas) mantiveram a atividade antimicrobiana nos novos sobrenadantes, destas 9 eram de *E. faecalis*, 5 de *E. faecium* e 4 de *E. mundtii*, todos provenientes de fezes de humanos (Tabela 4). As condições de crescimento para a produção

dos novos sobrenadantes livre de células foram mantidas, apenas foi alterado o volume do meio de cultura, porém o pré-inóculo foi calculado para manter o mesmo número de células iniciais (10^7 células/mL) e o tamanho do frasco aumentou proporcionalmente ao volume de meio para não alterar a aeração da cultura. Para os testes de caracterização da enterocina foram utilizados os 18 sobrenadantes livre de célula que mantiveram sua atividade. As espécies *E. hirae* e *E. dispar* não foram analisadas.

4.3 Determinação do espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células

Para determinar o espectro de atividade antimicrobiana dos sobrenadantes livres de células foram realizados testes utilizando a técnica de difusão em poços contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos.

Todos os sobrenadantes apresentaram atividade antimicrobiana contra as 4 espécies de *Listeria* testadas (Tabela 5). A maioria dos sobrenadantes apresentou uma forte atividade antimicrobiana com halos de inibição maiores que 7 milímetros nas espécies *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*, apenas a espécie *L. seeligeri* apresentou halos de inibição menores.

As bacteriocinas da classe IIa caracterizam-se pela sua forte atividade anti-listeriana (Ennahar et al., 2000) e grande parte das enterocinas caracterizadas até o momento pertence a esta classe. Vários trabalhos realizados com enterocinas demonstram esta habilidade de inibir o crescimento

de bactérias do gênero *Listeria* (Torri Tarelli et al., 1994; Vlaemynck et al., 1994; Lauková et al., 1999; Aymerich et al., 2000; Kawamoto et al., 2002; Sabia et al., 2003; García et al., 2004), mas o espectro de atividade antimicrobiana contra outros gêneros bacterianos é variável.

A espécie *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 não foi inibida por nenhum sobrenadante, característica de interesse para cepas que podem ser utilizadas como biopreservante em alimentos, pois o gênero *Lactobacillus* é bastante utilizado em fermentações. A espécie *L. plantarum* ATCC 10012 foi inibida pela maioria dos sobrenadantes, mas os halos de inibição foram pequenos, indicando uma fraca atividade sobre esta espécie (Tabela 5). Mareková et al. (2003) caracterizaram uma enterocina produzida por *E. faecium* EK13, isolado de ambiente, que inibiu todas as cepas de *Listeria* sp. testadas e cinco cepas de *Lactobacillus*, incluindo as espécies *L. plantarum* e *L. fermentum* utilizadas neste trabalho.

As enterocinas I (Floriano et al., 1998) e P (Cintas et al., 1997), ambas produzidas por *E. faecium* também inibiram cepas de *L. plantarum* e *L. fermentum*. Já as enterocinas 1071 A e 1071 B, produzidas por *E. faecalis* BFE1071 isoladas de fezes de suínos, não inibiram 6 espécies de *Lactobacillus*, apenas apresentaram atividade contra a espécie *L. salivarius* subsp. *salivarius* (Balla et al., 2000).

5–Espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células das cepas de *Enterococcus*.

		Halos gerados pelos sobrenadantes livre de células das cepas de <i>Enterococcus</i> spp. (mm)																										
Cepas de <i>Enterococcus</i>		17			19			24			27			28			43			45			101			119		
Microrganismo indicador	Sobrenadantes	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Gram Positivas																												
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33018		-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 33019		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 23856		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> ATCC 10012		-	3	4	-	-	-	2	-	2	3	-	3	3	3	3	3	3	3	4	4	5	-	2	-	-	3	4
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313		6	7	7	5	6	6	7	7	7	7	7	6	6	6	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	7	8	7
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112		7	7	8	-	6	6	7	7	7	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	7	7	7	8	8
<i>L. innocua</i> ATCC 33090		11	7,5	5	8	5,5	9	8	9	5	9,5	9,5	8	9,5	8,5	9	10	7	9	8	9	10	8	9	4	6	9	8,5
<i>L. ivanovii</i> DMIC-UFRGS		6	7	7	6	7	6	6	7	6	5	6	7	6	7	7	7	7	6	7	8	8	8	7	6	6	7	7
<i>L. seeligeri</i> DMIC-UFRGS		6	2	5	5	5	8	4	5	5	5	5	5	5	4	6	5	7	6	5	7	7	6	5	5	6	6	7
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus peoriae</i> (solo)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. validus</i> (água)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12692		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram Negativas																												
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 23229		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DMIC-UFRGS		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> ATCC 15175		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis (alimento)		5	4,5	6	4,5	4	5,5	5	5,5	5	5,5	5,5	5	5	4,5	5,5	6	5,5	5,5	5	5	5	5,5	5,5	5,5	5	5	6,5
<i>S. Enteritidis</i> DMIC-UFRGS		6	6	6	6	6	5	7	6	7	6	6	7	7	7	6	7	6	7	7	7	8	6	6	6	6	7	7
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas anoxopodis</i> ATCC 8718		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i> DMIC-UFRGS		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leveduras																												
<i>Candida tropicalis</i> (clínico)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (clínico)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fungos Filamentosos																												
<i>Aspergillus fumigatus</i> (arroz)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i> (arroz)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* halos de inibição medidos em milímetros e resultados negativos (-).

5 continuação–Espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células das cepas de *Enterococcus*.

		Halos gerados pelos sobrenadantes livre de células das cepas de <i>Enterococcus</i> spp. (mm)																										
Cepas de <i>Enterococcus</i>		6			12			40			69			70			5			39			42			115		
Microrganismo indicador	Sobrenadantes	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Gram Positivas																												
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33018		-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 33019		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 23856		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> ATCC 10012		-	-	4	-	3	-	-	4	3	-	3	-	-	-	-	-	3	3	3	2	2	3	2	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313		8	6	8	7	6	7	8	7	7	8	8	8	5	6	5	7	7	7	7	7	6	7	7	7	7	8	8
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112		6	3	8	4	8	6	7	7	7	7	8	8	3	-	2	7	8	7	8	6	7	7	8	8	8	7	6
<i>L. innocua</i> ATCC 33090		10,5	8	9,5	5	4,5	4	8	9	8	9	5	7	9	5,5	6,5	10	6	8	7	8,5	8,5	8	6	8,5	8	4,5	9,5
<i>L. ivanovii</i> DMIC-UFRGS		6	5	8	3	7	7	6	7	6	7	7	7	3	2	4	6	7	6	7	7	7	5	7	7	5	7	6
<i>L. seeligeri</i> DMIC-UFRGS		5	3	5	-	4	4	5	6	5	6	4	5	4	4	5	5	5	6	-	4	4	4	4	7	7	5	8
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus peoriae</i> (solo)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. validus</i> (água)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12692		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram Negativas																												
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 23229		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DMIC-UFRGS		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> ATCC 15175		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis (alimento)		3,5	2	6	2	4,5	5,5	5,5	5	4,5	5,5	5	4,5	4	2	2,5	4,5	5	5,5	5	4,5	4,5	5,5	5	5,5	5	4,5	5
<i>S. Enteritidis</i> DMIC-UFRGS		5	5	8	5	7	7	6	7	7	6	5	6	3	2	2	7	7	7	6	6	8	6	6	8	6	6	6
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas anoxopodis</i> ATCC 8718		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i> DMIC-UFRGS		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leveduras																												
<i>Candida tropicalis</i> (clínico)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (clínico)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fungos Filamentosos																												
<i>Aspergillus fumigatus</i> (arroz)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i> (arroz)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* halos de inibição medidos em milímetros e resultados negativos (-).

A enterocina O12, produzida por *E. gallinarum* inibiu as espécies *L. acidophilus* e *L. sake*, mas não apresentou atividade sobre as espécies *L. plantarum* e *L. fermentum* (Jennes et al., 2000).

No presente estudo nenhuma das quatro cepas do gênero *Bacillus* foi inibida, assim como os gêneros *Paenibacillus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* (Tabela 5). As enterocinas 1071 A e 1071 B não inibiram *B. cereus* nem *S. aureus*, mas apresentaram atividade contra *Micrococcus* sp. (Balla et al., 2000). As enterocinas A e B inibiram três cepas de *S. aureus* (Casaus et al., 1997), a enterocina O12 inibiu a espécie *S. carnosus* e *B. cereus* (Jennes et al., 2000) e a enterocina produzida por *E. faecium* EK13 também apresentou atividade antimicrobiana contra *B. cereus* e contra *S. xylosus* (Mareková et al., 2003). A enterocina P inibiu as espécies *B. cereus* e *Clostridium tyrobutiricum* apenas após a purificação, o sobrenadante desta enterocina não apresentou atividade antimicrobiana contra estas espécies (Cintas et al., 1998).

No teste realizado com *Xanthomonas anoxopodis* ATCC 8718, a cepa testada foi resistente as enterocinas e halos de crescimento da indicadora cresceram ao redor dos poços (Figura 4), indicando que esta espécie poderia estar utilizando compostos do sobrenadante livre de células e as próprias enterocinas para crescer.

A bactéria *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 é considerada como um microrganismo sensível a todas as bacteriocinas testadas (Oliveira et al., 1998). Todavia nos trabalhos relacionados à enterocinas ela é raramente utilizada. No presente estudo nenhum sobrenadante inibiu esta espécie,

entretanto durante a triagem, pelo teste de dupla camada, algumas cepas consideradas produtoras de enterocinas apresentaram atividade antimicrobiana contra esta espécie, possivelmente sendo inibida por outra substância produzida pela bactéria que não a enterocina.



Figura 4 – Teste de difusão em poços com os 18 sobrenadantes e a bactéria indicadora *Xanthomonas anoxopodis* ATCC 8718, incubada a 35°C por 18 horas, mostrando os halos de crescimento da bactéria ao redor dos poços.

Das espécies de bactérias Gram-negativas testadas apenas duas cepas de *Salmonella* Enteritidis foram sensíveis a todos os sobrenadantes, já a espécie *Salmonella* Typhimurium não foi inibida. As bacteriocinas produzidas por BAL se caracterizam por inibir bactérias intimamente relacionadas, por isto geralmente não apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas. As enterocinas produzidas pelas cepas utilizadas neste trabalho podem ser

consideradas de amplo espectro de atividade antimicrobiana pelo fato de inibir o crescimento de *Salmonella* Enteritidis. Poucos trabalhos de caracterização de enterocinas utilizam o gênero *Salmonella* na determinação do espectro de atividade antimicrobiana.

Poucas enterocinas caracterizadas até o momento apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas. Trabalhos realizados por Lauková et al. (1998b, 2000, 2004) caracterizam enterocinas que apresentam atividade antimicrobiana contra o gênero *Salmonella* sp.. A enterocina O12 apresentou atividade antimicrobiana contra *Salmonella* Typhimurium e também contra *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Jennes et al., 2000). Um trabalho realizado com a bacteriocina produzida por *Lactobacillus casei* identificou atividade contra *Salmonella* Typhimurium (Hudault et al., 1997), assim como a substância tipo bacteriocina produzida por *Bacillus licheniformis* P40 que apresentou um amplo espectro de atividade antimicrobiana incluindo bactérias Gram-negativas como *Salmonella gallinarum*, mas não inibiu *S. Enteritidis* (Cladera-Olivera et al., 2004).

Os testes realizados, no presente estudo, com leveduras e fungos demonstraram que as substâncias antimicrobianas produzidas pelas cepas de *Enterococcus* spp. não apresentam atividade contra células eucarióticas. As enterocinas caracterizam-se por não terem atividade contra células eucarióticas, com exceção da citolisina, que é uma enterocina produzida por *E. faecalis* e que apresenta esta atividade.

Comparando o tamanho dos halos obtidos no teste de determinação do espectro antimicrobiano dos 3 sobrenadantes produzidas de cada cepa

(Tabela 5) e a atividade antimicrobiana em UA/mL (Tabela 7), pode-se concluir que o tamanho do halo de inibição encontrado no espectro independe da atividade antimicrobiana encontrada para aquele sobrenadante.

4.4 Teste de inibição cruzada

As cepas produtoras de bacteriocinas caracterizam-se por apresentar imunidade as suas bacteriocinas. Por esta razão foi realizado o teste de inibição cruzada, utilizando a técnica de difusão em poços onde os sobrenadantes foram testados contra as 18 cepas produtoras de enterocinas.

Neste teste nenhum sobrenadante inibiu a sua cepa produtora como mostrado na Tabela 6, demonstrando que todas as cepas apresentam imunidade à enterocina que estão produzindo. Todos os sobrenadantes inibiram a cepa *E. faecium* 70, indicando que esta cepa não apresenta imunidade as enterocinas produzidas pelas outras cepas, somente a sua própria (Figura 5). Apenas o sobrenadante 2 da cepa *E. faecium* 6, não inibiu o sobrenadante 70. Isto se deve, possivelmente, pelo fato deste sobrenadante apresentar apenas a metade da atividade antimicrobiana (UA/mL) encontrada para os outros dois sobrenadantes desta cepa (Tabela 7).

O sobrenadante 1 da cepa *E. faecium* 70 apresentou uma fraca inibição contra as cepas *E. faecalis* 17 e 101 e a *E. mundtii* 39. Isto pode estar relacionado ao fato do sobrenadante 1 ter apresentado uma atividade antimicrobiana alta (800 UA/mL), enquanto que os sobrenadantes 2 e 3 tiveram 200 e 400 UA/mL respectivamente (Tabela 7). Estes resultados obtidos para a enterocina produzida pela cepa *E. faecium* 70 podem indicar que ela esteja produzindo uma enterocina diferente das outras cepas.



