UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Papel da interação entre bactérias láticas isoladas de alimentos na produção de bacteriocinas

Sarah Ferraz

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Profª Drª Bernadette D. G. de Melo Franco

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Papel da interação entre bactérias láticas isoladas de alimentos na produção de bacteriocinas

Sarah Ferraz

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Profª Drª Bernadette D. G. de Melo Franco

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da
publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Ferraz, Sarah
F378p Papel da interação entre bactérias láticas isoladas de alimentos na produção de bacteriocinas / Sarah Ferraz. -- São Paulo, 2019.
65 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas daUniversidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Bacteriocinas : microbiologia de alimentos I. T. II. Franco,Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.

576.163 CDD

Sarah Ferraz

Papel da interação entre bactérias láticas isoladas de alimentos na produção de bacteriocinas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
orientador/presidente

_____
1o. examinador

_____
2o. examinador

_____
3o. examinador

_____
4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

Mar sonoro, mar sem fundo, mar sem fim,
A tua beleza aumenta quando estamos sós
E tão fundo intimamente a tua voz
Segue o mais secreto bailar do meu sonho,
Que momentos há em que eu suponho
Seres um milagre criado só pra mim.

Sophia de Mello Breyner Andresen, 1974.

Há três espécies de homens:
os vivos, os mortos e os que andam no mar.

Platão

AGRADECIMENTOS

A Deus, o grande responsável da minha existência, pela oportunidade desta experiência humana para um objetivo maior que é a evolução do meu espírito no caminho do bem, da caridade e do amor.

Aos meus pais, Sergio e Teresinha, por todo o apoio e amor incondicional ao longo desta minha vida.

À Professora Bernadette, pela grande oportunidade de aprendizado, orientação e paciência na realização deste trabalho, muito obrigada!

Ao Svetoslav Todorov pelos ensinamentos e imensa ajuda ao longo deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Professor Decio Zylbersztajn, pela oportunidade da participação em uma de suas disciplinas, compartilhando o seu grande conhecimento sobre o Agronegócio Brasileiro.

À Professora Simone Balian, pela oportunidade de acompanhar as visitas técnicas (Porto de Santos, Centro de aquicultura de tilápias e Ceagesp), pelos ensinamentos e pelas palavras de sabedoria.

Ao Professor Flávio Finardi, pela orientação, ensinamentos e oportunidade de participar como monitora no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Foi uma experiência muito enriquecedora.

Ao Escritório de Desenvolvimento de Carreiras da USP e à Professora Tania Casado pela oportunidade de participar do programa de orientação de carreira.

À Fabiana Kawada, pela orientação de carreira e esclarecimentos e por compartilhar sua vasta experiência no mercado laboral.

Aos Professores Mariza Landgraf e Uelinton Pinto, pelos ensinamentos e sugestões colaborativas.

À Kátia e à Lucia pela amizade, por todo o conhecimento compartilhado e ajuda na realização deste trabalho.

À Gleyce, pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Às amigas Rubia e Jéssica pelo companheirismo, conversas e aprendizado, com certeza nossas amizades atravessarão os portões desta Universidade.

Aos amigos de sempre, Sonia Luisa, Camila Prata e Rodrigo Negrão, obrigada pelas conversas, conselhos e a amizade do coração.

Aos queridos amigos de laboratório, Loredana, Ana Clara, Raquel, Carlos, Daniel, Andressa, Janaína, Ximena, Milagros, Marcelo, Gabriela, Ana Paulina, Josi, Marcela, Débora, Daniele Faria obrigada pela convivência e aprendizado, e em especial à Danielle Maffei pelo conhecimento compartilhado através de algumas de suas aulas ministradas na SBM.

A todos os funcionários da FCF/USP, pela colaboração e convivência.

À Universidade de São Paulo, por oferecer um programa de pós-graduação integrativo, onde nós alunos podemos circular por diferentes áreas de conhecimento e pesquisa, ampliando a nossa visão e possibilidades.

RESUMO

FERRAZ, S. **Papel da interação entre bactérias láticas isoladas de alimentos na produção de bacteriocinas.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 2019.

Bacteriocinas produzidas por bactérias láticas (BAL) apresentam um importante potencial de aplicação na bioconservação de alimentos, por sua ação antimicrobiana contra algumas espécies de microrganismos patogênicos de relevância, como *Listeria monocytogenes.* Este estudo analisou o efeito da interação entre cepas selecionadas de BAL produtoras de bacteriocinas com outras BAL viáveis ou não viáveis (bacteriocinogênicas ou não) na indução da produção de bacteriocinas. O efeito dos metabólitos produzidos por estas cepas na indução da bacteriocinogênese também foi avaliado. As cepas produtoras de bacteriocinas selecionadas para o estudo foram *Lactobacillus sakei* MBSa1, produtora de sakacina A e *Pediococcus acidilactici* ET34, produtora de pediocina, isoladas de salame e salmão defumado, respectivamente. A produção de pediocina por *P. acidilactici* ET34 foi avaliada também em leite em pó desnatado reconstituído, além de meio de cultura (caldo MRS). Os resultados indicaram que, quando em co-cultura com *Enterococcus faecalis* ATCC12755, *Lactobacillus sakei* ATCC15521 ou *Listeria monocytogenes (*cepas 104, 711 e 637), ou na presença do sobrenadante livre de células (SLC) dessas culturas, nenhuma das duas cepas testadas produziu maior quantidade de bacteriocina do que a produzida quando em monocultura ou na ausência do SLC. A bacteriocina produzida por *P. acidilactici* ET34 apresentou um efeito bacteriostático contra *L. monocytogenes* 104 no leite em pó desnatado reconstituído nas 12 h analisadas, com extensão da fase lag, de forma dose-dependente. Os resultados indicaram, também, que *P. acidilactici* ET34 não foi capaz de produzir pediocina no leite em pó desnatado reconstituído quando em monocultura ou em co-cultura, ao contrário do observado para o caldo MRS. Mais investigação é necessária para esclarecer os efeitos de possíveis interações entre as BAL presentes em um alimento, bem como o efeito dos componentes dos alimentos na produção das bacteriocinas pelas BAL bacteriocinogênicas.

Palavras-chave: bactérias láticas, bacteriocinas, co-cultura, interação.

ABSTRACT

FERRAZ, S. **Role of interactions among lactic acid bacteria isolated from foods on production of bacteriocins.** Dissertation (Master). Graduate Program in Food Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, SP, 2019.

Bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) present an important application potential in food biopreservation, by their antimicrobial activity against some species of pathogenic microorganisms of relevance, such as *Listeria monocytogene*s. This study analyzed the effect of the interaction between selected strains of bacteriocin-producing LAB with other viable or non-viable LAB (bacteriocinogenic or not) in the induction of bacteriocin production. The effect of the metabolites produced by these strains on the induction of bacteriocinogenesis was also evaluated. The bacteriocin-producing strains selected for the study were *Lactobacillus sakei* MBSa1, producer of sakacin A and *Pediococcus acidilactici* ET34, producer of pediocin, isolated from salami and smoked salmon, respectively. The production of pediocin by *P. acidilactici* ET34 was also evaluated in reconstituted skimmed milk powder as well as culture medium (MRS broth). The results indicated that when co-cultivated with *Enterococcus faecalis* ATCC12755, *Lactobacillus sakei* ATCC15521 or *Listeria monocytogenes* (strains 104, 711 and 637), or in the presence of the cell free supernatant (SLC) of these cultures, neither of the two strains tested produced greater amount of bacteriocin than that produced in monoculture or in the absence of SLC. The bacteriocin produced by *P. acidilactici* ET34 presented a bacteriostatic effect against *L. monocytogenes* 104 in skimmed milk powder reconstituted in 12h, with extension of lag phase, in a dose-dependent manner. The results also indicated that *P. acidilactici* ET34 was not able to produce pediocin in the reconstituted skimmed milk powder when in monoculture or in co-culture, unlike that observed for the MRS broth. More research is needed to clarify the effects of possible interactions between BAL present in a food and the effect of food components on bacteriocin production by bacteriocinogenic BAL.