Figura 5 – Teste de difusão em poços com a bactéria *Enterococcus faecium* 70 como indicadora, incubada a 35°C por 18 horas, mostrando os halos de inibição formados pelos sobrenadantes livre de células.

Os três sobrenadantes da cepa *E. mundtii* 115 inibiram todas as cepas de *E. faecium*, seis de *E. faecalis* (17, 24, 27, 28, 101 e 119) e duas cepas de *E. mundtii* (5 e 39) (Tabela 6).

Pode-se concluir, a partir destes dados, que a cepa 115 está produzindo uma enterocina diferente das produzidas pelas outras cepas, uma vez que estas não apresentam imunidade. Na espécie *E. mundtii* as cepas 5 e 39 foram inibidas pelo sobrenadante 115, indicando que este produz uma enterocina diferente, mas o fato da cepa 115 não ser inibida pelos sobrenadantes 5 e 39, indica que a mesma apresenta imunidade a eles, podendo apresentar mais de uma enterocina.

Tabela 6 – Resultados do teste de inibição cruzada entre os sobrenadantes livre de células e as cepas produtoras.

Espécie	SOBRENADANTES	Cepas de <i>Enterococcus</i>																	
		<i>E. faecalis</i> 17H	<i>E. faecalis</i> 19H	<i>E. faecalis</i> 24H	<i>E. faecalis</i> 27H	<i>E. faecalis</i> 28H	<i>E. faecalis</i> 43H	<i>E. faecalis</i> 45H	<i>E. faecalis</i> 101H	<i>E. faecalis</i> 119H	<i>E. faecium</i> 6H	<i>E. faecium</i> 12H	<i>E. faecium</i> 40H	<i>E. faecium</i> 69H	<i>E. faecium</i> 70H	<i>E. mundtii</i> 5H	<i>E. mundtii</i> 39H	<i>E. mundtii</i> 42H	<i>E. mundtii</i> 115H
<i>E. faecalis</i>	17	1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8**	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
	19	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-
	24	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
	27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
	28	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-
43	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
45	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
101	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
119	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
<i>E. faecium</i>	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
	12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
	40	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
69	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-		
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-		
70	1	3	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	4	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. mundtii</i>	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
	39	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	
	42	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	
115	1	4	-	4	5	4	-	-	5	4	5	3	5	6	4	4	-	-	
	2	4	-	4	3	4	-	-	5	4	5	4	5	6	5	4	-	-	
	3	4	-	4	3	5	-	-	5	4	5	3	5	7	5	4	-	-	

* 1, 2 e 3 – Repetições dos sobrenadantes livre de células para cada cepa produtora.

** Halo de inibição em mm.

4.5 Quantificação da atividade antimicrobiana

Foram realizadas diluições com os sobrenadantes livre de células, para determinar a atividade antimicrobiana em Unidades Arbitrárias (UA/mL) (Figura 6). A UA foi definida como a recíproca da maior diluição com halo de inibição maior que 2 mm (Kawamoto et al., 2002). A maior atividade antimicrobiana determinada foi do sobrenadante 1 da cepa *E. faecium* 70, com 800 UA/mL. A menor atividade antimicrobiana foi encontrada no sobrenadante 1 da cepa *E. faecium* 12, com apenas 25 UA/mL (Tabela 7).



Figura 6 – Resultado obtido no teste de determinação da atividade antimicrobiana em UA/mL, mostrando os halos de inibição formados pelo sobrenadante livre de células sem diluição (B) e diluído até 1/64. Foi utilizada técnica de difusão em poços com a bactéria indicadora *L. innocua* ATCC 33090 e incubação a 35°C por 18 horas.

Pode-se se verificar que a mesma cepa, crescida nas mesmas condições, apresentou diferenças na atividade antimicrobiana. Por exemplo, a cepa 70 que no sobrenadante 1 teve uma atividade de 800 UA/mL e nos outros dois sobrenadantes menos da metade deste valor. Este resultado pode ser observado em quase todos sobrenadantes, menos na cepa 69 onde todos os sobrenadantes apresentaram 200 UA/mL de atividade antimicrobiana. Valores de atividade antimicrobiana semelhantes foram encontrados para *E. faecalis* isolado de ambiente que produz uma substância tipo bacteriocina que apresentou 100 UA/mL contra *Listeria monocytogenes*, mas quando testadas contra outras bactérias apresentou diferentes atividades, contra *Enterobacter cloacae* apresentou a maior atividade de 800 UA/mL (Lauková et al., 1998a).

A enterocina produzida por *E. faecium* FAIR-E 198, isolado de queijo apresentou sua maior atividade de 800 UA/mL quando incubado em caldo MRS a 37°C com pH controlado em 6,5 (Sarantinopoulos et al., 2002). Sabia et al. (2004) caracterizaram duas enterocinas produzidas por *E. casseliflavus* e *E. faecalis* isolados de salame Italiano fermentado, onde as atividades antimicrobianas determinadas em UA/mL, foram de 1280 e 620 UA/mL, respectivamente.

Na maioria dos trabalhos realizados com enterocinas a produção é feita em fermentadores em condições controladas, como o pH, por exemplo, que é um fator importante na produção de enterocinas, interferindo na atividade antimicrobiana em UA/mL obtida e determinando qual enterocina vai ser produzida. Nestas condições geralmente os valores de atividade antimicrobiana obtidos são bem superiores ao encontrado neste trabalho. A munditocina

apresentou uma atividade de 6.400 a 12.800 UA/mL quando produzida em fermentador (Kawamoto et al., 2002).

Tabela 7 – Resultados obtidos na quantificação da atividade antimicrobiana em UA/mL das triplicatas dos sobrenadantes livre de células das 18 cepas produtoras de enterocinas, utilizando a técnica de difusão em poços com *L. innocua* ATCC 33090 como bactéria indicadora, incubada a 35°C por 18 horas.

Cepas	SOBRENADANTES		
	1	2	3
<i>E. faecalis</i> 17	400	100	100
<i>E. faecalis</i> 19	100	100	200
<i>E. faecalis</i> 24	400	100	100
<i>E. faecalis</i> 27	100	100	200
<i>E. faecalis</i> 28	200	100	400
<i>E. faecalis</i> 43	200	400	400
<i>E. faecalis</i> 45	200	400	400
<i>E. faecalis</i> 101	400	100	100
<i>E. faecalis</i> 119	200	400	400
<i>E. faecium</i> 6	400	200	400
<i>E. faecium</i> 12	25	100	100
<i>E. faecium</i> 40	200	200	400
<i>E. faecium</i> 69	200	200	200
<i>E. faecium</i> 70	800	200	400
<i>E. mundtii</i> 5	100	100	400
<i>E. mundtii</i> 39	200	200	400
<i>E. mundtii</i> 42	200	200	400
<i>E. mundtii</i> 115	200	400	400

4.6 Estabilidade ao tratamento térmico

Os sobrenadantes livres de células das 18 cepas foram aquecidos de 40 a 100°C, em intervalos de 10°C, por 30 minutos e autoclavados (121°C) por 10 e 20 minutos. Posteriormente foi verificada a atividade antimicrobiana através do halo de inibição formado e cálculo da atividade residual, utilizando a

técnica de difusão em poços com a *L. innocua* ATCC 33090 como bactéria indicadora.

Os sobrenadantes mantiveram sua atividade antimicrobiana estável até 100°C, mantendo em média 80% de atividade e pode-se detectar atividade após 10 minutos na autoclave, por esta razão as enterocinas produzidas por estas cepas podem ser consideradas estáveis ao aquecimento (Tabela 8). A estabilidade ao aquecimento é característico de muitas enterocinas já identificadas (Casaus et al., 1997; Floriano et al., 1998; Balla et al., 2000; Moreno et al., 2002; Sabia et al., 2004).

A Figura 7 mostra a média dos halos de inibição dos 18 sobrenadantes (em triplicata) no controle sem tratamento (0) e com as diferentes temperaturas testadas. Os sobrenadantes perderam gradativamente a atividade até 70°C e mantiveram esta atividade estável até os 100°C. As maiores perdas foram verificadas nas amostras autoclavadas (121°C) por 10 e 20 minutos.

Após 10 minutos a 121°C os sobrenadantes perderam 50% da atividade e os sobrenadantes de *E. faecium* 12 e 70 perderam totalmente a atividade (Tabela 8). A 121°C por 20 minutos, em média 20% da atividade foi mantida em alguns sobrenadantes. As cepas 12, 70 e 40 perderam a atividade nos três sobrenadantes, enquanto que as outras mantiveram atividade em pelo menos um dos três sobrenadantes testados.

Tabela 8 – Resultados obtidos no cálculo da atividade residual em % para os sobrenadantes livre de células após tratamento térmico.

CEPAS	sobrenad.	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C	121°C - 10 min.	121°C - 20 min
<i>E. faecalis</i> 17H	1	89	89	89	74	79	84	79	63	0
	2	93	93	73	73	80	80	80	67	0
	3	60	80	70	70	80	60	90	60	30
<i>E. faecalis</i> 19H	1	93	80	87	80	87	80	80	53	0
	2	80	90	60	60	60	60	70	60	20
	3	100	100	100	57	100	86	64	0	0
<i>E. faecalis</i> 24H	1	100	81	88	63	88	88	69	38	25
	2	82	94	88	88	82	71	88	65	0
	3	91	64	64	64	55	36	91	82	36
<i>E. faecalis</i> 27H	1	100	94	78	78	67	78	56	67	0
	2	81	94	81	75	88	88	75	63	0
	3	100	80	80	70	60	70	60	80	40
<i>E. faecalis</i> 28H	1	82	88	76	82	82	71	82	53	0
	2	82	55	55	55	55	64	82	64	36
	3	88	63	88	63	75	88	69	25	25
<i>E. faecalis</i> 43H	1	95	95	86	77	73	91	73	59	36
	2	88	94	94	88	81	81	69	44	25
	3	94	100	100	81	88	88	88	38	31
<i>E. faecalis</i> 45H	1	94	88	88	76	82	65	71	59	0
	2	80	70	75	60	60	60	55	30	25
	3	89	89	83	61	67	67	72	28	0
<i>E. faecalis</i> 101H	1	82	100	94	65	82	82	71	29	24
	2	81	94	88	69	88	69	75	50	0
	3	80	90	70	60	90	70	90	70	50
<i>E. faecalis</i> 119H	1	94	83	83	72	72	61	78	44	28
	2	81	88	75	50	75	50	69	63	31
	3	86	76	81	57	67	67	48	43	33
<i>E. faecium</i> 6H	1	91	83	74	74	65	70	70	74	30
	2	85	92	92	85	100	69	77	77	0
	3	87	93	93	93	67	80	60	47	33
<i>E. faecium</i> 12H	1	86	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	90	80	90	90	80	80	80	60	0
	3	100	100	100	100	88	100	100	0	0
<i>E. faecium</i> 40H	1	100	93	93	93	79	71	57	43	0
	2	94	94	89	83	72	78	61	33	0
	3	100	94	94	88	75	69	63	31	0
<i>E. faecium</i> 69H	1	100	95	90	90	65	75	75	75	0
	2	100	93	93	57	64	71	86	57	36
	3	83	58	67	50	50	58	67	58	17
<i>E. faecium</i> 70H	1	88	94	88	76	94	76	76	0	0
	2	109	91	91	73	82	64	55	27	0
	3	92	62	54	62	92	69	77	0	0
<i>E. mundtii</i> 5H	1	91	86	73	73	73	86	82	68	41
	2	94	88	81	75	75	75	81	50	50
	3	100	100	81	63	94	88	94	75	69
<i>E. mundtii</i> 39H	1	93	86	100	86	86	93	57	43	0
	2	50	69	75	81	88	75	100	75	63
	3	50	63	69	63	75	63	81	25	25
<i>E. mundtii</i> 42H	1	88	88	63	63	63	63	81	50	25
	2	86	64	57	43	43	43	50	64	29
	3	64	43	43	43	43	43	50	50	64
<i>E. mundtii</i> 115H	1	96	91	87	87	96	83	78	70	35
	2	92	62	62	54	54	62	85	77	38
	3	100	93	86	86	64	64	79	57	43

A atividade antimicrobiana em UA/mL (Tabela 7) determinada não teve relação direta, na maioria dos sobrenadantes, com a perda de atividade após aquecimento a 121°C por 20 minutos. Apenas os sobrenadantes das cepas *E. faecium* 6 e *E. mundtii* 42 e 115 demonstraram uma perda maior de atividade após aquecimento no sobrenadante que apresentava a menor atividade antimicrobiana em UA/mL.

Foi verificada uma diferença significativa entre os tratamentos testados ($P < 0,05$) como observado na Figura 7 e entre as 18 cepas analisadas ($P < 0,05$).

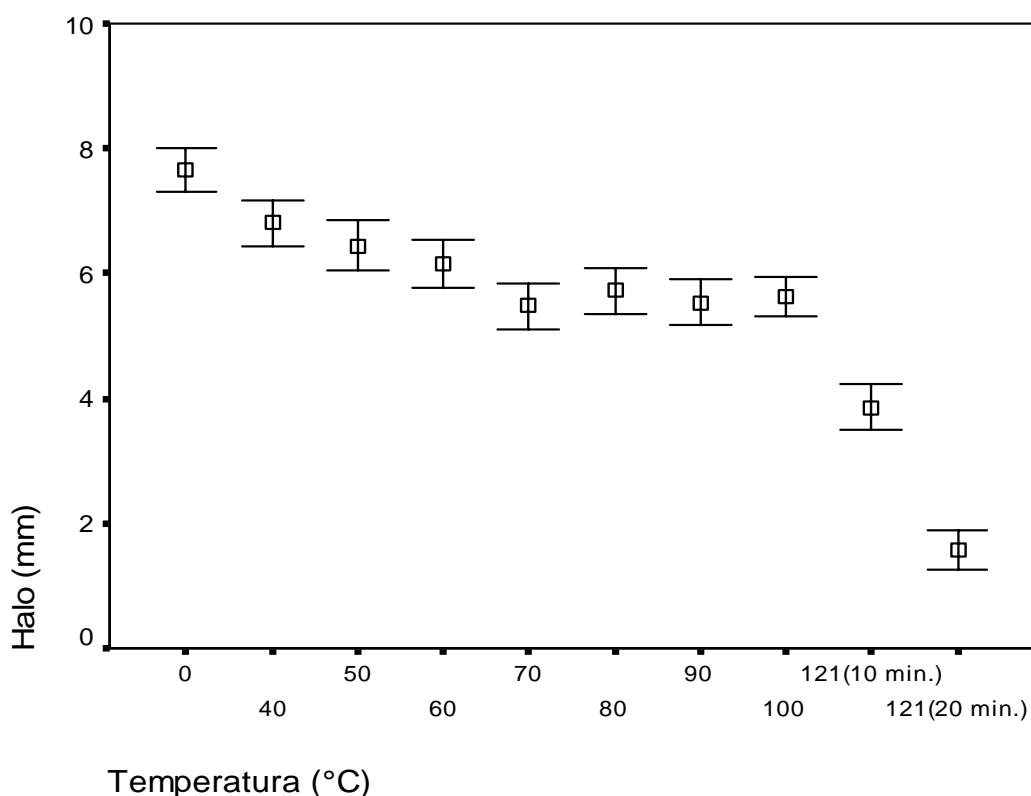


Figura 7 – Resultado da análise de variância utilizando os halos de inibição (mm) obtidos no teste de manutenção da atividade antimicrobiana após tratamento térmico para os 18 sobrenadantes, com um índice de confiança de 95%. Cada ponto representa a média dos halos de inibição de 18 sobrenadantes testados em triplicata e (0) – controle sem tratamento.

A munditicina mantém 50% de sua atividade quando exposta a 100°C (Kawamoto et al., 2002), já a enterocina O12 mantém 75% da atividade após 15 minutos a 121°C, mas a 80°C por 30 minutos perde 50% de sua atividade (Jennes et al., 2000). Além da temperatura em que as enterocinas são expostas, o tempo de exposição é determinante para a manutenção da atividade antimicrobiana.

A Figura 8 mostra a média dos halos de inibição (mm) nos diversos tratamentos para cada espécie analisada, podendo-se observar a diferença encontrada no tamanho dos halos para cada espécie. A espécie *E. mundtii* apresentou os maiores halos, enquanto que *E. faecium* apresentou os menores tamanhos de halo.

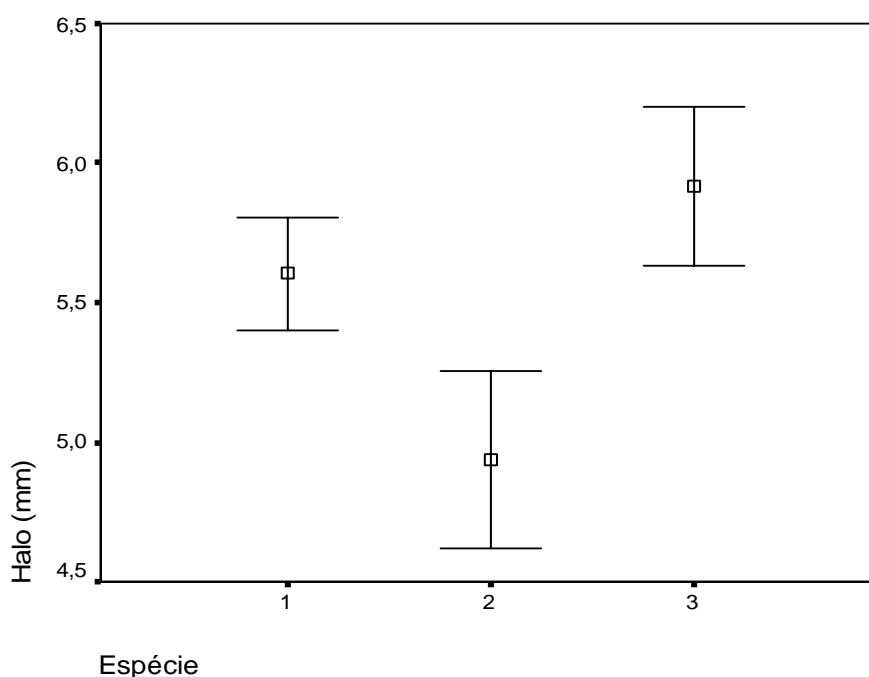


Figura 8 – Resultados da análise de variância, cada ponto representa a média dos halos de inibição em milímetros obtidos no teste de manutenção da atividade antimicrobiana após tratamento térmico para os 18 sobrenadantes testados em triplicata das espécies: 1 – *E. faecalis* (9 sobrenadantes com n = 241), 2- *E. faecium* (5 sobrenadantes com n=135) e 3 – *E. mundtii* (4 sobrenadantes com n=108). Com índice de confiança de 95%.

No teste de estabilidade ao aquecimento pode-se observar uma diferença significativa entre as espécies ($P < 0,05$). As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* ($P < 0,05$) e *E. faecium* e *E. mundtii* ($P < 0,05$) apresentaram diferenças significativas, enquanto que entre as espécies *E. faecalis* e *E. mundtii* não houve diferença significativa ($P = 0,0962$) (Figura 8).

4.7 Estabilidade frente a variações de pH

Os sobrenadantes das 18 cepas tiveram seu pH alterado na faixa de 2 a 10 e foram incubados por 2 horas a 35°C. Após o tratamento foi verificada a atividade antimicrobiana, utilizando a técnica de difusão em poços com a bactéria indicadora *L. innocua* ATCC 33090, através do tamanho do halo de inibição formado e cálculo da atividade residual.

Nenhum sobrenadante perdeu totalmente a atividade antimicrobiana em nenhum dos pHs testados. As maiores perdas foram observadas nos pHs mais ácidos, de 2 a 6, aproximadamente 80% da atividade foi mantida. No pH 7 não houve perda da atividade e nos pHs 8, 9 e 10 as enterocinas mantiveram-se bastante estáveis, com aproximadamente 95% da atividade (Tabela 9).

A diminuição da atividade das enterocinas em pH baixo provavelmente resulta da diminuição da estabilidade da enterocina e uma menor solubilidade no ágar (Franz et al., 1996). Nos pHs mais básicos alguns sobrenadantes apresentaram um halo de inibição maior que o determinado no controle. Vários fatores podem influenciar na difusão das bacteriocinas, como pH, concentração de sal, nitrito, nitrato e gorduras. À distância em que a molécula de bacteriocina pode se difundir para encontrar a célula alvo e a

Tabela 9 – Resultados obtidos no cálculo da atividade residual em % para os sobrenadantes livre de células após exposição a diferentes pHs.

ISOLADOS	sobrenad.	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
<i>E. faecalis</i> 17	1	64	79	93	100	93	86	71	114	100
	2	71	86	100	86	86	86	86	143	129
	3	60	70	60	60	80	90	90	80	90
<i>E. faecalis</i> 19	1	70	60	70	70	80	110	90	100	120
	2	70	90	90	80	70	120	120	80	90
	3	75	75	83	83	92	100	100	100	100
<i>E. faecalis</i> 24	1	92	92	92	92	85	100	100	92	92
	2	100	89	89	89	89	122	122	111	133
	3	89	67	44	78	67	100	111	89	67
<i>E. faecalis</i> 27	1	50	75	60	75	70	100	100	55	65
	2	80	80	60	80	90	110	120	90	120
	3	70	80	80	70	80	100	100	80	80
<i>E. faecalis</i> 28	1	90	100	40	40	80	100	100	110	110
	2	89	78	67	78	78	100	122	122	78
	3	75	83	83	75	92	100	100	117	100
<i>E. faecalis</i> 43	1	100	100	82	88	94	106	100	88	100
	2	75	75	75	81	63	100	88	94	69
	3	67	80	80	80	100	107	93	87	67
<i>E. faecalis</i> 45	1	75	83	58	50	67	100	100	92	108
	2	71	86	86	86	100	100	93	86	86
	3	93	86	86	86	100	86	100	100	86
<i>E. faecalis</i> 101	1	85	77	62	85	92	77	85	92	108
	2	60	70	80	60	70	100	120	110	100
	3	89	89	89	78	78	100	111	89	122
<i>E. faecalis</i> 119	1	86	93	71	79	79	100	100	79	86
	2	62	77	92	77	100	108	100	100	115
	3	100	100	100	92	100	108	133	108	117
<i>E. faecium</i> 6	1	74	89	74	68	84	84	84	95	84
	2	100	100	117	100	100	100	133	100	67
	3	89	89	89	89	100	100	89	133	100
<i>E. faecium</i> 12	1	67	92	50	50	100	133	133	83	50
	2	120	110	100	100	100	120	110	120	130
	3	100	100	88	75	100	100	88	75	125
<i>E. faecium</i> 40	1	86	79	64	71	50	64	64	100	86
	2	69	77	85	69	100	92	92	85	92
	3	69	77	92	54	92	115	92	77	92
<i>E. faecium</i> 69	1	100	93	93	100	86	86	100	100	93
	2	64	71	50	50	50	64	57	50	93
	3	79	79	79	86	71	100	100	79	57
<i>E. faecium</i> 70	1	92	92	92	92	108	108	92	108	115
	2	67	67	67	67	83	83	100	83	83
	3	90	80	80	100	100	80	100	110	90
<i>E. mundtii</i> 5	1	81	94	69	44	94	88	81	63	100
	2	100	93	71	86	79	93	86	71	79
	3	83	83	83	83	83	100	83	67	75
<i>E. mundtii</i> 39	1	69	77	77	69	85	85	85	77	77
	2	80	90	90	80	90	90	70	80	110
	3	89	89	67	89	100	111	100	111	111
<i>E. mundtii</i> 42	1	92	92	85	85	100	100	115	115	85
	2	69	62	77	69	77	92	108	100	92
	3	83	100	100	92	100	100	100	100	92
<i>E. mundtii</i> 115	1	94	100	82	100	100	118	112	124	129
	2	82	73	91	82	82	100	118	91	118
	3	79	100	100	79	86	107	100	93	71

quantidade de células alvo e/ou células capazes de absorver a bacteriocina também interferem no tamanho do halo de inibição formado (Blom et al., 1997).

Vários trabalhos de caracterização de enterocinas determinaram que elas são estáveis à amplas faixas de pH (Cintas et al., 1997; Floriano et al., 1998; Balla et al., 2000; Jennes et al., 2000; Kawamoto et al., 2002). A manutenção da atividade antimicrobiana em amplas faixas de pH é uma vantagem para a preservação de alimentos quando o produto é acidificado ou quando o pH do alimento diminui com o crescimento natural de BAL, em geral em alimentos fermentados (Franz et al., 1996).

A Figura 9 mostra a média obtida dos halos de inibição (mm) dos 18 sobrenadantes (em triplicata) em cada tratamento e no controle (0), sem alteração do pH.

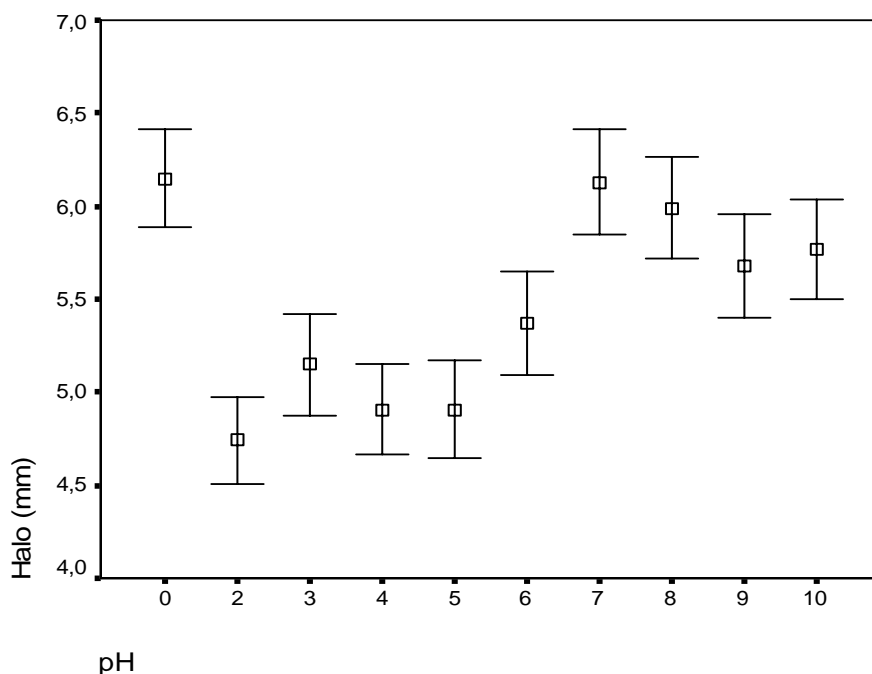


Figura 9 – Resultados da análise de variância utilizando os halos de inibição (mm) obtidos para os 18 sobrenadantes após teste de manutenção da atividade antimicrobiana em diferentes pHs, utilizando como índice de confiança 95%. (0) Controle sem tratamento e os pHs testados de 2 a 10.

Também pode se verificar diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$) e entre as 18 cepas analisadas ($P < 0,05$), mesmos resultados obtidos para o teste de aquecimento.