Key words: lactic acid bacteria, bacteriocin, co-culture, interaction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos utilizados no estudo.....24

Tabela 2. Quantidades (UA/mL) de bacteriocina produzida por *Lb. sakei* MBSa1 em caldo MRS a 30°C em monocultura e em co-culturas com *E. faecalis* ATCC12755 iniciadas após 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h, com *L. monocytogenes* Scott A como microrganismo indicador de atividade.....36

Tabela 3. Quantidades (UA/mL) de bacteriocina produzida por *Lb. sakei* MBSa1 quando em monocultura e quando co-cultivada com *Lb. sakei* ATCC15521 (teste A) e na presença do filtrado da cultura (teste B) e da cultura inativada pelo calor (teste C) e do SLC da própria cepa (teste D), com o emprego de diferentes cepas de *L. monocytogenes* como indicadoras de atividade.....38

Tabela 4. Quantidades (UA/mL) de bacteriocina produzida por *Lb. sakei* MBSa1 quando em monocultura e quando co-cultivada com *E. faecalis* ATCC12755 (teste E) e na presença do filtrado da cultura (teste F) e da cultura inativada pelo calor (teste G) e do SLC da própria cepa (teste H), com o emprego de diferentes cepas de *L. monocytogenes* como indicadoras de atividade.....41

Tabela 5. Produção de bacteriocina (UA/mL) por *Pediococcus acidilactici* ET34, de acordo com o microrganismo alvo.....44

Tabela 6. Quantidades (UA/mL) de bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici* ET24 quando em monocultura e quando co-cultivado com *Listeria monocytogenes* 104 (teste J) ou *E. faecalis* ATCC12755 (Teste P) e na presença dos filtrados das culturas (testes L e Q, respectivamente) e inativadas pelo calor (testes M e R) e dos SLC (testes N e S, respectivamente).....45

Tabela 7. Densidade Óptica a 600 nm das culturas de *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS contendo diferentes quantidades de SLC de *Pediococcus acidilactici* ET34.....46

Tabela 8. Densidade Óptica a 600 nm das culturas de *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS acrescido de SLC de *P. acidilactici* ET34 com atividade de 240 UA/mL (A), 2133 UA/mL (B), 4266 UA/mL (C) e 5120 UA/mL (D) e os respectivos SLC tratados com protease (A+P, B+P, C+P e D+P).....48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação das bacteriocinas.....17

Figura 2. Curvas de multiplicação de *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS contendo diferentes quantidades de SLC de *Pediococcus acidilactici* ET34.....47

Figura 3. Curvas de multiplicação de *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS acrescido de SLC de *P. acidilactici* ET34 com atividade de 240 UA/mL (A), 2133 UA/mL (B), 4266 UA/mL (C) e 5120 UA/mL (D) e os respectivos SLC tratados com protease (A+P, B+P, C+P e D+P).....49

Figura 4. Contagens de *Listeria monocytogenes* 104 e de *Pediococcus acidilactici* ET34 (Log UFC/mL) quando em co-cultura e em monocultura, em leite em pó desnatado reconstituído e em caldo MRS, após incubação a 37°C por 24 h.....50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

Bacteriocinas 15

Sakacinas 18

Pediocinas 20

Interação entre bactérias láticas e a produção de bacteriocinas 21

2 OBJETIVOS 23

Objetivo geral 23

Objetivos específicos: 23

3 MATERIAL E MÉTODOS 24

3.1. Microrganismos utilizados 24

3.2. Experimentos com a cepa *Lactobacillus sakei* MBSa1 25

3.2.1. Determinação do espectro de ação de *Lb. sakei* MBSa1 25

3.2.2. Preparo das co-culturas e quantificação da atividade antimicrobiana dos SLC obtidos 26

3.2.3. Avaliação do efeito do SLC de *Lb. sakei* MBSa1 na produção de bacteriocinas em monocultura e em co-cultura com *E. faecalis* ATCC12755 27

3.2.4. Avaliação da produção de bacteriocinas por *Lb. sakei* MBSa1 em co-cultura com *Lactobacillus sakei* ATCC15521 e na presença do filtrado da cultura e da cultura inativada pelo calor de *Lb. sakei* ATCC15521 e do SLC de *Lb. sakei* MBSa1 (Quadro-Resumo1) 28

3.2.5. Avaliação da produção de bacteriocinas por *Lb. sakei* MBSa1 em co-cultura com *Enterococcus faecalis* ATCC12755 e na presença do filtrado da cultura e da cultura inativada pelo calor de *E. faecalis* ATCC12755 e do SLC de *Lb. sakei* MBSa1 (Quadro-Resumo 1) 29

3.3. Experimentos com *Pediococcus acidilactici* ET34 30

3.3.1. Determinação da atividade antimicrobiana 30

3.3.2. Avaliação da produção de bacteriocinas por *P. acidilactici* ET34 em co-cultura com *Listeria monocytogenes* 104 e na presença do filtrado da cultura e da cultura inativada pelo calor de *L. monocytogenes* 104 e do SLC de *P. acidilactici* ET34 (Quadro-Resumo 2) 31

3.3.3. Avaliação da produção de bacteriocinas por *P. acidilactici* ET34 em co-cultura com *Enterococcus faecalis* ATCC12755 e na presença do filtrado da cultura e da cultura inativada pelo calor de *E. faecalis* ATCC12755 e do SLC de *P. acidilactici* ET34 (Quadro-Resumo 2) 32

3.3.4 Multiplicação de *L. monocytogenes* 104 em função da atividade do SLC de *Pediococcus acidilactici* ET34 presente 33

3.3.5. Comprovação da natureza proteica do composto inibidor produzido por *P. acidilactici* ET34 34

3.3.6. Teste de inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* 104 e por *Pediococcus acidilactici* ET34 em leite desnatado reconstituído e em caldo MRS 35

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 36

4.1 Experimentos com *Lactobacillus sakei* MBSa1 36

4.2 Experimentos com *Pediococcus acidilactici* ET34 43

5 CONCLUSÕES 52

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53

1 INTRODUÇÃO

Quando as propriedades intrínsecas dos alimentos, tais como conteúdo de proteínas, água, nutrientes e pH, são favoráveis, pode ocorrer a proliferação de microrganismos indesejáveis, causando problemas de segurança e de qualidade. A maior preocupação é sempre relacionada com a saúde do consumidor, pois alguns destes microrganismos contaminantes são capazes de provocar doenças graves, e até levar a vítima a óbito (ELSHAFEI, 2018).

A indústria de alimentos tem grande interesse em compostos naturais para o controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes em seus produtos. Alguns desses compostos naturais, como algumas proteínas de origem bacteriana ativas contra vários microrganismos indesejáveis, têm sido o foco de diversos estudos. Inúmeros trabalhos comprovam que certas cepas de bactérias láticas (BAL), importantes como culturas starter e com atividade probiótica são capazes de produzir proteínas com atividade antimicrobiana (AHN *et al*., 2017, ALBUQUERQUE *et al*., 2017, DE PRISCO *et al*., 2017, DIMITRELLOU *et al*., 2017, LAIÑO *et al*., 2017, RZEPKOWSKA *et al*., 2017, SAELIM *et al*., 2017).

As bactérias láticas (BAL) fazem parte de um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, formado pelos gêneros *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* e *Weissella*. São bactérias não formadoras de esporos, catalase negativas, anaeróbicas facultativas e tolerantes ao oxigênio e pH ácido. São fermentadoras e tem o ácido lático como principal produto da fermentação, podendo ser heterofermentativas ou homofermentativas (SALMINEN *et al*., 2012; MOKOENA, 2017).

As BAL são encontradas no trato gastrointestinal de animais e humanos e também em plantas, frutas, produtos lácteos, carnes, peixe, cereais, vegetais e bebidas fermentadas. Quando presentes nos alimentos contribuem para suas propriedades sensoriais, tecnológicas e nutricionais, e também segurança, inibindo microrganismos patogênicos através da produção de diversos metabólitos antimicrobianos, como ácido lático, peróxido de hidrogênio, diacetil,

reuterina, reutericiclina, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas (MOKOENA, 2017).

Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos sintetizados pelas BAL nos ribossomos e apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas principalmente, mas algumas atuam contra bactérias Gram-negativas também (CHIKINDAS *et al.* 2018).

Embora as bacteriocinas possam ser comparadas aos antibióticos por sua atividade, elas diferem deles em diversos fatores, tais como biossíntese celular e mecanismo de ação. Além disso, as bacteriocinas são mais tolerantes à altas temperaturas quando comparadas aos antibióticos, e também suportam uma faixa de pH mais ampla. Sua natureza proteica e seu modo de ação reduzem as chances das bactérias alvo desenvolverem resistência, já que são rapidamente degradadas pelas proteases digestivas, não havendo tempo para o desenvolvimento de mecanismos de resistência. Além disso, são efetivas mesmo em baixas concentrações. Sua natureza proteica também permite que a atividade contra patógenos seja melhorada através da bioengenharia (O' CONNOR *et al*. 2015).

As bacteriocinas produzidas pelas BAL estão recebendo muita atenção das indústrias de alimentos para sua aplicação como bioconservadores. Apesar das BAL produtoras de bacteriocinas serem consideradas seguras (GRAS – Generally Recognized As Safe) e serem tema de intensa pesquisa, apenas a nisina e a pediocina PA-1 são bacteriocinas autorizadas para uso na indústria de alimentos (BALCIUNAS *et al*., 2013).

A atividade das bacteriocinas produzidas pelas BAL em um alimento não é uniforme e nem constante, pois depende das propriedades intrínsecas do alimento. A redução da atividade pela ação de proteases e outras enzimas presentes nos alimentos e a adsorção das bactérias produtoras ou das bacteriocinas produzidas aos componentes do alimento são os principais fatores interferentes. A multiplicação das BAL e a produção de bacteriocinas

podem ser afetadas pela concentração de sal, assim como pelo tamanho da população do microrganismo alvo (BALCIUNAS *et al*., 2013).