A análise estatística dos dados obtidos no teste de estabilidade a diferentes faixas de pH demonstrou diferença significativa entre as espécies ($P < 0,05$). As espécies *E. faecalis* e *E. mundtii* ($P < 0,05$) e *E. faecium* e *E. mundtii* ($P < 0,05$) apresentaram diferença significativa, enquanto que entre as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* não houve diferença significativa ($P = 0,6715$) (Figura 10).

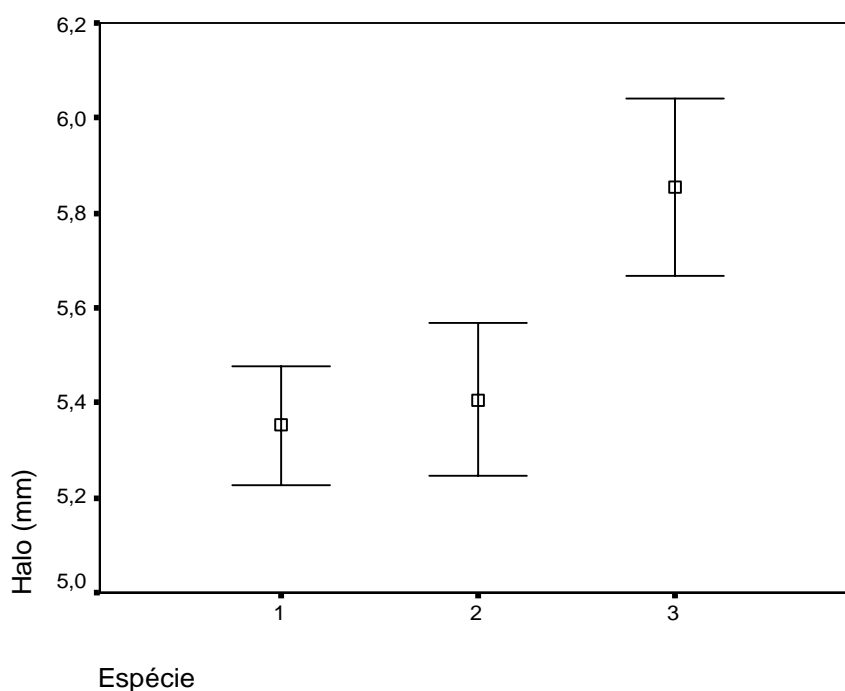


Figura 10 – Resultados da análise de variância utilizando o tamanho dos halos (mm) obtidos para os 18 sobrenadantes testados em triplicata após o teste de manutenção da atividade antimicrobiana em diferentes pHs para as espécies: 1 – *E. faecalis* (9 sobrenadantes com $n = 241$), 2- *E. faecium* (5 sobrenadantes com $n=135$) e 3 – *E. mundtii* (4 sobrenadantes com $n=108$). Com índice de confiança de 95%.

Os maiores halos de inibição foram da espécie *E. mundtii*, resultado semelhante ao encontrado para esta espécie no teste de aquecimento.

4.8 Manutenção da atividade antimicrobiana sob refrigeração e congelamento

Alíquotas dos sobrenadantes das 18 cepas produtoras foram estocadas por dois meses sob refrigeração (4°C) e congelamento (-20°C). Em intervalos de 15 dias foi determinada a atividade antimicrobiana em Unidades Arbitrárias.

Com os sobrenadantes armazenados sob refrigeração foram observadas as maiores perdas de atividade antimicrobiana, sendo que alguns sobrenadantes perderam totalmente a atividade com 60 dias de estocagem. Os três sobrenadantes da cepa *E. faecium* 40 perderam totalmente a atividade após 60 dias. Os sobrenadantes que se mostraram mais estáveis foram: *E. faecalis* 119 e *E. mundtii* 115 (Tabela 10). As perdas de atividade ocorreram, na maioria dos sobrenadantes, entre 15 e 30 dias de estocagem.

Na estocagem a -20°C, nenhum sobrenadante perdeu totalmente a atividade antimicrobiana com 60 dias de estocagem, mantendo-se parcialmente estáveis com pouca perda de atividade até 45 dias. Os sobrenadantes que apresentaram as maiores perdas de atividade quando congelados, foram os mesmos sob refrigeração, todos da espécie *E. faecium* (6, 12 e 40). Os sobrenadantes 27, 45 e 101 da espécie *E. faecalis* e 115 de *E. mundtii* mantiveram 100% de sua estabilidade quanto a atividade antimicrobiana, após 60 dias de congelamento. A maioria dos demais

sobrenadantes manteve 50% da atividade ao final do teste (Tabela 11). O sobrenadante 115 pode ser considerado o mais estável em ambas as temperaturas de armazenamento.

Os três sobrenadantes de cada cepa apresentaram comportamentos diferentes durante os dois tipos de estocagem. Alguns sobrenadantes perderam parte da atividade com 15 dias, enquanto outro sobrenadante da mesma cepa perdeu com 60 dias de estocagem (*E. faecalis* 27, Tabela 10). O sobrenadante 3 da cepa *E. mundtii* 115 não perdeu atividade com 60 dias de estocagem a 4°C, mas o sobrenadante 2 perdeu metade da atividade com 15 dias.

Sabia et al. (2004) caracterizaram duas enterocinas produzidas por *E. casseliflavus* e *E. faecalis*, ambas mantiveram-se estáveis durante seis meses sob refrigeração (4°C). A enterocina P, produzida por *E. faecium* se manteve estável por longo tempo estocada a 4°C e -20°C (Cintas et al., 1997), assim como a enterocina A produzida por *E. faecium* EK13 (Mareková et al., 2003).

Tabela 10 – Atividade antimicrobiana em UA/mL dos sobrenadantes livres de células estacados sob refrigeração a 4°C.

Isolado	Sobrenadante	0 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
<i>E. faecalis</i> 17H	1	400	400	400	200	100
<i>E. faecalis</i> 17H	2	100	100	100	50	12,5
<i>E. faecalis</i> 17H	3	100	50	50	50	50
<i>E. faecalis</i> 19H	1	100	100	100	100	100
<i>E. faecalis</i> 19H	2	100	100	100	100	25
<i>E. faecalis</i> 19H	3	200	200	100	50	50
<i>E. faecalis</i> 24H	1	400	400	200	200	100
<i>E. faecalis</i> 24H	2	100	100	100	25	0
<i>E. faecalis</i> 24H	3	100	50	50	25	12,5
<i>E. faecalis</i> 27H	1	100	100	100	100	50
<i>E. faecalis</i> 27H	2	100	100	100	50	25
<i>E. faecalis</i> 27H	3	200	50	50	25	25
<i>E. faecalis</i> 28H	1	200	200	100	100	25
<i>E. faecalis</i> 28H	2	100	100	25	25	12,5
<i>E. faecalis</i> 28H	3	400	100	50	50	12,5
<i>E. faecalis</i> 43H	1	200	200	200	100	12,5
<i>E. faecalis</i> 43H	2	400	200	200	100	12,5
<i>E. faecalis</i> 43H	3	400	400	200	200	100
<i>E. faecalis</i> 45H	1	200	100	100	100	25
<i>E. faecalis</i> 45H	2	400	200	200	200	100
<i>E. faecalis</i> 45H	3	400	400	200	200	100
<i>E. faecalis</i> 101H	1	400	400	400	200	100
<i>E. faecalis</i> 101H	2	100	100	100	50	0
<i>E. faecalis</i> 101H	3	100	100	100	25	25
<i>E. faecalis</i> 119H	1	200	200	200	200	200
<i>E. faecalis</i> 119H	2	400	400	400	200	200
<i>E. faecalis</i> 119H	3	400	400	400	200	200
<i>E. faecium</i> 6H	1	400	200	100	0	0
<i>E. faecium</i> 6H	2	200	200	100	0	0
<i>E. faecium</i> 6H	3	400	200	50	12,5	12,5
<i>E. faecium</i> 12H	1	25	25	0	0	0
<i>E. faecium</i> 12H	2	100	50	50	50	50
<i>E. faecium</i> 12H	3	100	100	50	0	0
<i>E. faecium</i> 40H	1	200	100	50	0	0
<i>E. faecium</i> 40H	2	200	200	50	50	0
<i>E. faecium</i> 40H	3	400	400	100	100	0
<i>E. faecium</i> 69H	1	200	200	100	25	25
<i>E. faecium</i> 69H	2	200	200	100	12,5	25
<i>E. faecium</i> 69H	3	200	100	100	100	100
<i>E. faecium</i> 70H	1	800	800	400	200	200
<i>E. faecium</i> 70H	2	200	200	100	100	100
<i>E. faecium</i> 70H	3	400	400	200	100	100
<i>E. mundtii</i> 5H	1	100	100	100	50	25
<i>E. mundtii</i> 5H	2	100	100	100	50	25
<i>E. mundtii</i> 5H	3	400	400	200	50	50
<i>E. mundtii</i> 39H	1	200	100	100	50	50
<i>E. mundtii</i> 39H	2	200	100	50	12,5	25
<i>E. mundtii</i> 39H	3	400	400	100	25	25
<i>E. mundtii</i> 42H	1	200	200	100	100	100
<i>E. mundtii</i> 42H	2	200	200	100	50	50
<i>E. mundtii</i> 42H	3	400	400	400	400	200
<i>E. mundtii</i> 115H	1	200	200	200	200	100
<i>E. mundtii</i> 115H	2	400	200	200	200	200
<i>E. mundtii</i> 115H	3	400	400	400	400	400

Tabela 11 - Atividade antimicrobiana em UA/mL dos sobrenadantes livres de células estocados sob congelamento à -20°C.

Isolado	Sobrenadante	0 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
<i>E. faecalis</i> 17H	1	400	400	400	400	200
<i>E. faecalis</i> 17H	2	100	100	100	100	50
<i>E. faecalis</i> 17H	3	100	100	100	100	50
<i>E. faecalis</i> 19H	1	100	100	100	100	100
<i>E. faecalis</i> 19H	2	100	100	100	100	100
<i>E. faecalis</i> 19H	3	200	200	100	100	12,5
<i>E. faecalis</i> 24H	1	400	400	400	400	200
<i>E. faecalis</i> 24H	2	100	100	100	100	50
<i>E. faecalis</i> 24H	3	100	100	100	100	100
<i>E. faecalis</i> 27H	1	100	100	100	100	100
<i>E. faecalis</i> 27H	2	100	100	100	100	100
<i>E. faecalis</i> 27H	3	200	200	200	200	200
<i>E. faecalis</i> 28H	1	200	200	200	100	100
<i>E. faecalis</i> 28H	2	100	100	100	100	50
<i>E. faecalis</i> 28H	3	400	100	100	100	100
<i>E. faecalis</i> 43H	1	200	200	200	100	100
<i>E. faecalis</i> 43H	2	400	200	100	200	100
<i>E. faecalis</i> 43H	3	400	400	200	400	200
<i>E. faecalis</i> 45H	1	200	200	200	200	200
<i>E. faecalis</i> 45H	2	400	400	400	400	400
<i>E. faecalis</i> 45H	3	400	400	400	400	400
<i>E. faecalis</i> 101H	1	400	400	400	400	400
<i>E. faecalis</i> 101H	2	100	100	50	100	100
<i>E. faecalis</i> 101H	3	100	100	100	100	100
<i>E. faecalis</i> 119H	1	200	200	200	200	200
<i>E. faecalis</i> 119H	2	400	400	400	400	400
<i>E. faecalis</i> 119H	3	400	400	400	200	100
<i>E. faecium</i> 6H	1	400	200	100	100	12,5
<i>E. faecium</i> 6H	2	200	200	100	12,5	12,5
<i>E. faecium</i> 6H	3	400	200	100	100	50
<i>E. faecium</i> 12H	1	25	25	25	25	12,5
<i>E. faecium</i> 12H	2	100	50	50	50	50
<i>E. faecium</i> 12H	3	100	100	50	100	100
<i>E. faecium</i> 40H	1	200	100	50	50	12,5
<i>E. faecium</i> 40H	2	200	200	100	50	50
<i>E. faecium</i> 40H	3	400	400	100	100	12,5
<i>E. faecium</i> 69H	1	200	200	100	100	100
<i>E. faecium</i> 69H	2	200	200	100	50	100
<i>E. faecium</i> 69H	3	200	100	50	100	100
<i>E. faecium</i> 70H	1	800	800	400	400	400
<i>E. faecium</i> 70H	2	200	200	100	100	50
<i>E. faecium</i> 70H	3	400	400	400	400	400
<i>E. mundtii</i> 5H	1	100	100	100	100	50
<i>E. mundtii</i> 5H	2	100	100	100	100	100
<i>E. mundtii</i> 5H	3	400	400	200	200	100
<i>E. mundtii</i> 39H	1	200	100	100	100	100
<i>E. mundtii</i> 39H	2	200	100	100	100	100
<i>E. mundtii</i> 39H	3	400	400	100	100	50
<i>E. mundtii</i> 42H	1	200	200	200	100	100
<i>E. mundtii</i> 42H	2	200	200	100	100	100
<i>E. mundtii</i> 42H	3	400	400	400	400	200
<i>E. mundtii</i> 115H	1	200	200	200	200	200
<i>E. mundtii</i> 115H	2	400	400	400	400	400
<i>E. mundtii</i> 115H	3	400	400	400	400	400

4.9 Suscetibilidade a enzimas proteolíticas

Os sobrenadantes livre de células foram tratados com as enzimas tripsina, proteinase K e lisozima para verificar a natureza protéica das enterocinas. Após exposição às proteases, a atividade antimicrobiana foi determinada pela técnica de difusão em poços, utilizando *L. innocua* ATCC 33090 como bactéria indicadora.

As proteases tripsina e proteinase K, nas concentrações de 0,1 e 1 mg/mL inativaram as enterocinas de todos o sobrenadantes, confirmando a natureza protéica do agente antimicrobiano. A protease lisozima, não inativou nenhum sobrenadante, mas houve uma perda na atividade antimicrobiana, mantendo em média 70%.

Várias enterocinas estudadas apresentam suscetibilidade a proteinase K e à tripsina, mas são parcialmente inativadas pela lisozima (Floriano et al., 1998; Jennes et al., 2000; Kawamoto et al., 2002; Moreno et al., 2002; Park et al., 2003).

4.10 Fatores de virulência

Com as 18 cepas, que apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células, foram realizados testes para caracterização quanto aos fatores de virulência: cápsula, adesinas, gelatinase e hemolisina.

Todas as cepas apresentaram cápsula e nenhuma foi positiva para hemolisina e adesinas (Tabela 12). No teste de gelatinase apenas duas cepas de *E. faecalis* (19 e 101) foram positivas.

Os mecanismos da patogenia dos enterococos ainda não estão bem esclarecidos. A gelatinase é uma protease que hidrolisa gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos, por isso sugerem um papel importante em processos inflamatórios (Hickey et al., 2003). Elsner et al. (2000) relataram que 55% dos *E. faecalis* foram produtores de gelatinase e que linhagens de *E. faecium* foram negativas, confirmando os dados encontrados neste trabalho.

A produção de cápsula em *Enterococcus* spp. é pobremente documentada, tanto que alguns autores descrevem que este gênero não produz cápsula (MacFaddin, 2000). Porém, neste trabalho todas as cepas testadas apresentaram cápsula.

Em estudos realizados com cepas de *Enterococcus* spp. quanto a hemolisina, foram encontradas 8 cepas de *E. faecalis* que apresentavam β -hemólise em sangue humano, estas cepas também apresentavam o gene estrutural da citolisina, já nos isolados de *E. faecium* positivos para β -hemólise não foi verificada a presença do gene da citolisina (De Vuyst et al., 2002). Estudos genéticos determinaram que as atividades hemolítica e antimicrobiana são produzidas pela mesma substância, a citolisina, que é considerada como um fator de virulência em cepas de enterococos (Booth et al., 1996). No presente estudo nenhuma cepa apresentou resultado positivo para hemolisina, assim como não se verificou inibição de fungos ou leveduras, indicando que as cepas não estão produzindo a citolisina.

Em trabalhos anteriores foram realizados testes para verificar a resistência a antimicrobianos com as 18 cepas caracterizadas neste estudo

(Fuentefria, 2003). O perfil de multiresistência dessas cepas variou de 2 a 6 antibióticos, sendo que a cepa de *E. faecalis* 28 apresentou resistência a 6 antibióticos. A resistência por múltiplas classes de antimicrobianos é muito comum em enterococos isolados de humanos e animais (Harwood et al., 2000). Nenhuma cepa foi resistente a vancomicina, nem a estreptomicina e gentamicina de alta concentração. Todas as cepas foram resistentes a eritomicina e amicacina (Fuentefria, 2003).

A caracterização das cepas produtoras de enterocinas quanto a fatores de virulência e resistência a antibióticos é de grande importância, visto que a principal aplicação destas substâncias é na indústria de alimentos. Como os enterococos são muitas vezes utilizados na forma de cultura bacteriana em alimentos, eles poderiam contribuir para a disseminação dos genes responsáveis por estas características.

Todavia, as cepas que apresentaram resultados negativos para os testes de fatores de virulência, podem apresentar o gene e não estar expressando a característica, por esta razão deve-se verificar a presença dos genes destes fatores através de análises moleculares.

Tabela 12 – Resultados obtidos nos teste de fatores de virulência para as 18 cepas com atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células.

Espécie	Cepa	FATORES DE VIRULÊNCIA			
		Cápsula	Gelatinase	Adesinas	Hemolisina
<i>E. faecalis</i>	17	+	-	-	-
	19	+	+	-	-
	24	+	-	-	-
	27	+	-	-	-
	28	+	-	-	-
	43	+	-	-	-
	45	+	-	-	-
	101	+	+	-	-
	119	+	-	-	-
<i>E. faecium</i>	6	+	-	-	-
	12	+	-	-	-
	40	+	-	-	-
	65	+	-	-	-
	69	+	-	-	-
	70	+	-	-	-
<i>E. mundtii</i>	5	+	-	-	-
	39	+	-	-	-
	42	+	-	-	-
	115	+	-	-	-

4.11 Curva de produção de enterocinas

Para realização das curvas de produção de enterocinas foram escolhidas as cepas: *E. faecalis* 119, *E. faecium* 69 e 70 e *E. mundtii* 39 e 115. Para a escolha destas cepas foram analisados os resultados obtidos nos testes de inibição cruzada, determinação da atividade antimicrobiana em UA/mL e estocagem, pois através destes testes pode se verificar diferenças entre os sobrenadantes das 18 cepas.

Com uma hora de incubação pode-se verificar um aumento na absorbância para todas as cepas (Figura 11 A, B, D e E), menos *E. faecium* 70 que iniciou a fase logarítmica depois de 6 horas de incubação (Figura 11 C). O

início da fase estacionária foi com aproximadamente 11 horas de incubação para as cepas 39 e 119, as outras cepas iniciaram com aproximadamente 14 horas de incubação (Figura 11).

As 5 cepas começaram a produzir enterocinas na fase logarítmica de crescimento, apresentando cinética de metabólito primário. As cepas 115, 69 e 119 apresentaram um pico de produção no final da fase logarítmica de crescimento e perderam a atividade na fase estacionária (Figura 11 A, B e E), ao contrário das cepas 39 e 70 que mantiveram sua atividade máxima até 18 horas de incubação (Figura 11 C e D).

A cepa 39 manteve a atividade de 1600 UA/mL até 18 horas, enquanto que a 115 apresentou uma atividade de 1600 UA/mL, mas com 18 horas de incubação estava com apenas 800 UA/mL. As cepas 69 e 119 apresentaram uma atividade máxima de 800 UA/mL no final da fase estacionária, mas com 18 horas de incubação apresentaram uma atividade menor de 100 e 200 UA/mL, respectivamente. A cepa 70 foi a que apresentou menor atividade com apenas 400 UA/mL. A diminuição da atividade antimicrobiana após um tempo maior de incubação pode ser devido a degradação da bacteriocina pela presença de proteases no meio ou pelo baixo pH (Torri Tarelli et al., 1994). Outro fator é a reabsorção da bacteriocina pela superfície da célula produtora em baixo pH (Franz et al., 1996).

O pH inicial de todas as culturas foi de 6,1 e após 18 horas de incubação, as cepas de *E. mundtii* chegaram a 4,4 e as de *E. faecalis* e *E. faecium* chegaram a 4,7 (Figura 11 A*, B*, C*, D* e E*).

Mareková et al. (2003) realizaram a curva de produção de enterocinas da cepa *E. faecium* EK 13 em caldo MRS a 37°C sem ajuste de pH, em fermentador. A produção de bacteriocinas iniciou com uma hora de incubação e teve sua atividade máxima em 7 horas de incubação (25600 UA/mL), sendo que o início da fase estacionária foi em 6 horas. O pH final, após 25 horas, foi de 4,4. Resultados semelhantes foram encontrados na curva de produção da cepa *E. faecium* P21, onde a atividade máxima foi encontrada com 12 horas de incubação, na fase estacionária inicial, e o pH final também foi de 4,4 (Herranz et al., 2001).

A curva de produção realizada para a cepa *E. faecium* FAIR – E 198 teve uma atividade máxima de 800 UA/mL depois de 5 horas de fermentação em caldo MRS suplementado com 2% de glicose a 37°C e com pH controlado de 6.5. Sob as mesmas condições, mas com pH controlado em 5.5, uma menor atividade foi determinada (200 UA/mL) depois de 10 horas de incubação. A uma temperatura de 25°C o crescimento bacteriano foi baixo e nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada (Sarantinopoulos et al., 2002).

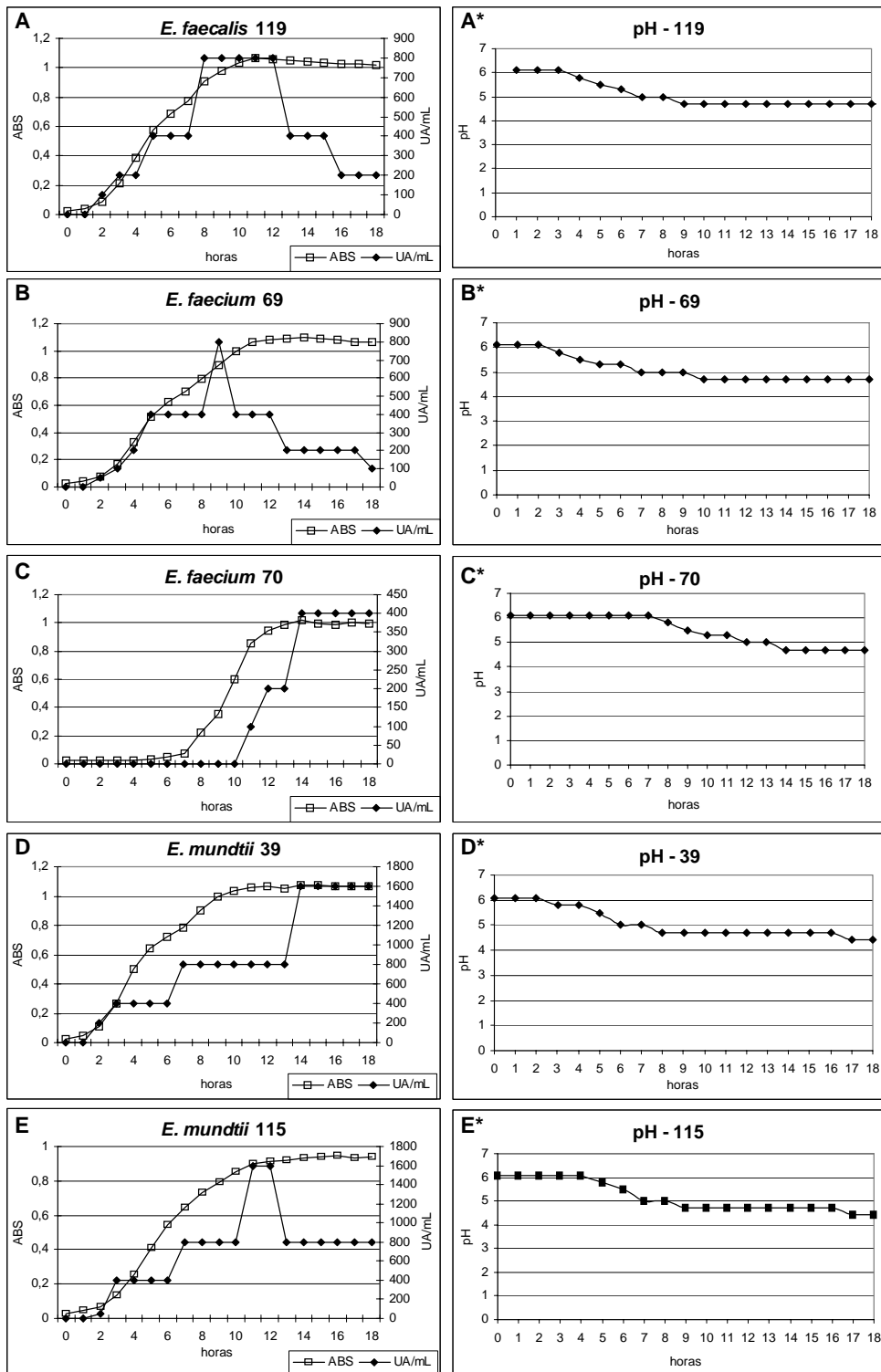


Figura 11- Curvas de produção de enterocinas com os resultados da atividade antimicrobiana em UA/mL, crescimento microbiano (ABS 620nm) e pH do meio de cultura (*) para as cepas de *E. faecalis* 119 (A), *E. faecium* 69 (B) e 70 (C), *E. mundtii* 39 (D) e 115 (E). A curva foi realizada em caldo MRS a 35°C por 18 horas, sendo ponto 0 o inicial.

4.12 Amplificação dos genes das enterocinas A e B pela PCR

Com as 82 cepas de *E. faecium* foram realizadas reações de PCR com o DNA total utilizando primers específicos para as enterocinas A e B.

A enterocina A foi identificada pela primeira vez por Aymerich et al. (1996) sendo produzida pela cepa *E. faecium* CTC 492 e o gene desta enterocina foi localizado no DNA cromossomal. A enterocina B foi caracterizada por Casaus et al. (1997) sendo produzida por *E. faecium* T136 e seu gene também foi localizado no DNA cromossomal. Estudos posteriores determinaram que estas cepas eram produtoras das duas enterocinas A e B (Nilsen et al., 1998; Casaus et al., 1997). Pelo fato destas enterocinas apresentarem seu gene no DNA cromossomal e só ter sido encontrado em cepas da espécie *E. faecium*, os testes para detectar a presença destes genes foram realizados apenas nesta espécie.

Das 82 cepas de *E. faecium* testadas no presente estudo, 14 apresentaram o gene para enterocina A (Figura 12) e 9 cepas apresentaram o gene para produção da enterocina B (Figura 13), sendo que apenas a cepa 23, isolada de fezes de humanos, apresentou o gene de ambas enterocinas (Tabela 113). Entre as 5 cepas de *E. faecium* que apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células, nenhuma apresentou os genes das enterocinas A e B. Apenas a cepa 65, proveniente de fezes de humanos, apresentou o gene da enterocina B e foi uma das 26 cepas que apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células, mas quando foi preparado um novo sobrenadante esta não apresentou atividade.

Portanto, as cepas que apresentaram atividade inibitória no sobrenadante livre de células podem estar produzindo outro tipo de enterocina.