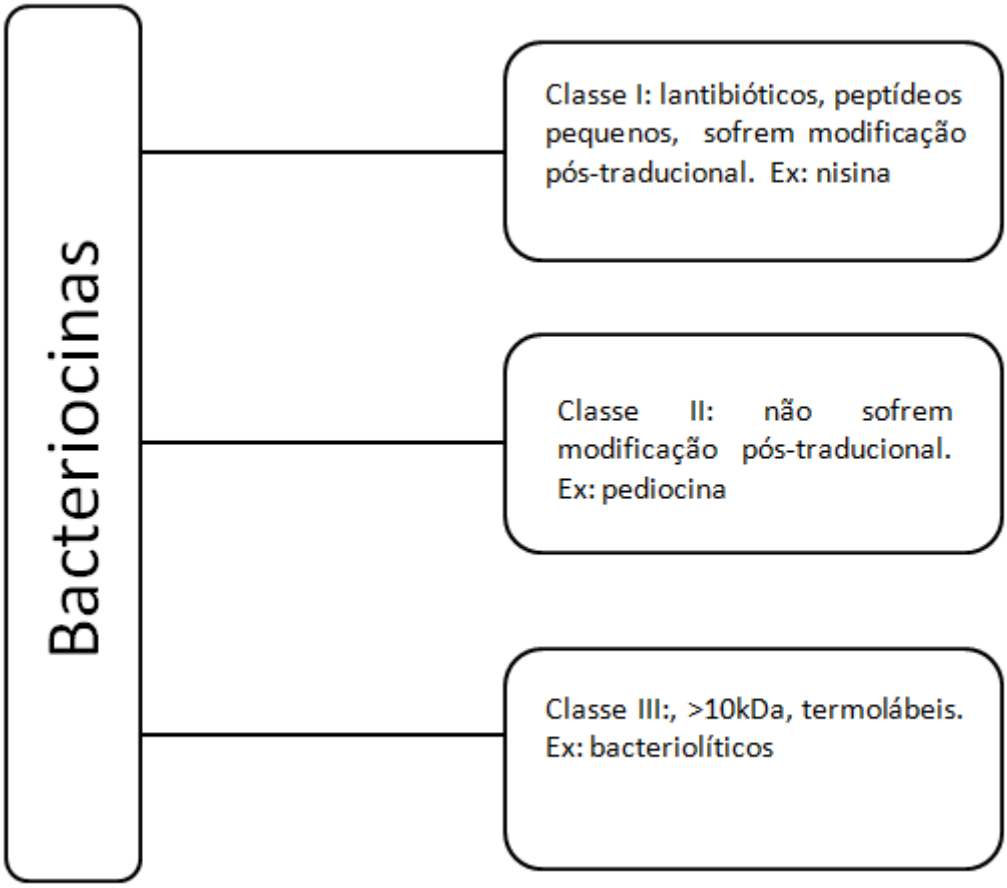
A classificação das bacteriocinas mais conhecida foi feita por Klaenhammer em 1993, e desde então muitas outras formas de classificação foram sugeridas (**Figura 2**), sendo que a mais recente agrupa as bacteriocinas em grupos I, II e III (ALVAREZ-SIEIRO *et al.*, 2016).

As bacteriocinas do grupo I, também chamadas de lantibióticos, são peptídeos pequenos (19-38 aminoácidos) produzidos por uma modificação pós-traducional durante sua biossíntese, da qual resultam aminoácidos incomuns como lantionina e β-metil lantionina. A bacteriocina do grupo I mais estudada é a nisina, que atua formando poros na membrana citoplasmática da célula alvo, desencadeando a dissipação do potencial de membrana e o efluxo de pequenos metabólitos. Outros lantibióticos atuam através da inibição enzimática (COTTER *et al*., 2005; ALVAREZ-SIEIRO *et al.*, 2016).

As bacteriocinas do grupo II são peptídeos também pequenos (36-48 aminoácidos) termoestáveis e que não sofrem modificação pós-traducional. Elas atuam aumentando a permeabilidade da membrana celular, ocasionando a saída de íons e a diminuição de ATP intracelular. O grupo II está subdividido em IIa, formado pelas pediocinas, constituídas de 37 a 48 aminoácidos com uma ou duas pontes de dissulfeto, com espectro de ação específico contra *Listeria*; e IIb, composto por bacteriocinas formadas por dois peptídeos, sendo necessário que atuem de forma combinada para que a dissipação do potencial de membrana da célula alvo ocorra (COTTER *et al*., 2005; ALVAREZ-SIEIRO *et al.*, 2016).

As bacteriocinas do grupo III têm peso molecular acima de 10 kDa e são termolábeis. O modo de ação é distinto das demais bacteriocinas, pois provocam a lise da parede celular bacteriana por hidrólise. Elas contêm uma porção N-terminal, com ação de endopeptidase, e uma porção C-terminal responsável pelo reconhecimento do receptor da membrana da célula alvo (COTTER *et al*., 2005; ALVAREZ-SIEIRO *et al.*, 2016).

Figura 2. Classificação das bacteriocinas.



Fonte: Adaptado de Alvarez-Sieiro et al., 2016.

As bacteriocinas podem ter efeito bactericida, com ou sem lise celular, ou bacteriostático, inibindo a multiplicação celular. A ação antimicrobiana da maioria das bacteriocinas produzidas pelas BAL, principalmente as que têm efeito contra bactérias Gram-positivas, tem como alvo a membrana celular. Vários lantibióticos e algumas bacteriocinas classe II inibem a biossíntese do peptidioglicano da membrana, pois ligam-se ao lipídio II, que é uma molécula intermediária desta biossíntese. Outras bacteriocinas usam o lipídio II como uma molécula de ancoragem para facilitar a formação de poros, resultando em variação do potencial na membrana citoplasmática e morte celular (SILVA *et al.,* 2018).

A principal aplicação das bacteriocinas é como conservador de alimentos, mas outros usos vêm sendo explorados, principalmente em produtos para cuidado da saúde humana e animal, às vezes em combinação com outros antimicrobianos já existentes no mercado. As áreas de interesse potenciais incluem saúde oral, da pele, respiratória, gastrointestinal, urogenital e outras infecções. Além da atividade anti-viral, as bacteriocinas também podem ser usadas no controle de bactérias infecciosas no tratamento pós-cirúrgico. Outro campo de investigação é o uso de bacteriocinas como agentes anti-câncer (CHIKINDAS *et al*. 2018).

Sakacinas

As sakacinas são bacteriocinas produzidas por certas cepas de *Lactobacillus sakei*, um microrganismo frequentemente encontrado em produtos fermentados. Assim como *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus garviae*, a espécie *Lb. sakei* só foi reconhecida como tal no início do século XXI, havendo alguns relatos de reclassificação de cepas pertencentes a essas espécies (KOORT *et al*., 2004).

Lb. sakei é uma BAL amplamente utilizada como cultura starter na fabricação de produtos fermentados (HUGAS & MONFORT, 1997, CARR *et al.,* 2002). Chaillou et al. (2005) determinaram a sequência completa do genoma da cepa *Lb. sakei* 23k isolada de linguiça, mostrando que a cepa possui um repertório metabólico especializado, que pode explicar a sua capacidade competitiva nesses alimentos. A cepa tem também um potencial biotecnológico como bioconservante por meio da produção vários compostos antimicrobianos, como ácidos lático e acético, diacetil e peróxido de hidrogênio, além das sakacinas (CARR *et al*., 2002).

As sakacinas mais conhecidas são a sakacina M, sakacina C2, sakacina P e sakacina LSJ618 (SOBRINO *et al.* 1992, GAO *et al.* 2010, DE CARVALHO *et al.* 2010, JIANG *et al.* 2012, BARBOSA *et al*., 2014). Alguns estudos mostraram que determinadas cepas de *Lb. sakei* isoladas de alimentos têm aplicação como bioconservante de alimentos (SCHILLINGER *et al*., 1989, SOBRINO *et al*., 1992, HOLCK *et al*., 1994, HUGAS *et al*., 1998, AXELSSON

et al., 2003, PETERNEL *et al*., 2010, MARTINEZ *et al*., 2005, TODOROV *et al*., 2011, JIANG *et al*., 2012, SAWA *et al*., 2013, BARBOSA *et al*., 2014, GAO *et al*., 2015, ZOMMITI *et al*., 2016, MECHOUD *et al*., 2017.

A cepa *Lactobacillus sakei* MBSa1, isolada de salame no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP, é capaz de produzir uma bacteriocina ativa contra várias cepas de *Listeria monocytogenes*, um importante patógeno em alimentos (BARBOSA *et al*., 2014). Foi observado que a produção máxima da bacteriocina MBSa1 em caldo MRS ocorre a 25°C, no final da fase log de multiplicação. A 30°C ou 37°C a produção da bacteriocina MBSa1 foi mais baixa, tal como observado para outras sakacinas, como a sakacina A, produzida por *Lb. sakei* Lb796 (SCHILLINGER & LUCKE, 1989) e a sakacina P, produzida por outra cepa de *Lb. sakei* (URSO *et al*., 2006).

Após a purificação por troca catiônica, interação hidrofóbica sequencial e cromatografia de fase reversa (BARBOSA *et al*., 2014), observou-se que a bacteriocina produzida por *Lb. sakei* MBSa1 apresenta similaridade estrutural com sakacina A (HOLCK *et al.* 1992), sakacina P, sakacina 5X e sakacina 5T (VAUGHAN *et al.* 2001). A sequência C-terminal e a massa molecular da bacteriocina MBSa1 foram idênticas às encontradas para sakacina A (BARBOSA *et al*., 2014). A amplificação do DNA mostrou que *Lb. sakei* MBSa1 não contém os genes relacionados com a produção das sakacinas Tα, Tβ, Q, X, P e G.