Das 22 cepas de fezes de humanos, 9 apresentaram o gene da enterocina A e nas cepas isoladas de água houve um maior número de cepas com o gene da enterocina B (6 cepas).

Comparando os dados de inibição obtidos na triagem contra cinco bactérias indicadoras das cepas que apresentaram o gene de uma das enterocinas, a maioria apresentou atividade antimicrobiana contra as três espécies de *Listeria* testadas, indicando que poderiam estar produzindo enterocinas. As cepas 111 e 120 provenientes de fezes de humanos, 17A e 68A de fezes de suínos e a cepa 4.3 BIII de amostra de água não inibiram nenhuma das cinco bactérias indicadoras utilizadas na triagem, mas apresentaram o gene para uma das enterocinas testadas. A não expressão dos genes poderia estar vinculada as condições de crescimento.

Vários trabalhos realizados com cepas de *E. faecium* identificaram os genes das enterocinas A e B (Herranz et al., 2001; Ennahar et al., 2001). A cepa *E. faecium* JCM 5804 produz além das enterocinas A e B, a enterocina P (Park et al., 2003), já a cepa *E. faecium* EK 13 produz apenas as enterocinas A e P (Mareková et al., 2003). De Vuyst et al. (2002) testaram 122 cepas de *Enterococcus* spp. para a presença dos genes das enterocinas A, B, P, 31, AS-48, L50A, L50B e citolisina. As enterocinas A e B só ocorreram nas cepas de *E. faecium*, sendo que 46 apresentaram o gene da enterocina A e 10 apresentaram os genes da enterocina A e da B.

O gene da enterocina A é amplamente distribuído entre cepas de *E. faecium*, enquanto que o gene para enterocina B ocorre sempre na presença do gene para enterocina A (De Vuyst et al., 2002). Provavelmente devido ao fato que nenhum gene de transporte foi encontrado para a translocação da enterocina B, a secreção desta enterocina depende de proteínas de transporte de outras enterocinas, como da enterocina A (Franz et al., 1999b).

Neste trabalho várias cepas apresentaram apenas o gene da enterocina B, podendo-se supor que esta enterocina esteja utilizando a via de secreção de outra enterocina que não a da enterocina A. Poucos estudos foram realizados testando várias cepas de *Enterococcus* spp. para a presença destes dois genes, não podendo concluir que a presença do gene para enterocina B só ocorra na presença do gene para enterocina A.

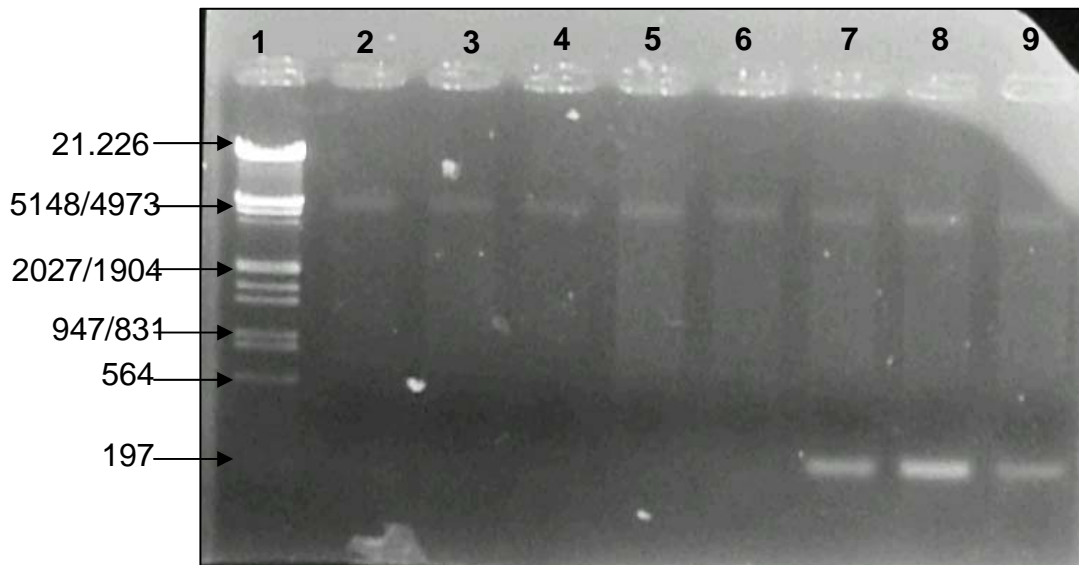


Figura 12 – Amplificação do gene da enterocina A em cepas de *Enterococcus faecium* em gel de agarose 1% com o marcador molecular DNA λ /Eco RI + Hind III (canaleta 1), controle da reação (canaleta 2), cepa de *E. mundtii* como controle negativo (canaleta 3) e cepas de *E. faecium* (canaletas de 4 a 9).

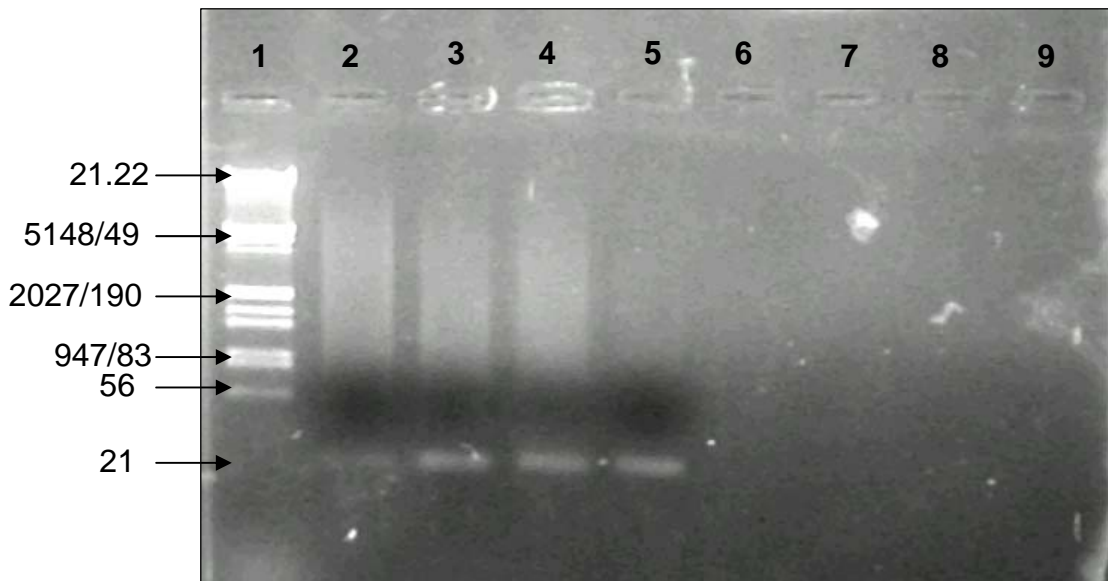


Figura 13 – Amplificação do gene da enterocina B em cepas de *Enterococcus faecium* em gel de agarose 1% com o marcador molecular DNA λ /Eco RI + Hind III (canaleta 1), cepas de *E. faecium* (canaletas 2 a 7), controle da reação (canaleta 8), cepa de *E. mundtii* como controle negativo (canaleta 9).

Tabela 13 - Resultados obtidos no teste de triagem contra cinco bactérias indicadoras, teste de produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células (SLC) e presença do gene para produção das enterocinas A e B nas cepas de *E. faecium*. Cepas negativas para todos os testes não foram colocadas na tabela.

Origem	Cepa	Triagem	H ₂ O ₂	SLC	Ent A	Ent B
Humanos N=22	1	(+)				
	6	(+)	(-)			
	11	(+)	(-)		(+)	
	12	(+)	(-)	(+)		
	18	(+)			(+)	
	21	(+)				
	23	(+)	(-)		(+)	(+)
	31	(+)			(+)	
	40	(+)	(-)	(+)		
	44	(+)	(-)			
	55	(+)			(+)	
	60	(+)			(+)	
	65	(+)	(-)	(+)		(+)
	67	(+)				
	69	(+)	(-)	(+)		
	70	(+)	(-)	(+)		
	75	(+)	(-)			
	88	(+)				(+)
	104	(+)				
	111					(+)
	113					
	120					(+)
Suínos N=35	17 ^a					(+)
	45A	(+)	(-)		(+)	
	47A	(+)	(-)		(+)	
	56A	(+)			(+)	
	65A	(+)	(-)			
	68A					(+)
Água N=25	1.3 CII	(+)	(-)			
	1.7 AII	(+)				
	2.1 BIII	(+)			(+)	
	2.2 BI	(+)	(-)			
	2.2 BII	(+)	(-)			
	2.4 BI	(+)	(-)			
	2.4 BIV	(+)				
	2.4 BVI	(+)				
	2.3 CII	(+)	(-)			
	3.3 BI	(+)				
	3.5 BII	(+)	(-)			
	3.3 CI	(+)	(-)			(+)
	3.3 CII	(+)				(+)
	3.5 CII	(+)	(-)			(+)
	4.3 BIII					(+)
	4.3 BIV	(+)				(+)
	4.1 CI	(+)	(-)			
	4.1 CII	(+)	(-)			
	5.1 CI	(+)				(+)
	5.1 CIII	(+)				
5.1 CIV	(+)					
5.2 A	(+)	(-)				

4.13 Determinação do peso molecular das enterocinas

Com as mesmas cepas selecionadas para a determinação da curva de produção de enterocinas foram realizados testes para determinação do peso molecular.

O peso molecular estimado para as enterocinas produzidas pelas cepas *E. faecalis* 119, *E. faecium* 69 e 70 e de *E. mundtii* 39 e 115 foi determinado entre as bandas de 2,3 e 3,4 KDa, como observado na Figura 14. Nenhuma banda de proteína pode ser observada no gel corado com Coomassie blue, possivelmente pelo fato das amostras não estarem concentradas.

Das enterocinas mais bem caracterizadas até o momento a maioria pertence a classe IIa que apresentam um peso molecular inferior a 10 KDa (Eijsink et al., 2002). Das enterocinas que tiveram seu peso molecular determinado, a grande maioria esta na faixa de 3 a 5 KDa. As mais bem caracterizadas são as enterocinas A e B, produzidas por cepas de *E. faecium* e apresentam peso molecular de 4,8 e 5,4, respectivamente. Outras enterocinas como a 31 produzida por *E. faecium* tem peso molecular de 5 KDa e a enterocina P com 4,5 KDa (Ennahar et al., 2000), todas com pesos moleculares superiores ao encontrado neste trabalho.

A enterocina O12 produzida por *E. gallinarum* apresenta um peso molecular próximo ao encontrado neste estudo com 3,4 KDa (Jennes et al., 2000), assim como a munditocina produzida por *E. mundtii* (Kawamoto et al., 2002). A enterocina ON-157 produzida pela cepa *E. faecium* NIAI 157 é uma das menores já caracterizadas, com um peso molecular de 2,5 KDa (Ohmomo

et al., 2000). A citolisina é uma enterocina produzida por *E. faecalis* que apresenta duas subunidades, uma apresenta o peso molecular de 2 KDa e a outra subunidade de 3,4 KDa, assim como a enterocina 1071 também formada por duas subunidades e produzida por *E. faecalis*, apresenta os pesos moleculares de 4,3 e 3,8 KDa (Garneau et al., 2002) .

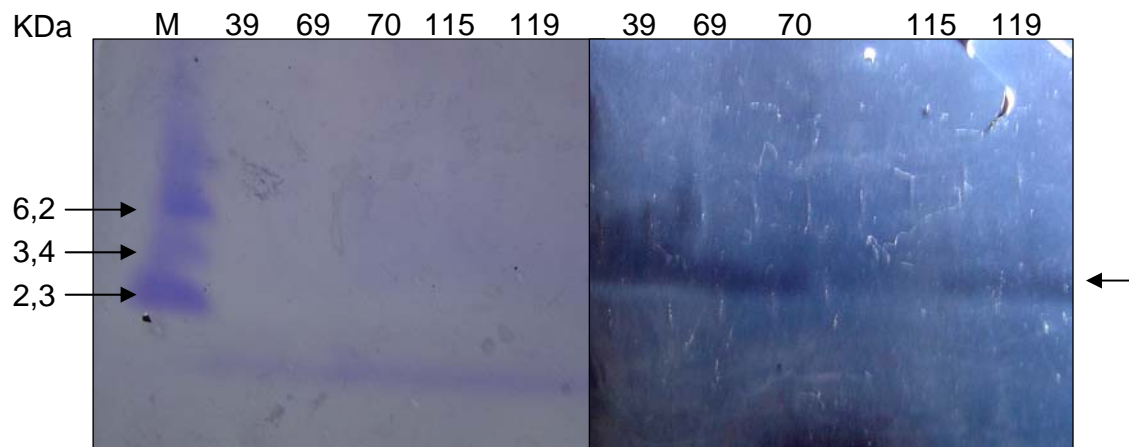


Figura 14 - Resultado obtido no teste de determinação do peso molecular das enterocinas. No gel à esquerda corado com Coomassie Blue e a direita o gel de atividade antimicrobiana utilizando a bactéria indicadora *L. innocua*. A seta indica a posição da zona de inibição. M= marcador de peso molecular.

5. CONCLUSÕES

1 - Das 352 cepas de *Enterococcus* spp. analisadas neste trabalho, 50% apresentaram atividade antimicrobiana na triagem, mas apenas 18 cepas (5%) apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células.

2 - Todos os sobrenadantes apresentaram o mesmo espectro de atividade antimicrobiana inibindo 4 espécies do gênero *Listeria*, *Lactobacillus plantarum* e *Salmonella* Enteritidis. No teste de inibição cruzada nenhuma cepa foi sensível a sua própria enterocina. A cepa *E. faecium* 70 e *E. mundtii* 115 apresentaram perfis diferentes, possivelmente produzindo diferentes enterocinas.

3 - O sobrenadante livre de células das 18 cepas analisadas mostraram-se parcialmente estáveis ao aquecimento, a variações de pH e a estocagem por 60 dias a 4°C e – 20°C. As substâncias antimicrobianas dos sobrenadantes livre de células foram sensíveis a proteinase K e tripsina, confirmando sua natureza protéica.

4 - As 18 cepas produtoras de enterocinas apresentaram cápsula e nenhuma foi positiva para adesinas e hemolisina.

5 - Das cinco cepas testadas para curva de produção de enterocinas, todas iniciaram a produção na fase logarítmica de crescimento, apresentando cinética de metabólito primário.

6 – Das 82 cepas de *E. faecium* testadas para a presença dos genes das enterocinas A e B, 14 apresentaram o gene da enterocina A e 9 da enterocina B. Todavia, nenhuma destas apresentou atividade inibitória no sobrenadante livre de células. Nenhuma das 5 cepas de *E. faecium* com atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células foi positiva para os genes das enterocinas A e B, portanto outro tipo de enterocina esta sendo produzida.

7 - Os cinco sobrenadantes livre de células analisados apresentaram um peso molecular aproximado de 3 KDa, quando analisados por SDS-PAGE.

8 – Com base nos resultados obtidos, estas enterocinas apresentam um potencial para novos estudos como biopreservantes de alimentos, considerando sua estabilidade e a sua capacidade de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, dois patógenos importantes vinculados a alimentos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Purificação dos sobrenadantes livre de células para melhor caracterização bioquímica e determinação da seqüência de aminoácidos.

Verificar a presença dos genes de outras enterocinas já caracterizadas na literatura através da reação de PCR.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABEE, T.; KRÖCKEL, L. e HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int J Food Microbiol**, Berlin, v.28, p.169-185, 1995.

AUSUBEL, F. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1987. vol. 2

AYMERICH, T. et al. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.62, p.1676-1682, 1996.

AYMERICH, T. et al. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocinas A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of *in vitro* production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. **J Appl Microbiol**, London, v.88, p.686-694, 2000.

BALLA, E. et al. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.66, p.1298-1304, 2000.

BENNIK, M. et al. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. **Bioch Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1373, p.45-58, 1998.

BLOM, H. et al. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.38, p.103-109, 1997.

BOCKELMANN, W. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheese. **Int Dairy J**, v.12, p.123-131, 2002.

BOOTH, M. et al. Strutral analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. **Molecular Microbiology**, v.21, p.1175-1184, 1996.

CARNIO, M.; EPPERT, I. e SCHERER, S. Analysis of the bacterial surface ripening flora of Germani and French smeared cheese with respect to their anti-listerial potential. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.47, p.89-97, 1999.

CASAUS, P. et al. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. **Microbiology**, London, v.143, p.2287-2294, 1997.

CENTENO, J.; MENÉNDEZ, S. e RODRÍGUEZ-OTERO, J. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.33, p.307-313, 1996.

CINTAS, L. et al. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.63, p.4321-4330, 1997.

CINTAS, L. et al. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to Staphylococcal hemolysins. **J Bacteriol**, Oxford, v.180, p.1988-1994, 1998.

CINTAS, L. et al. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. **J Bacteriol**, Oxford, v.182, p.6806-6814, 2000.

CLADERA-OLIVEIRA, F. **Produção, caracterização, purificação parcial e aplicação de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus licheniformis* P40**. 2004. 118f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CLADERA-OLIVEIRA, F.; CARON, G. e BRANDELLI, A. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Let Appl Microbiol**, Oxford, v.38, p.251-256, 2004.

COLLINS, M. D. et al. 16S Ribosomal ribonucleic acid sequence analysis of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. Nov., sp. Nov. **J Appl Bacteriol**, Oxford, v.67, p.453-460, 1989.

DEL CAMPO, R. et al. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, p.905-912, 2001.

DEVRIESE, L. A.; POT, B. e COLLINS, M. D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species groups. **J Applied Bacteriol**, Oxford, v.73, p.339-408, 1993.

DE VUYST, L.; FOULQUIÉ MORENO, M. e REVETS, H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in

enterococci of different origins. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.2635, p.1-20, 2002.

DU TOIT, M. et al. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. **J Appl Microbiol**, London, v.88, p.482-494, 2000.

EATON, T. e GASSEN, M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **App Envir Microbiol**, Washington, v.67, p.1628-1635, 2001.

EIJSINK, V. et al. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.64, p.3275-3281, 1998.

EIJSINK, V. et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.81, p.639-654, 2002.

ELSNER et al. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* blood culture isolates. **European J Clinical Microbiol infection disease**, Wiesbaden, v.19, p.39-42, 2000.

ENNAHAR, S. et al. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. **J Appl Microbiol**, London, v.85, p.521-526, 1998.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K. e ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, p.85-106, 2000.

ENNAHAR, S. et al. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.70, p.291-301, 2001.

FLORIANO, B.; RUIZ-BARBA, J. e JIMÉNEZ-DÍAS, R. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.64, p.4883-4890, 1998.

FRANZ, C.; SCHILLINGER, U. e HOLZAPFEL, W. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.29, p.255-270, 1996.

FRANZ, C.; HOLZAPFEL, W. e STILES, M. Enterococci at the crossroads of food safety? **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.47, p.1-24 1999a.

FRANZ, C. et al. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE900. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.65, p.2170-2178 1999b.

FREITAS, A. et al. Microbiological characterization of Picante de Beira Baixa cheese. **J Food Prot**, Ames, v.59, p.155-160, 1995.

FUENTEFRIA, D. **Caracterização molecular de isolados de Enterococcus spp. através da amplificação e clivagem da região intergênica 16S-23S do rRNA**. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

GARCÍA, M. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin Ej97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.90, p.161-170, 2004.

GARNEAU, S. et al. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, Paris, v.84, p.577-592, 2002.

GELSOMINO, R. et al. Enterococcal diversity in the cheesemaking environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.71, p.177-188, 2001.

GEVERS, D.; HUYS, G. e SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.205, p. 31-36, 2001.

GIRRAFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potential use as anti-Listeria factors in dairy technology. **Food Microbiol**, v.12, p.551-556, 1995.

GIRRAFA, G.; CARMINATI, D. e NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **J Food Prot**, Ames, v.60, p.732-738, 1997.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.26, p.163-171, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.88, p.215-222, 2003.

GODFREE, A. F.; KAY, D. e WYER, M. D. Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. **J Appl Microbiol Symposium Supplement**, London, v.83, p.110S-119S, 1997.

HARDIE, J. e WHILEY, R. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **J Appl Microbiol Symposium Supplement**, London, v.83, p.1S-11S, 1997.

HARWOOD, V.; WHITLOCK, J. e WITHINGTON, V. Classification of Antibiotic resistance discriminate analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. **Appl Env. Microbiol**, Washington. 2000. 66:3698-3704.

HERRANZ, C. et al. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. **Food Microbiol**. v.18, p.115-131, 2001.

HICKEY, R.; TWOMEY, D.; ROSS, R. e HILL, C. Potential of the enterocin regulatory system to control expression of heterologous genes in *Enterococcus*. **J Appl Microbiol**, London, v.95, p.390, 2003.

HOLZAPFEL, W.; GEISEN, R. e SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.24, p.343-362, 1995.

HUDAULT, S. et al. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* strain GG against *Salmonella typhimurium* C infection. **Appl Env Microbiol**, Washington, v.63, p.513-518, 1997.

HUGAS, M. Functionality of enterococci in meat products. **Int J Food microbial**, Amterdam, v.88, p.223-233, 2003.

IKE et al. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. **J Clinical Microbiol**, Toronto, v.25, p.1524-1528, 1987.

JENNES, W.; DICKS, L. e VERWOERD, D. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **J Appl Microbiol**, London, v.88, p.349-357, 2000.

JOOSTEN, H. et al. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.62, p.4220-4223, 1996.

KAWAMOTO, S. et al. Biochemical and genetic characterization of mundtacin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.68, p.3830-3840, 2002.

KLAENHAMMER, T. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, Paris, v.70, p.337-349, 1988.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.88, p.123-131, 2003.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e atlas colorido. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 608-611.

KÜHN, I. et al. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strain, in animals, humans and the environment. Exemple of an ongoing project within de European research programme. **Int J Antimicrobial Agents**. v.14, p. 337-342, 2000.

KÜHN, I. et al. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.88, p.133-145, 2003.

LAUKOVÁ, A. et al. Occurrence of bacteriocin production among environmental enterococci. **Let Appl Microbiol**, Oxford, v.27, p.178-182, 1998a.

LAUKOVÁ, A. e CZIKKOVÁ, S. Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. **Let Appl Microbiol**, Oxford, v.26, p.215-218, 1998b.

LAUKOVÁ, A. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. **Food Microbiol**, v.16, p.93-99, 1999.

LAUKOVÁ, A.; JURIS, P.; VASILKOVÁ, Z. e PAPAJOVÁ, I. Treatment of sanitary-important bacteria by bacteriocin substance V24 in cattle dung water. **Let Appl Microbiol**, Oxford, v.30, p.402-405, 2000.

LAUKOVÁ, A. et al. Inhibition of *Salmonella enterica* serovar *Dusseldorf* by enterocin A in gnotobiotic Japanese quails. **Vet Med – Czech**. v.49, p.47-51, 2004.

LEROY, F. e DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. **Int. J Food Microbiol**, Amsterdam, v.72, p.155-164, 2002.

LEWUS, C.; KAISER, A. e MONTVILLE, T. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.57, p.1683-1688, 1991.

MACFADDIN, J., LIPPINCOTT, P. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 2000. 912p.

MAREKOVÁ, M. et al. Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *E. faecium* EK13. **J Appl Microbiol**, London, v.94, p.523-530, 2003.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. e BERKELEY, R. Methods for studying bacteriocins. **Methods in Microbiology**, v.12, p.39-86, 1972.

McAULIFFE, O.; ROSS, R. P. e HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.25, p.285-308, 2001.

MINAHK, C.; FARIÁS, M.; SESMA, F. e MORERO, R. Effect of enterocin CRL35 on *Listeria monocytogenes* cell membrane. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.192, p.79-83, 2000.

MORENO, M. et al. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. **J Appl Microbiol**, London, v.92, p.147-157, 2002.

MURRAY, B. E. The life and times of *Enterococcus*. **Clin Microbiol Rev.** v.3, p.45-65, 1990.

NES, I. et al. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.70, p.113-128, 1996.

NILSEN, T.; NES, I. e HOLO, H. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. **J Bacteriol**, Oxford, v.180, p.1848-1854, 1998.

OHMOMO, S. et al. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocina produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. **J Appl Microbiol**, London, v.88, p.81-89, 2000.

OLIVEIRA, S. et al. Staphylococcal strains involved in bovine mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides. **Let Appl Microbiol**, Oxford, v.27, p.287-291, 1998.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, Baltimore, v.21, p.465-499, 2003.

PARK, S.; ITOH, K. e FUJISAWA, T. Characteristics and identification of enterocinas produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804. **J Appl Microbiol**, London, v.95, p.294-300, 2003.

RILEY, M. e WERTZ, J. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v.56, p.117-137, 2002.

SABIA, C. et al. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.75, p.163-170, 2002.

SABIA, C. et al. Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages ("cacciatore"). **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.87, p.173-179, 2003.

SABIA, C. et al. Study of two bacteriocins produced by *E. casseliflavus* and *E. faecalis*. **Letters Appl Microbiol**, Oxford, v.38, p. 99-105, 2004.

SAHL, H. e BIERBAUM, G. Lantibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram positive bacteria. **Annu Ver Microbiol**. v.52, p.41-79, 1998.

SARANTINOPOULOS, P. et al. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.72, p.125-136, 2002.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R. e HOLZAPFEL, W. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of food. **Trends in Food Sci Technol**. v.7, p.158-164, 1996.

SEELEY, J.; VANDEMARK, P. e LE, L. **Structural strains**. Microbe in Action 4^{ed}, New York: W.H. Freeman and Company. 1991. p. 87-90.

TAGG, J. e MCGIVEN, A. Assay system for bacteriocins. **Appl Microbiol**, v.21, p.943, 1971.

TORRI TARELLI, G.; CARMINATI, D. e GIRAFFA, G. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. **Food Microbiol**. v.11, p.243-252, 1994.

VALAR, C. **Caracterização de isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras de água**. 2002. 110f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

VLAEMYNCK, G.; HERMAN, L. e COUDIJZER, K. Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.24, p.211-225, 1994.

YANG, R. e RAY, B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **Food Microbiol**. v.11, p.281-291, 1994.

8. APÊNDICE

8.1 Meios para recuperação e crescimento das bactérias

8.1.1 Caldo e Ágar BHI (Brain Heart Infusion – Difco)

Infusão de cérebro de vitelo	200,0 g
Infusão de coração bovino	250,0 g
Peptona proteose	10,0 g
Dextrose	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato Dissódico	2,5 g
Água destilada	1000,0 mL

Para o ágar adicionar 15g/L. Suspender 37 g do pó em 1 L de água destilada. Autoclavar a 121°C, 1 atm, 15 minutos. pH final 7,4 ± 0,2.

8.1.2 Caldo e Ágar TSB

Peptona de caseína	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
D(+)-glicose	5,0 g
Di-fosfato de potássio hidrogenado	2,5 g
Água destilada	1000,0 mL

Dissolver 30 g do pó em 1 L de água destilada. Autoclavar a 121°C, 1 atm, por 15 minutos.