Em 1996, Remiger et al. (1996) observaram que o gene responsável pela síntese da bacteriocina produzida por *Lb. sake* CTC494, quando amplificado por PCR com primers para curvacina A (CurA-F/CurA-R), apresentava homologia com o gene da curvacina produzida por *Lb. curvatus* LTHI174 (GenBank número de acesso AB292465.1). Como a sakacina K produzida por *Lb. sakei* CTC494 (AYMERICH *et al.,* 2000) é idêntica à curvacina A e à sakacina A, é possível concluir que a bacteriocina MBSa1 é idêntica às sakacinas A e K e também à curvacina A.

Pediocinas

As pediocinas são bacteriocinas produzidas por *Pediococcus* spp. Estas bactérias possuem aplicação tecnológica como culturas starter e adjuvantes no processo de fermentação de alguns produtos alimentícios como produtos cárneos e vegetais, sendo *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* as espécies mais importantes (SINGLA *et al.*, 2017). Algumas cepas de *Pediococcus* sp são produtoras de bacteriocinas, como *P. pentosaceus* KC692718 (SUGANTHI *et al*., 2015), *P. pentosaceus* 05-10 (HANG *et al*., 2009), *P. pentosaceus* K34 (ABRAMS *et al*., 2011), *P. acidilactici* HA-611-2 (ALBANO *et al*., 2007), *P. acidilactici* HA-5692-3 (ALBANO *et al*., 2009), *P. pentosaceus* BCC3772 (KINGCHA *et al*., 2012), *P. acidilactici* ALP57 (PINTO *et al*., 2009) e *P. pentosaceus* ST65ACC (CAVICCHIOLI *et al*., 2017).

As pediocinas são bacteriocinas do tipo IIa, são termoestáveis e têm atividade antimicrobiana em uma ampla faixa de pH, podendo ser utilizadas como substituto potencial da nisina. As pediocinas mais conhecidas são pediocina PA-1 produzida, por *P. acidilactici* PAC1.0 (GONZALEZ & KUNKA, 1987) e pediocina AcH, produzida por *P. acidilactici* H (BHUNIA *et al.,* 1991). Há um produto fermentado comercial, denominado “Alta 2341”, da Kerry Bioscience, Irlanda que apresenta atividade anti-listeria, sendo *Listeria* o principal alvo das pediocinas. (GARSA, *et al.,* 2014, PORTO *et al.,* 2017, SINGLA *et al.,* 2017).

As pediocinas têm um espectro de ação amplo, sendo efetivas contra patógenos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp. e também Gram-negativos como *Escherichia coli, Vibrio parahaemolyticus, Pseudomonas* spp. e *Salmonella* Typhimurium (PORTO *et al*., 2017). Garg & Kaur (2015) mostraram que a pediocina também tem atividade contra os fungos *Aspergillus, Rhizopus, Penicillium*. A pediocina ganhou destaque principalmente por sua ação contra *Listeria monocytogenes,* um patógeno ubíquo frequentemente presente em alimentos prontos para consumo e causador da listeriose, que pode resultar em aborto em gestantes e meningites entre outras afecções (SINGLA *et al.,* 2017). Huang et al. (2009) mostraram que *P. pentosaceus* 05-10, um produto vegetal fermentado chinês (*pickles* Sichuan) teve efeito bactericida contra *L.*

monocytogenes 54002 em presunto mantido sob refrigeração a 4ºC por 10 dias. Jang et al. (2015) observaram que *P. pentosaceus* T1, isolado de kimchi (vegetal fermentado coreano), produz uma pediocina mais ativa do que a nisina. Esta pediocina, na concentração de 20mg/mL, foi capaz de reduzir a população de *L. monocytogenes* de 10^7 UFC/mL para 10^3 UFC/mL em filé de salmão cru mantido a 4ºC por 24 h, observando que concentrações de nisina acima de 20mg/mL eram necessárias para atingir o mesmo efeito. Somkuti & Steinberg (2010) observaram que *P. acidilactici* F foi capaz de produzir bacteriocina (3.200 UA/mL) contra *L. monocytogenes* Scott A quando em co-cultivo com *Lactobacillus delbrueki* subsp. *bulgaricus* ou com *Streptococcus thermophilus* em leite, o que não ocorreu em monocultura. Kingcha et al. (2012) reportaram que a cepa bacteriocinogênica *P. pentosaceus* BCC3772 causou uma redução de 3,2 log UFC/g na contagem de células de *L. monocytogenes* ATCC191.5 em Nhan, um tipo de salsicha suína da Tailândia.

Interação entre bactérias láticas e a produção de bacteriocinas

As interações entre microrganismos são estudadas em co-culturas, situação em que duas ou mais cepas são cultivadas com algum grau de contato entre elas (GOERS *et al*., 2014). Quando em co-cultura, uma das cepas pode ter melhores possibilidades de sobreviver do que a outra, através da produção de bacteriocinas, por exemplo, obtendo vantagens competitivas (SMID & LACROIX, 2012). Existem mecanismos de comunicação célula-célula, dependente de uma determinada quantidade de células (*quorum*), que parecem estar envolvidos na indução da produção de bacteriocinas. A regulação da produção de bacteriocinas é feita pelo sistema de três componentes: peptídeo indutor, receptor de membrana histidina-quinase e o regulador de resposta. O peptídeo indutor é produzido e exportado para fora da célula, quando esse peptídeo indutor atinge um limiar de concentração específico (*quorum*), eles se ligam ao receptor de membrana histidina-quinase ocorrendo a fosforilação da histidina e o regulador de resposta ativando a expressão do gene produtor de bacteriocina (CHANOS & MYGIND, 2016).

Liu et al. (2006) mostraram que a produção de nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aumentou em 85% quando em co-cultura com

Saccharomyces cerevisiae CL01. Man et al. (2012) também observaram que *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391, quando em co-cultura com *Enterococcus faecalis* KLDS4.0313, produziu maior quantidade de plantaricina MG do que em monocultura. Tabasco et al. (2007) mostraram que *Lactobacillus acidophilus* La-5, produtor de bacteriocina, afetou a viabilidade de *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* LBY-27 em leite fermentado. Também Ruiz-Barba et al. (2010) relataram que a produção de bacteriocina por *Lb. plantarum* NC8 foi induzida em co-culturas com *Enterococcus faecium* 6T1a-20 ou *Pediococcus pentosaceous* FBB63, melhorando sua sobrevivência durante a fermentação de azeitonas.

Os resultados destes estudos sugerem que a produção de bacteriocinas pode ser mediada por um sistema de *quorum sensing*, (COTTER *et al*. 2005). A presença de determinadas bactérias láticas pode ser um estímulo ambiental para uma resposta adaptativa de outras bactérias presentes no mesmo meio, com produção de bacteriocinas, como observado por Man et al. (2012) para *Lb. plantarum* KLDS1.0391, cuja produção de bacteriocina pode ter sido regulada por cepas indutoras presentes.

Dada a escassez de informações sobre a produção de bacteriocinas em co-culturas, esse trabalho de mestrado objetivou avaliar a produção de bacteriocinas por cepas de bactérias láticas bacteriocinogênicas quando em co-cultura com outras bactérias láticas isoladas de alimentos, produtoras ou não de bacteriocinas, e quando em contato com metabólitos produzidos por estas cepas e pelas próprias cepas bacteriocinogênicas. O estudo objetivou também testar se o possível aumento de produção de bacteriocinas em consequência da interação poderia ser reproduzida *in situ*, selecionando-se leite desnatado como modelo. Para o estudo, foram selecionadas as cepas bacteriocinogênicas *Lactobacillus sakei* MBSa1, isolada de salame (BARBOSA et al, 2014) e *Pediococcus acidilactici* ET34, isolada de salmão (TODOROV *et al.,* 2011, TOMÉ *et al.,* 2007).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar se a produção de bacteriocina por cepas bacteriocinogênicas é afetada pela presença de outras bactérias láticas (viáveis ou não, produtoras de bacteriocinas ou não) ou de algum metabólito produzido por estas cepas.

Objetivos específicos:

- Verificar se, quando em co-cultura com outras bactérias láticas, há alteração na quantidade de bacteriocina produzida pelas cepas bacteriocinogênicas selecionadas;
- Verificar a influência do sobrenadante livre de células (SLC) das cepas bacteriocinogênicas selecionadas na quantidade de bacteriocina produzida por estas cepas;
- Verificar a influência da filtração e da inativação pelo calor da cultura da bactéria empregada em co-cultura na quantidade de bacteriocina produzida pelas cepas bacteriocinogênicas selecionadas;
- Verificar se a inibição de *Listeria monocytogenes* é resultante da ação de bacteriocinas ou de outros metabólitos produzidos pela cepa bacteriocinogênica *Pediococcus acidilactici* ET34;
- Verificar a inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* em um modelo alimentar (leite desnatado reconstituído) pela ação da bacteriocina produzida pela cepa *Pediococcus acidilactici* ET34 quando em co-cultivo com o patógeno, comparando-se com o observado em caldo MRS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos utilizados

O estudo foi desenvolvido com as cepas listadas na **Tabela 1** pertencentes ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, mantidas a -80ºC em caldo MRS (Oxoid, UK), acrescido de 20% (v/v) de glicerol como crioprotetor. Antes da utilização, as cepas de bactérias láticas foram reativadas em caldo MRS (30°C/24 h) e as demais cepas em caldo BHI, (Oxoid, UK) ou TSB (Oxoid, UK) (37°C/24 h).

Tabela 1. Microrganismos utilizados no estudo

Microrganismo	Procedência
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* 2a	LMA/FCF/USP*
Lactobacillus sakei ATCC15521	ATCC**
Lactobacillus sakei MBSa1	LMA/FCF/USP*
Lactobacillus acidophilus Lac4	LMA/FCF/USP*
Lactobacillus curvatus Rita1	LMA/FCF/USP*
Lactobacillus curvatus MBSa3	LMA/FCF/USP*
Lactobacillus plantarum MBSa4	LMA/FCF/USP*
Lactobacillus plantarum V69	LMA/FCF/USP*
Lactococcus lactis subsp. *lactis* DF2Mi	LMA/FCF/USP*
Lactococcus lactis subsp. *lactis* DF3Mi	LMA/FCF/USP*
Lactococcus lactis subsp. *lactis* DF4Mi	LMA/FCF/USP*
Lactococcus lactis subsp. *lactis* DF5Mi	LMA/FCF/USP*
Lactococcus lactis subsp. *lactis* V94	LMA/FCF/USP*
Pediococcus acidilactici ET34	ICTA/CIENS/UCV***
Listeria monocytogenes Scott A	LMA/FCF/USP*
Listeria monocytogenes 104	LMA/FCF/USP*
Listeria monocytogenes 711	LMA/FCF/USP*
Listeria monocytogenes 637	LMA/FCF/USP*
Listeria monocytogenes ATCC7644	ATCC**
Enterococcus faecium S100	AGRIS****

Enterococcus faecalis ATCC12755	ATCC**
Streptococcus thermophilus 170v	LMA/FCF/USP*
Staphylococcus aureus ATCC29213	ATCC**

*LMA/FCF/USP – Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

**ATCC: American Type Culture Collection, Virginia, EUA.

*** ICTA/CIENS/UCV – Instituto de Ciencia y Tecnologia de Alimentos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

****AGRIS – Agenzia per la Ricerca in Agricoltura, Sardenha, Itália.

As cepas de *Lactobacillus, Lactococcus* e *Pediococcus* descritas na **Tabela 1** foram testadas (ou confirmadas, conforme a cepa) quanto à produção de bacteriocinas pela técnica *spot-on-the-lawn* modificado, conforme realizado por Rojo-Bezares et al. (2007), empregando-se *Listeria monocytogenes* Scott A como microrganismo indicador de atividade. Nos testes, 100 µL das culturas de 24 h em caldo MRS foram transferidos para um novo tubo contendo 10 mL de caldo MRS, incubando-se a 30°C por 18 a 24 h. Em seguida, 2 µL desta cultura foram adicionados na forma de um *spot* para a superfície de placas de petri contendo ágar TSA (Oxoid, UK) suplementado com extrato de levedura a 0,6% (YE, Oxoid, UK) (TSAYE). Após a incubação a 30°C por 24 h, a superfície do meio de cultura foi coberta com 5 mL de BHI semi-sólido [BHI acrescido de ágar bacteriológico a 0,8% (Oxoid, UK)] contendo 10^6 UFC/mL da cultura de *L. monocytogenes* Scott A preparada em caldo TSB (37°C por 24 h). As placas foram incubadas a 30°C por 24 h e analisadas quanto à presença do halo de inibição ao redor do *spot* das culturas em teste.

3.2. Experimentos com a cepa *Lactobacillus sakei* MBSa1

3.2.1. Determinação do espectro de ação de *Lb. sakei* MBSa1

A atividade antimicrobiana da cepa *Lb. sakei* MBSa1, sabidamente produtora de sakacina A (BARBOSA *et al.*, 2014), foi testada contra as

bactérias listadas na **Tabela 1**, empregando-se a técnica de *spot-on-the-lawn* modificado que foram realizados conforme Rojo-Bezares et al. (2007).

3.2.2. Preparo das co-culturas e quantificação da atividade antimicrobiana dos SLC obtidos

De acordo com os resultados dos testes descritos no item 3.2.1, as cepas *Enterococcus faecalis* ATCC12755 e *Lb. sakei* ATCC 15521 foram selecionadas para os testes de co-cultura, que foram realizados conforme realizado por Rojo-Bezares et al. (2007). Foram preparados sete frascos com 50 mL de caldo MRS, adicionando-se a todos 1 mL de uma cultura de *Lb. sakei* MBSa1, preparada em caldo MRS a 30°C por 24 h.

Após 2 h, a um dos frascos com a cultura de *Lb. sakei* MBSa1 adicionou-se 1 mL de uma cultura de *E. faecalis* ATCC12755 preparada em caldo TSB a 37°C por 24 h de forma a atingir a população de 10^7 UFC/mL. O tamanho exato da população de *E. faecalis* ATCC12755 foi determinado por semeadura em ágar MRS e incubação a 37ºC por 24 h. Os seis frascos remanescentes contendo a cultura de *Lb. sakei* MBSa1 foram empregados para o preparo das demais co-culturas, com adição da cultura de *E. faecalis* ATCC12755 após 4, 6, 8, 10, 12 ou 24 h.

Os sete frascos com as co-culturas foram incubados a 30°C pelo tempo necessário para atingir a densidade óptica a 600 nm (OD 600 – Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000, UK) correspondente a 10^8 UFC/mL (cerca de 24 h). Em seguida, 10 mL de cada uma das sete co-culturas foram transferidos para tubos Falcon (Greiner Bio-One, Germany), aquecidos em banho-maria (MP-BRÜ/7U, Julabo, Germany) a 100°C por 10 min, e centrifugados a 2067xg por 15 min (centrífuga 6-16K, Sigma, Germany). Dez mL de cada sobrenadante livre de células (SLC) resultante foram removidos e transferidos para novos tubos estéreis e submetidos à concentração no Speed-Vac (Termo Fisher Scientific, EUA), restando 1 mL de SLC. O mesmo procedimento foi adotado para a monocultura de *Lb. sakei* MBSa1 e para o caldo MRS sem microrganismos, utilizados como controles nos experimentos seguintes.

A atividade antimicrobiana dos SLC das co-culturas e da monocultura de *Lb. sakei* MBSa1 foi determinada pelo método da diluição crítica, conforme realizado por Barbosa et al. (2014), empregando *L. monocytogenes* Scott A como microrganismo indicador de atividade.

Os SLC foram submetidos à diluição seriada 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128 em 100 mM tampão fosfato pH 7,4 (PBS), empregando-se placas de microtitulação de 96 poços (Cralplast, Cotia, São Paulo) Em seguida, alíquotas de 50 µL de cada diluição foram adicionadas a poços perfurados em placas com TSAYE suplementado com BHI semissólido a 0,8% contendo 10^6 UFC/mL de *L. monocytogenes* Scott A. Para cada teste foram preparadas três placas (triplicata). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para observação da formação de halos de inibição em torno dos poços. A atividade antimicrobiana foi expressa em Unidades Arbitrárias (UA/mL), correspondente à recíproca da maior diluição que resultou em um claro halo de inibição de *L. monocytogenes* Scott A, dividido por 10 devido à concentração 10x do material no Speed-Vac. O experimento foi realizado uma vez.

3.2.3. Avaliação do efeito do SLC de *Lb. sakei* MBSa1 na produção de bacteriocinas em monocultura e em co-cultura com *E. faecalis* ATCC12755

A indução da produção de bacteriocina por *Lb. sakei* MBSa1 pela bacteriocina presente no SLC da própria cepa quando em monocultura e quando em co-cultura com *E. faecalis* ATCC12755 foi avaliada de acordo com Maldonado et al. (2004a). Adicionou-se 100 µl do SLC da co-cultura *Lb. sakei* MBSa1 + *E. faecalis* ATCC12755 à 1 mL de caldo MRS contendo 10^8 UFC/mL de *Lb. sakei* MBSa1, incubando-se a 30°C por 24 h. A mistura foi submetida à centrifugação a 10000xg a 4°C por 10 min e filtração a 0,22 µm (Filtro K18-230, Kasvi, Brasil). A quantidade de bacteriocina nos SLC obtidos foi quantificada através do método da diluição crítica, conforme feito por Barbosa et al. (2014), já descrito no item 3.2.2. As mesmas metodologias foram utilizadas no preparo e determinação da atividade do SLC da monocultura de *Lb. sakei* MBSa1. O experimento foi realizado uma vez.

3.2.4. Avaliação da produção de bacteriocinas por *Lb. sakei* MBSa1 em co-cultura com *Lactobacillus sakei* ATCC15521 e na presença do filtrado da cultura e da cultura inativada pelo calor de *Lb. sakei* ATCC15521 e do SLC de *Lb. sakei* MBSa1 (Quadro-Resumo1)

Três alíquotas de 400 µL da cultura de *Lb. sakei* ATCC15521 em caldo MRS contendo cerca de 10^7 UFC/mL foram transferidas para 3 tubos contendo 20 mL cada de caldo MRS e incubados a 25°C por 24 h. Um dos tubos foi centrifugado a 5000xg por 10 minutos e filtrado a 0,22 µm (Filtro K18-230, Kasvi, Brasil) para obtenção do filtrado da cultura. O outro tubo com a cultura foi submetido à autoclavação a 121°C por 15 minutos, para obtenção da cultura inativada pelo calor. O terceiro tubo não foi submetido a nenhum tratamento.