8.1.3 Caldo e Ágar MRS

Peptona caseína	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
D(+)-glicose	20,0 g
Diidrogenofosfato potássico	6,0 g
Citrato de sódio	2,0 g
Polissorbato 80	1,0 g
Acetato de sódio	15,0 g
Sulfato de magnésio	0,575 g
Sulfato de ferro (III)	0,034 g
Sulfato de manganês	0,12 g
Água destilada	1000,0 mL

Adicionar 55 g do pó a 1 l de água destilada e autoclavar a 121°C, 1 atm, por 15 minutos.

8.1.4 Ágar m-enterococos

Triptona	20,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Dextrose	2,0 g
Fosfato de potássio	4,0 g
Azida sódica	0,4 g
Agar bacteriológico	10,0 g
Água destilada	1000,0 mL

Dissover os componentes em água e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

8.1.5 PBS

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ PO ₄	1,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Água destilada	1000 mL

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

8.2 Reagentes para extração de DNA cromossomal

8.2.1 Solução de sacarose 40%

Sacarose	40 g
Água destilada	100,0 mL

Autoclavar a solução a 121°C, 1 atm, por 10 minutos. Armazenar a temperatura ambiente.

8.2.2 Tris-HCl 1 M pH 8.0

Tris	121,14 g
Água destilada	1000,0 mL

Ajustar o pH com HCl 1 M.

8.2.3 EDTA 0,5 M pH 8.0

EDTA	186,12 g
Água destilada	1000,0 ml

Ajustar o pH com solução de NaOH 1M e autoclavar a 121°C, 1 atm, por 10 minutos. Armazenar em temperatura ambiente.

8.2.4 NaOH 1M

Hidróxido de Sódio	40,0 g
Água destilada	1000,0 mL

8.2.5 Triton X-100 50%

Triton X-100	50,0 mL
Água destilada	100,0 mL

Autoclavar a 121°C, 1 atm por 10 minutos. Armazenar a temperatura ambiente.

8.2.6 NaCl 5M

Cloreto de Sódio	292,2 g
Água destilada	1000,0 mL

Autoclavar a 121°C, 1 atm por 10 minutos. Armazenar a temperatura ambiente.

8.2.7 SDS 20%

Dodecil sulfato de sódio	20,0 g
Água destilada	100,0 mL

Autoclavar a 121°C, 1 atm, por 10 minutos. Armazenar a temperatura ambiente.

8.2.8 Rnase (Gibco)

Dissolver em 10 mM Tris-HCL 10 mM pH 7,5 e 15 mM NaCl na concentração de 10 mg/mL. Aquecer a 100°C durante 15 minutos e deixar atingir lentamente a temperatura ambiente.

8.2.9 Tris-HCL 10 mM pH7,5

Tris	1,121 g
Água destilada	1000,0 mL

8.2.10 Fenol Tamponado

Fenol (Merck)	50,0 g
Água destilada	10,0 mL
Tris-HCl 1M pH 8.0	1,2 mL
M-Cresol	2,5 mL
Beta-mercaptoetanol	0,1 mL
NaOH 1M	1,5 mL

Ajustar o pH final em $7,8 \pm 0,3$ com solução de HCl 1 M.

8.2.11 Tampão TE

Tris-HCl 1M pH 8.0	1,0 mL [10mM]
EDTA 0,5 M pH 8.0	2,0 mL [1mM]
Água destilada	100,0 mL

8.2.12 Tampão TES

Sacarose 40%	16,75 mL[6,7%]
Tris-HCl 1M pH 8.0	5,0 mL [50mM]
EDTA 0,5 M pH 8.0	0,2 mL [1mM]
Água destilada	100,0 mL

8.2.13 Tampão STET

Sacarose 40%	20,0 mL [8%]
Triton X-100 50%	10,0 mL [5%]
Tris-HCl 1 M pH 8.0	5,0 mL [50mM]
EDTA 0,5 M pH 8.0	10,0 mL [50mM]
Água destilada	100,0 mL

8.2.14 Tampão de lise

Lisozima	40,0 mg
Tampão TES	1,0 mL

8.2.15 Clorofórmio / Álcool isoamílico

A solução clorofórmio / álcool isoamílico deve ser realizada na proporção 24:1; adicionando-se 24 mL de clorofórmio e 1 mL de álcool isoamílico. Armazenar a temperatura ambiente.

8.2.16 Isopropanol (Álcool Isopropílico)

Armazenado a temperatura ambiente e utilizado diretamente.

8.2.17 Álcool 70%

Álcool 100%	70 mL
Água destilada	100 mL

8.3 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose

8.3.1 Agarose 1%

Agarose	1,0 g
Tampão TAE 1x	100,0 mL

8.3.2 Tampão TAE 50x

Tris-HCl	242,0 g
Ácido Acético Glacial	57,1 mL
EDTA 0,5 M pH 8.0	100,0 mL
Água destilada	1000,0 mL

8.3.3 Tampão TAE 1x

Tampão TAE 50x	20,0 mL
Água destilada	1000,0 mL

8.3.4 Tampão de corrida 6x

Azul de bromofenol	0,005 g
Sacarose	0,8 g
Água destilada	2,0 mL

Armazenar a -4°C .

8.4 Reagentes para SDS-PAGE

8.4.1 Gel de poliacrilamida desnaturante 16%

8.4.1.1 Gel de separação

Acrilamida 30%	8,0 mL
4x Tris Cl/SDS pH 8.8	3,75 mL
Persulfato de amônio 10%	0,05 mL
TEMED	0,01 mL
Água destilada	3,25 mL

8.4.1.2 Gel de empilhamento

Acrilamida 30%	0,65 mL
4x Tris Cl/SDS pH 6.8	1,25 mL
Persulfato de amônio 10%	0,025 mL
TEMED	0,005 mL
Água destilada	3,05 mL

8.4.1 Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio	1,0 g
Água destilada	10,0 mL

Distribuir alíquotas e congelar a -4°C.

8.4.2 4x Tris Cl/SDS pH 6,8

Tris base	6,05g
SDS	0,4 g
Água destilada	100,0 mL

Adicionar o Tris base e SDS a 40 mL de água destilada, ajustar o pH com 1N de HCl e completar o volume em 100 mL.

8.4.3 4x Tris Cl/SDS pH 8.8

Tris base	91,0 g
SDS	2,0 g
Água destilada	500,0 mL

Adicionar o Tris base e SDS a 300 mL de água destilada, ajustar o pH com 1N de HCl e completar o volume em 500 mL.

8.4.4 Acrilamida 30%

Acrilamida	30,0 g
Bisacrilamida	0,8 g
Água destilada	100,0 mL

Dissolver o pó em banho maria a 37°C. Armazenar em frasco âmbar à temperatura ambiente.

8.4.5 Tampão de eletroforese 5x SDS

Tris base	15,1 g
Glicina	72,0 g
SDS	5,0 g
Água destilada	1000,0 mL

8.4.6 Tampão de amostra

Tris base	1,52 g
Glicerol	20,0 mL
SDS	2,0 g
2-mercaptoetanol	2,0 mL
Água destilada	100,0 mL

Ajustar o pH em 6,8 com NaCl 1N.

8.4.7 Solução de Coomassie Blue

Metanol	150,0 mL
Coomassie Blue 0,05%	0,015 g
Ácido acético 10%	30,0 mL
Água destilada	120,0 mL

8.4.8 Solução descorante

Metanol	15,0 mL
Ácido acético	21,0 mL
Água destilada	264,0 mL

8.5 - Triagem das cepas provenientes de amostras de água contra cinco bactérias indicadoras.

spp.	Nº ISOLADO	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Corynebacterium fimi</i>
<i>E. faecalis</i>	1,1BII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	1,2 BI	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	1,2 BII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	1,3 BI	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	1,1 CII	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	1,3 AIII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2,1 BII	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2,6B	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	2,6 CI	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
	2,5 AII	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	3,1 BI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3,1 BII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3,2 BII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3,5 BI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3,5 BIII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3,5 BIV	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4,1 BI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4,1 BII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4,3 BI	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	4,3 BII	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	4,5 AI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	5,1 BI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	5,1 BII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	5,2 BI	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	5,2 BII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	5,3 BIII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5,3 BV	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	
5,3 BVI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
5,3 BVIII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
<i>E. faecium</i>	1,2 CII	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
	1,7 AII	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	2,1 BIII	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	2,2 BI	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
	2,2 BII	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	2,3 BI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2,3 BII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2,4 BI	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	2,4 BIV	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	2,4 BVI	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	2,3 CII	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	3,3 BI	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
	3,5 BII	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	3,3 CI	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	3,3 CII	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
	3,5 CII	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	4,3 BIII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4,3 BIV	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	4,1 CI	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	4,1 CII	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	5,1 CI	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	5,1 CII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	5,1 CIII	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	5,1 CIV	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	5,2 A	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	<i>E. mundtii</i>	1,3 AII	(-)	(-)	(+)	(-)
4,5 AII		(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
5,3 BIV		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5,3 BVII		(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
5,3 A		(-)	(-)	(+)	(-)	(-)

8.5 continuação - Triagem das cepas provenientes de amostras de água contra cinco bactérias indicadoras.

spp.	Nº ISOLADO	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Corynebacterium fimi</i>
<i>E. hirae</i>	1.2 CI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	1.2 CII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	1.2 CIII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	1.2 CIV	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	1.2 CV	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	1.2 CVI	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
	2.2 CI	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	2.3 CI	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	3.4 CI	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	3.4 CII	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	3.5 CI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3.7 AI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3.7 AII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3.2 A	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4.3 BV	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4.3 BVI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4.2 CII	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	4.4 C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4.5 CI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4.5 CII	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
5.2 C	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	
2.4 BIII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
<i>E. dispar</i>	1.1 CI	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
	1.4 CI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	1.4 CII	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2.4 BV	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3.2 C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
4.2 CI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	

8.6 - Triagem das cepas provenientes de amostras de fezes de humanos contra cinco bactérias indicadoras.

spp.	nº isolado	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Corynebacterium fimi</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>E. faecalis</i>	7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	10	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	15	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	17	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
	19	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
	20	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	24	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	26	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	27	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
	28	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
	29	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
	33	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	35	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	36	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	37	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	38	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
	43	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
	45	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	46	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
	48	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
	49	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
	52	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
	56	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	57	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	58	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	61	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
	62	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	68	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	71	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	72	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	73	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
	74	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
	76	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
	77	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
	79	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
	80	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
	82	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	83	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
84	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	
85	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	
86	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
87	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	
89	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	
90	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
91	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	
92	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	
94	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
97	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	
98	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	
99	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	
100	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	
101	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	
102	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	
103	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
106	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	
107	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	
108	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	
109	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	
110	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	
112	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
114	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	

8.6 continuação - Triagem das cepas provenientes de amostras de fezes de humanos contra cinco bactérias indicadoras.

spp.	nº isolado	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Corynebacterium fimi</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>E. faecalis</i>	116	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	117	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	118	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	119	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	122	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
	123	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	124	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
	125	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	126	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	127	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
128	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	
<i>E. faecium</i>	1	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
	6	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	11	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	12	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
	18	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
	21	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
	23	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
	31	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
	40	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
	44	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	55	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
	60	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	65	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
	67	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
	69	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	70	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
	75	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
	88	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	104	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
	111	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
113	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
120	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
<i>E. mundtii</i>	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	39	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	42	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	50	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	59	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	64	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	78	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	95	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	115	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	121	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
<i>E. hirae</i>	14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	32	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	81	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

8.7 - Triagem das cepas provenientes de amostras de fezes de suínos contra cinco bactérias indicadoras.

spp.	nº isolados	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Corynebacterium fimi</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>E. faecalis</i>	2A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
	22A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	28A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	32A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	44A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
	46A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	49A	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	50A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	57A	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
	60A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	61A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	62A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	66A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	71A	(+)	(+)	(+)	-	(+)
	73A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	74A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	75A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	87A	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
	89A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	91A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	94A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
	2NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	5NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	17NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	20NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	26NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	27NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	28NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	31NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	42NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	46NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	50NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	54NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	55NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	56NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	63NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	66NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	71NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	72NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	73NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
77NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
79NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
80NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
83NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
85NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
90NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	

8.7 continuação - Triagem das cepas provenientes de amostras de fezes de suínos contra cinco bactérias indicadoras.

spp.	nº isolados	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Corynebacterium fimi</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>E. faecium</i>	11A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	14A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	17A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	19A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	24A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	29A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	36A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	37A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	38A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	42A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	43A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	45A	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
	47A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	56A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	64A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	65A	(+)	(-)	(+)	(+)	-
	68A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	69A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	33NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	34NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	35NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	37NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	41NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	43NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	44NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	45NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	47NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	48NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	52NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	53NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
64NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
74NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
86NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
87NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
88NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
<i>E. hirae</i>	10A	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
	82A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	83A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	85A	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
	86A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	88A	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
	96A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	99A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	100A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	<i>E. dispar</i>	48A	(+)	(+)	(+)	(+)
51A		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
54A		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
55A		(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
78A		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
79A		(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
90A		(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
95A	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	

8.7 continuação - Triagem das cepas provenientes de amostras de fezes de suínos contra cinco bactérias indicadoras.

spp.	nº isolados	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Corynebacterium fimi</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>E. mundtii</i>	4A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	6A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	7A	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	9A	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
	40A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	59A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	80A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	1NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	6NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	7NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	8NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	9NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	10NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	11NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	12NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	13NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	14NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	15NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	16NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	18NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	19NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	21NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	24NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	25NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	29NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	30NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	32NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	36NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	38NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	39NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	40NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	49NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	51NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	57NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
58NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
59NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
60NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
61NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
62NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
65NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
67NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
68NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
69NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
70NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
75NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
76NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
78NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
89NA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	