Para obtenção do SLC de *Lb. sakei* MBSa1, 400 µL da cultura em MRS foram transferidos a um tubo contendo 20 mL de caldo MRS, que foi incubado a 25°C por 24 h. A cultura obtida foi centrifugada a 5000xg por 10 min e o pH do sobrenadante foi ajustado para 6,0-7,0. O sobrenadante neutralizado foi aquecido em banho-maria a 80 °C por 10 min e filtrado a 0,22 µm (Filtro K18-230, Kasvi, Brasil). A atividade antimicrobiana deste material foi mensurada pelo método de diluição crítica (BARBOSA *et al*., 2014) conforme descrito no item 3.2.2.

Para os experimentos foram preparados 17 tubos com 8 mL de caldo MRS e 1 mL de uma cultura de *Lb. sakei* MBSa1 contendo 10^5 UFC/mL. Os tubos foram divididos em quatro séries de quatro tubos cada, que foram utilizados no seguinte protocolo experimental:

- **Teste A**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL da cultura viva de *Lb. sakei* ATCC15521, diluída de forma a conter 10^7 UFC/mL, 10^6 UFC/mL, 10^5 UFC/mL e 10^4 UFC/mL.
- **Teste B**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL do filtrado da cultura de *Lb. sakei* ATCC15521 diluída 0x, 10x, 100x e 1000x.
- **Teste C**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL da cultura de *Lb. sakei* ATCC15521 inativada por autoclavação, diluída 0x, 10x, 100x e 1000x.

- **Teste D**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL do SLC de *Lb. sakei* MBSa1, diluído 0x, 10x, 100x e 1000x.

O 17º tubo continha apenas a monocultura de *Lb. sakei* MBSa1 (controle). Todos os tubos foram incubados a 25°C por 24 h, obtendo-se o SLC de cada cultura conforme descrito anteriormente. A atividade antimicrobiana do SLC foi mensurada pelo método de diluição crítica (BARBOSA *et al*., 2014) descrito anteriormente, empregando *L. monocytogenes* 104, *L. monocytogenes* 637, *L. monocytogenes* 711 e *L. monocytogenes* ATCC7644, como indicadores de atividade. O experimento foi realizado uma vez.

3.2.5. Avaliação da produção de bacteriocinas por *Lb. sakei* MBSa1 em co-cultura com *Enterococcus faecalis* ATCC12755 e na presença do filtrado da cultura e da cultura inativada pelo calor de *E. faecalis* ATCC12755 e do SLC de *Lb. sakei* MBSa1 (Quadro-Resumo 1)

Estes testes foram realizados utilizando-se o mesmo protocolo experimental descrito em 3.2.4, substituindo-se *Lb. sakei* ATCC15521 por *Enterococcus faecalis* ATCC12755, ou seja:

- **Teste E**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL da cultura viva de *E. faecalis* ATCC12755, diluída de forma a conter 10^7 UFC/mL, 10^6 UFC/mL, 10^5 UFC/mL e 10^4 UFC/mL.
- **Teste F**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL do filtrado da cultura de *E. faecalis* ATCC12755 diluída 0x, 10x, 100x e 1000x.
- **Teste G**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL da cultura de *E. faecalis* ATCC12755 inativada por autoclavação, diluída 0x, 10x, 100x e 1000x.
- **Teste H:** a quatro tubos adicionou-se 1 mL do SLC de *Lb. sakei* MBSa1, diluído 0x, 10x, 100x e 1000x.

O 17º tubo continha apenas a monocultura de *Lb. sakei* MBSa1 (controle). Todos os tubos foram incubados a 25°C por 24 h, obtendo-se o SLC de cada cultura conforme descrito anteriormente. A atividade antimicrobiana do SLC foi mensurada pelo método de diluição crítica (BARBOSA *et al*., 2014) descrito anteriormente, empregando *L. monocytogenes* 104, *L. monocytogenes*

637, *L. monocytogenes* 711 e *L. monocytogenes* ATCC7644 como indicadores de atividade. O experimento foi realizado uma vez.

Quadro-resumo 1: Experimentos com *Lactobacillus sakei* MBSa1

Lb. sakei MBSa1 e *Lb. sakei* ATCC15521	Teste A	cultura de *Lb. sakei* MBSa1 + **cultura viva** de *Lb. sakei* ATCC15521
	Teste B	cultura de *Lb. sakei* MBSa1 + **filtrado da cultura** de *Lb. sakei* ATCC15521
	Teste C	cultura de *Lb. sakei* MBSa1 + **cultura inativada** de *Lb. sakei* ATCC15521
	Teste D	cultura de *Lb. sakei* MBSa1 + **SLC** de *Lb. sakei* MBSa1
Lb. sakei MBSa1 e *E. faecalis* ATCC12755	Teste E	cultura de *Lb. sakei* MBSa1 + **cultura viva** de *E. faecalis* ATCC12755
	Teste F	cultura de *Lb. sakei* MBSa1 + **filtrado da cultura** de *E. faecalis* ATCC12755
	Teste G	cultura de *Lb. sakei* MBSa1 + cultura **inativada** de *E. faecalis* ATCC12755
	Teste H	cultura de *Lb. sakei* MBSa1 + **SLC** de *Lb. sakei* MBSa1

3.3. Experimentos com *Pediococcus acidilactici* ET34

3.3.1. Determinação da atividade antimicrobiana

A cepa *Pediococcus acidilactici* ET34, isolada de salmão, sabidamente produtora de bacteriocinas ativas contra *Listeria monocytogenes* (TODOROV *et al.,* 2011, TOMÉ *et al.,* 2007) foi submetida aos mesmos testes realizados com *Lb. sakei* MBSa1.

Para quantificação da atividade antimicrobiana de *P. acidilactici* ET34, uma alíquota de 1 mL de uma cultura obtida em caldo MRS por 24 h a 37ºC foi submetida à centrifugação de 5000xg por 10 min e o sobrenadante aquecido a 80°C por 10 min. A quantificação da atividade antimicrobiana foi realizada através do método de diluição crítica (BARBOSA *et al*., 2014) descrito anteriormente, utilizando *Listeria monocytogenes* 711, *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* 637, *E. faecalis* ATCC12755, *S. aureus* ATCC29213 e *Lb. sakei* ATCC15521 como indicadores de atividade.

3.3.2. Avaliação da produção de bacteriocinas por *P. acidilactici* ET34 em co-cultura com *Listeria monocytogenes* 104 e na presença do filtrado da cultura e da cultura inativada pelo calor de *L. monocytogenes* 104 e do SLC de *P. acidilactici* ET34 (Quadro-Resumo 2)

Com base nos resultados dos testes descritos no item 3.3.1, as cepas *Listeria monocytogenes* 104 e *Enterococcus faecalis* ATCC12755 foram selecionadas para os testes de co-cultura com *P. acidilactici* ET34.

Para os experimentos com *Listeria monocytogenes* 104, foram preparados 17 tubos com 8 mL de caldo MRS e 1 mL de uma cultura de *P. acidilactici* ET34 contendo 10^5 UFC/mL. Os tubos foram divididos em quatro séries de quatro tubos cada, que foram utilizados no seguinte protocolo experimental:

- **Teste J**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL da cultura viva de *L. monocytogenes* 104, diluída de forma a conter 10^7 UFC/mL, 10^6 UFC/mL, 10^5 UFC/mL e 10^4 UFC/mL;
- **Teste L**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL do filtrado da cultura de *L. monocytogenes* 104 diluída 0x, 10x, 100x e 1000x;
- **Teste M**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL da cultura de *L. monocytogenes* 104 inativada por autoclavação, diluída 0x, 10x, 100x e 1000x;
- **Teste N**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL do SLC de *P. acidilactici* ET34, diluído 0x, 10x, 100x e 1000x.

O 17º tubo continha apenas a monocultura de *P. acidilactici* ET34 (controle). Todos os tubos foram incubados a 25°C por 24 h, obtendo-se o SLC

de cada cultura conforme descrito anteriormente. A atividade antimicrobiana do SLC foi mensurada pelo método de diluição crítica (BARBOSA *et al*., 2014) descrito anteriormente, empregando-se somente *L. monocytogenes* 104 como indicador de atividade. O experimento foi realizado uma vez.

3.3.3. Avaliação da produção de bacteriocinas por *P. acidilactici* ET34 em co-cultura com *Enterococcus faecalis* ATCC12755 e na presença do filtrado da cultura e da cultura inativada pelo calor de *E. faecalis* ATCC12755 e do SLC de *P. acidilactici* ET34 (Quadro-Resumo 2)

Para os experimentos com *Enterococcus faecalis* ATCC12755, foram preparados 17 tubos com 8 mL de caldo MRS e 1 mL de uma cultura de *P. acidilactici* ET34 contendo 10^5 UFC/mL. Os tubos foram divididos em quatro séries de quatro tubos cada, que foram utilizados no seguinte protocolo experimental:

- **Teste P:** a quatro tubos adicionou-se 1 mL da cultura viva de *E. faecalis* ATCC12755, diluída de forma a conter 10^7 UFC/mL, 10^6 UFC/mL, 10^5 UFC/mL e 10^4 UFC/mL;
- **Teste Q**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL do filtrado da cultura de *E. faecalis* ATCC12755 diluída 0x, 10x, 100x e 1000x;
- **Teste R**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL da cultura de *E. faecalis* ATCC12755 inativada por autoclavação, diluída 0x, 10x, 100x e 1000x;
- **Teste S**: a quatro tubos adicionou-se 1 mL do SLC de *P. acidilactici* ET34, diluído 0x, 10x, 100x e 1000x.

O 17º tubo continha apenas a monocultura de *P. acidilactici* ET34 (controle). Todos os tubos foram incubados a 25°C por 24 h, obtendo-se o SLC de cada cultura conforme descrito anteriormente. A atividade antimicrobiana do SLC foi mensurada pelo método de diluição crítica (BARBOSA *et al*., 2014) descrito anteriormente, empregando-se somente *L. monocytogenes* 104 como indicador de atividade. O experimento foi realizado uma vez.

Quadro-Resumo 2: Experimentos com *P. acidilactici* ET34

P. acidilactici ET34 e *L. monocytogenes* 104	Teste J	cultura de *P. acidilactici* ET34 + **cultura viva** de *L. monocytogenes* 104
	Teste L	cultura de *P. acidilactici* ET34 + **filtrado da cultura** de *L. monocytogenes* 104
	Teste M	cultura de *P. acidilactici* ET34 + **cultura inativada** de *L. monocytogenes* 104
	Teste N	cultura de *acidilactici* ET34 + **SLC** de *P. acidilactici* ET34
P. acidilactici ET34 e *E. faecalis* ATCC12755	Teste P	cultura de *P. acidilactici* ET34 + cultura **viva** de *E. faecalis* ATCC12755
	Teste Q	cultura de *P. acidilactici* ET34 + **filtrado da cultura** de *E. faecalis* ATCC12755
	Teste R	cultura de *P. acidilactici* ET34 + **cultura inativada** de *E. faecalis* ATCC12755
	Teste S	cultura de *P. acidilactici* ET34 + **SLC** de *P. acidilactici* ET34

3.3.4 Multiplicação de *L. monocytogenes* 104 em função da atividade do SLC de *Pediococcus acidilactici* ET34 presente

Para quantificar a atividade do SLC da cultura de *P. acidilactici* ET34 na multiplicação de *L. monocytogenes* 104, empregou-se o método de diluição crítica (BARBOSA *et al*., 2014), descrito anteriormente.

Para os testes, preparou-se 200 mL de uma cultura de *P. acidilactici* ET34 em caldo MRS a 37°C por 24 h, que foi centrifugada a 5000xg por 10 min e o pH do sobrenadante ajustado a 6,0-7,0. Em seguida, o sobrenadante foi aquecido em banho-maria a 80°C por 10 minutos e filtrado a 0,22 µm. A quatro tubos contendo 20 mL de caldo MRS**,** adicionou-se 0,78 mL, 1,875 mL, 5,0 mL e 20 mL do SLC, correspondente à bacteriocina com atividade de 240 UA/mL,

548 UA/mL, 1.280 UA/mL e 3.200 UA/mL, respectivamente, conforme determinado pelo método da diluição critica anteriormente citado. A cada um dos tubos com caldo MRS e SLC, adicionou-se uma cultura de *L. monocytogenes* 104 obtida em MRS a 37°C por 24 h, de forma a atingir uma população de 10^7 UFC/mL. Como controles, foram empregados MRS estéril e a cultura de *L. monocytogenes* 104. Os seis tubos foram incubados a 37°C, e a multiplicação de *L. monocytogenes* 104 em cada um deles foi observada mensurando-se a densidade óptica a 600 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, UK) a cada hora, até 12 h. O experimento foi realizado uma vez.

3.3.5. Comprovação da natureza proteica do composto inibidor produzido por *P. acidilactici* ET34

Para comprovar que a ação inibitória do SLC de *P. acidilactici* ET34 era causada por bacteriocinas e não por outros metabólitos com atividade antimicrobiana, preparou-se 200 mL de SLC, conforme já descrito, que foi dividido em duas porções de 100 mL. A uma das porções adicionou-se 1g de protease de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, Brasil) e, após 1 h a 37°C, a mistura foi aquecida em banho-maria a 100°C por 10 min, para inativação da protease. A ausência de atividade foi confirmada pelo teste *spot-on-the-lawn* modificado de Van Reenen, et al., (1998), empregando-se *L. monocytogenes* 104 como indicador.

A quantificação de atividade contra *L. monocytogenes* 104 nas duas porções de 200 mL do SLC (não tratada e tratada com protease) seguiu um procedimento similar ao descrito no item 3.3.4. Foram preparadas 2 séries de 4 tubos com 20 mL de caldo MRS, sendo que a uma das séries, adicionou-se 0,78 mL, 10mL, 40 mL e 80 mL do SLC não tratado com protease, correspondente à bacteriocina com atividade de 240 UA/mL, 2.133 UA/mL, 4.266 UA/mL e 5.120 UA/mL, respectivamente, conforme determinado pelo método da diluição critica (BARBOSA *et al*., 2014). A outra série de 4 tubos, adicionou-se os mesmos volumes de SLC tratado com protease. A todos os tubos adicionou-se *Listeria monocytogenes* 104 (10^7 UFC/mL). Como controles, utilizou-se a *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS e também caldo

MRS estéril. Os 10 tubos foram incubados a 37°C, e a multiplicação de *L. monocytogenes* 104 em cada um deles foi observada mensurando-se a densidade óptica a 600 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, UK) a cada hora, até 12 h. O experimento foi feito uma vez.

3.3.6. Teste de inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* 104 e por *Pediococcus acidilactici* ET34 em leite desnatado reconstituído e em caldo MRS

A inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* 104 e quando em co-cultura com *P. acidilactici* ET34 em leite por 24 h foi testada em leite e em caldo MRS. Para o preparo do leite, empregou-se leite em pó desnatado reconstituído a 10% v/v (Molico, Nestlé, Brasil).

P. acidilactici ET34 foi cultivado em caldo MRS a 37°C por 24 h, de forma a conter 10^8 UFC/mL e *L. monocytogenes* 104 foi cultivada em caldo BHI a 37°C por 24 h, de forma a conter 10^7 UFC/mL.

As culturas foram adicionadas ao leite e ao caldo MRS nas seguintes combinações:

a) Leite, adicionado das culturas de *P. acidilactici* ET34 e *L. monocytogenes* 104;
b) Leite, adicionado da cultura de *P. acidilactici* ET34;
c) Leite, adicionado da cultura de *L. monocytogenes* 104;
d) Caldo MRS, adicionado das culturas de *P. acidilactici* ET34 e *L. monocytogenes* 104;
e) Caldo MRS, adicionado da cultura de *P. acidilactici* ET34;
f) Caldo MRS, adicionado da cultura de *L. monocytogenes* 104;

As culturas em leite e em caldo MRS foram incubadas a 37°C por 24 h, e submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada (Oxoid, UK). A enumeração dos microrganismos foi realizada por semeadura em superfície (100 µL de cada diluição) em placas com ágar MRS para contagem de *P. acidilactici* ET34 e em placas com ágar Oxford para contagem de *L. monocytogenes* 104, em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 18 cepas testadas (**Tabela 1**), 14 inibiram *L. monocytogenes* Scott A quando testadas pela técnica *spot-on-the-lawn* utilizada. As cepas *Lb. sakei* ATCC15521, *E. faecalis* ATCC12755, *St. thermophilus* 170v e *S. aureus* ATCC29213 não foram capazes de inibir este microrganismo indicador.

4.1 Experimentos com *Lactobacillus sakei* MBSa1

A cepa *Lb. sakei* MBSa1, sabidamente produtora de bacteriocinas e ativa contra *L. monocytogenes* Scott A (BARBOSA *et al.*, 2014) apresentou um espectro de ação limitado, pois entre as cepas listadas na **Tabela 1** foi ativa apenas contra de *Lb. sakei* ATCC15521, *E. faecium* S100 e *E. faecalis* ATCC12755, além das cepas de *Listeria monocytogenes* Scott A, 104, 711 e 637.

As quantidades de bacteriocina produzida por *Lb. sakei* MBSa1 em caldo MRS a 30°C, expressas em UA/mL, em monocultura e nas co-culturas com *E. faecalis* ATCC12755 iniciadas após 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h, estão apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Quantidades (UA/mL) de bacteriocina produzida por *Lb. sakei* MBSa1 em caldo MRS a 30°C em monocultura e em co-culturas com *E. faecalis* ATCC12755 iniciadas após 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h, com *L. monocytogenes* Scott A como microrganismo indicador de atividade

	2h	**4h**	**6h**	**8h**	**10h**	**12h**	**24h**
Monocultura	800	800	800	800	800	800	400
Co-cultura	2.560	1.280	1.280	640	640	1.280	640

Os resultados indicam que *Lb. sakei* MBSa1 produziu maior quantidade de bacteriocina quando em co-cultura com *E. faecalis* ATCC12755 do que quando em monocultura. A maior quantidade de bacteriocina produzida (2.560

UA/mL) ocorreu quando a co-cultura foi iniciada após 2h, observando-se que, quando em monocultura, *Lb. sakei* MBSa1 produziu apenas 800 UA/mL neste tempo.

Quando o SLC resultante da co-cultura de *Lb. sakei* MBSa1 e *E. faecalis* ATCC12755 foi adicionado à cultura de *Lb. sakei* MBSa1, observou-se um aumento na quantidade de bacteriocina produzida, chegando a 12.800 UA/mL, enquanto na monocultura, sem a adição deste SLC, a quantidade produzida foi apenas 1.600 UA/mL. Estes resultados indicam que a produção de bacteriocina por *Lb. sakei* MBSa1 foi induzida pelo SLC adicionado.

Os resultados das quantidades de bacteriocina produzida (UA/mL) por *Lb. sakei* MBSa1, quando co-cultivada com *Lactobacillus sakei* ATCC15521 e na presença das culturas filtradas e inativadas pelo calor e do SLC de *Lb. sakei* MBSa1, em diferentes concentrações, empregando diferentes cepas de *L. monocytogenes* como microrganismo-alvo, estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Quantidades (UA/mL) de bacteriocina produzida por *Lb. sakei* MBSa1 quando em monocultura e quando co-cultivada com *Lb. sakei* ATCC15521 (teste A) e na presença do filtrado da cultura (teste B) e da cultura inativada pelo calor (teste C) e do SLC da própria cepa (teste D), com o emprego de diferentes cepas de *L. monocytogenes* como indicadoras de atividade

Listeria monocytogenes	**Testes/concentrações**	**UA/mL**
ATCC7644	Monocultura	Nd
	A 0x	Nd
	A 10x	Nd
	A 100x	Nd
	A 1000x	Nd
	B 0x	Nd
	B 10x	Nd
	B 100x	Nd
	B 1000x	Nd
	C 0x	Nd
	C 10x	Nd
	C 100x	Nd
	C 1000x	Nd
	D 0x	Nd
	D 10x	Nd
	D 100x	Nd
	D 1000x	Nd
104	Monocultura	1.600
	A 0x	800
	A 10x	1.600
	A 100x	1.600
	A 1000x	1.600
	B 0x	3.200
	B 10x	3.200
	B 100x	1.600
	B 1000x	1.600
	C 0x	1.600
	C 10x	1.600
	C 100x	1.600
	C 1000x	1.600
	D 0x	1.600
	D10x	1.600
	D100x	800

	D 1000x	1.600
711	Monocultura	800
	A 0x	400
	A 10x	1.600
	A 100x	800
	A 1000x	1.600
	B 0x	1.600
	B 10x	1.600
	B 100x	1.600
	B 1000x	800
	C 0x	800
	C 10x	800
	C 100x	1.600
	C 1000x	800
	D 0x	1.600
	D 10x	1.600
	D 100x	1.600
	D 1000x	800
637	Monocultura	1.600
	A 0x	800
	A 10x	1.600
	A 100x	800
	A 1000x	800
	B 0x	1.600
	B 10x	1.600
	B 100x	1.600
	B 1000x	1.600
	C 0x	800
	C 10x	1.600
	C 100x	1.600
	C 1000x	800
	D 0x	1.600
	D 10x	1.600
	D 100x	1.600
	D 1000x	1.600

Nd: não detectado

Verificou-se que a quantidade de bacteriocina produzida por *Lb. sakei* MBSa1 nos diferentes testes foi muito semelhante à produzida em monocultura. Somente na presença do filtrado da cultura de *Lb. sakei* ATCC15521 observou-se um pequeno aumento na quantidade de bacteriocina produzida, chegando a 3.200 UA/mL quando *L. monocytogenes* 104 foi

empregada como microrganismo indicador. Observou-se também que *L. monocytogenes* ATCC7644 não foi inibida por *Lb. sakei* MBSa1 em nenhuma das situações avaliadas.

Os resultados das quantidades de bacteriocina produzida (UA/mL) por *Lb. sakei* MBSa1, quando co-cultivada com *E. faecalis* ATCC12755 e na presença das culturas filtradas e inativadas pelo calor e do SLC de *E. faecalis* ATCC12755, em diferentes concentrações e com diferentes cepas de *L. monocytogenes* com o alvo, estão apresentados na **Tabela 4**. Os resultados obtidos são muito semelhantes aos observados para *Lb. sakei* ATCC15521 (**Tabela 3**), ou seja, a produção de bacteriocinas por *Lb. sakei* MBSa1 foi muito semelhante nos diferentes testes realizados. Novamente, quando *L. monocytogenes* ATCC7644 foi empregada como microrganismo indicador, não houve nenhum halo de inibição, em qualquer teste efetuado.

Tabela 4. Quantidades (UA/mL) de bacteriocina produzida por *Lb. sakei* MBSa1 quando em monocultura e quando co-cultivada com *E. faecalis* ATCC12755 (teste E) e na presença do filtrado da cultura (teste F) e da cultura inativada pelo calor (teste G) e do SLC da própria cepa (teste H), com o emprego de diferentes cepas de *L. monocytogenes* como indicadoras de atividade

Listeria monocytogenes	**Testes/concentrações**	**UA/mL**
ATCC7644	Monocultura	Nd
	E 0x	Nd
	E 10x	Nd
	E100x	Nd
	E 1000x	Nd
	F 0x	Nd
	F 10x	Nd
	F 100x	Nd
	F 1000x	Nd
	G 0x	Nd
	G 10x	Nd
	G 100x	Nd
	G 1000x	Nd
	H 0x	Nd
	H 10x	Nd
	H 100x	Nd
	H 1000x	Nd
104	Monocultura	12.800
	E 0x	3.200
	E 10x	3.200
	E 100x	3.200
	E 1000x	3.200
	F 0x	1.600
	F 10x	3.200
	F 100x	3.200
	F 1000x	3.200
	G 0x	800
	G 10x	1.600
	G 100x	800
	G 1000x	1.600
	H 0x	6.400
	H 10x	3.200
	H 100x	1.600

	H 1000x	1.600
711	Monocultura	1.600
	E 0x	3.200
	E 10x	1.600
	E 100x	1.600
	E 1000x	1.600
	F 0x	1.600
	F 10x	1.600
	F 100x	1.600
	F 1000x	1.600
	G 0x	800
	G 10x	800
	G 100x	800
	G 1000x	800
	H 0x	1.600
	H 10x	1.600
	H 100x	3.200
	H 1000x	1.600
637	Monocultura	3.200
	E 0x	3.200
	E 10x	3.200
	E 100x	3.200
	E 1000x	3.200
	F 0x	3.200
	F 10x	1.600
	F 100x	1.600
	F 1000x	1.600
	G 0x	400
	G 10x	3.200
	G 100x	1.600
	G 1000x	800
	H 0x	6.400
	H 10x	3.200
	H 100x	3.200
	H 1000x	6.400

Nd: não detectado

Os resultados indicam que *Lb. sakei* MBSa1 não aumentou a produção de bacteriocina na presença de uma outra cultura viva ou de metabólitos endógenos e exógenos próprios ou dessa outra cultura viva. Esses resultados

são diferentes dos observados por Rojo-Bezares et al. (2007), que relataram que *Lactobacillus plantarum* J23 não apresentou atividade antimicrobiana em monocultura, mas na presença de outros microrganismos em co-cultura, houve indução da produção de bacteriocina, chegando à quantidade máxima de 640 UA/mL após 6 h de co-cultivo. Também Maldonado et al. (2004) reportaram que a produção de bacteriocina por *Lb. plantarum* NC8 foi induzida quando a cepa foi co-cultivada com outras 41 cepas de diversos gêneros, enquanto em monocultura não se detectou atividade antimicrobiana.

Maldonado et al. (2004), também observaram uma autoindução, quando *Lb. plantarum* NC8 produziu 640 UA/mL após a adição do SLC resultante da co-cultura *Lb. plantarum* NC8, demonstrando que além da cultura viva, algum composto proteico endógeno e/ou exógeno também pode induzir a produção de bacteriocina. Por outro lado, Rojo-Bezares et al. (2007) relataram que *Lb. plantarum* J23, na presença do SLC ou da cultura autoclavada não apresentou atividade antimicrobiana em nenhum dos casos, enquanto na co-cultura com células vivas houve indução da produção de bacteriocinas por esta cepa.

4.2 Experimentos com *Pediococcus acidilactici* ET34

A **Tabela 5** apresenta a quantidade de bacteriocina produzida por *P. acidilactici* ET34 de acordo com o microrganismo alvo. Observou-se que esta cepa apresentou boa atividade antimicrobiana contra as cepas de *Listeria monocytogenes* e *E. faecalis* testadas, mas foi inativa contra *Staphylococcus aureus* ATCC29213 e *Lb. sakei* ATCC15521.

Tabela 5. Produção de bacteriocina (UA/mL) por *Pediococcus acidilactici* ET34, de acordo com o microrganismo alvo

Microrganismo alvo	UA/mL
L. monocytogenes 637	12.800
L. monocytogenes 711	12.800
L. monocytogenes 104	25.600
L. monocytogenes Scott A	6.400
E. faecalis ATCC12755	3.200
S. aureus ATCC29213	Nd
Lb. sakei ATCC15521	Nd

Nd: não detectado

Os resultados das quantidades de bacteriocina produzida (UA/mL) por *Pediococcus acidilactici* ET34, quando co-cultivada com *E. faecalis* ATCC12755 e *L. monocytogenes* 104 e na presença das culturas filtradas e inativadas pelo calor e do SLC de *E. faecalis* ATCC12755 e *L. monocytogenes* 104, em diferentes concentrações, estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Quantidades (UA/mL) de bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici* ET24 quando em monocultura e quando co-cultivado com *Listeria monocytogenes* 104 (teste J) ou *E. faecalis* ATCC12755 (Teste P) e na presença dos filtrados das culturas (testes L e Q, respectivamente) e inativadas pelo calor (testes M e R) e dos SLC (testes N e S, respectivamente)

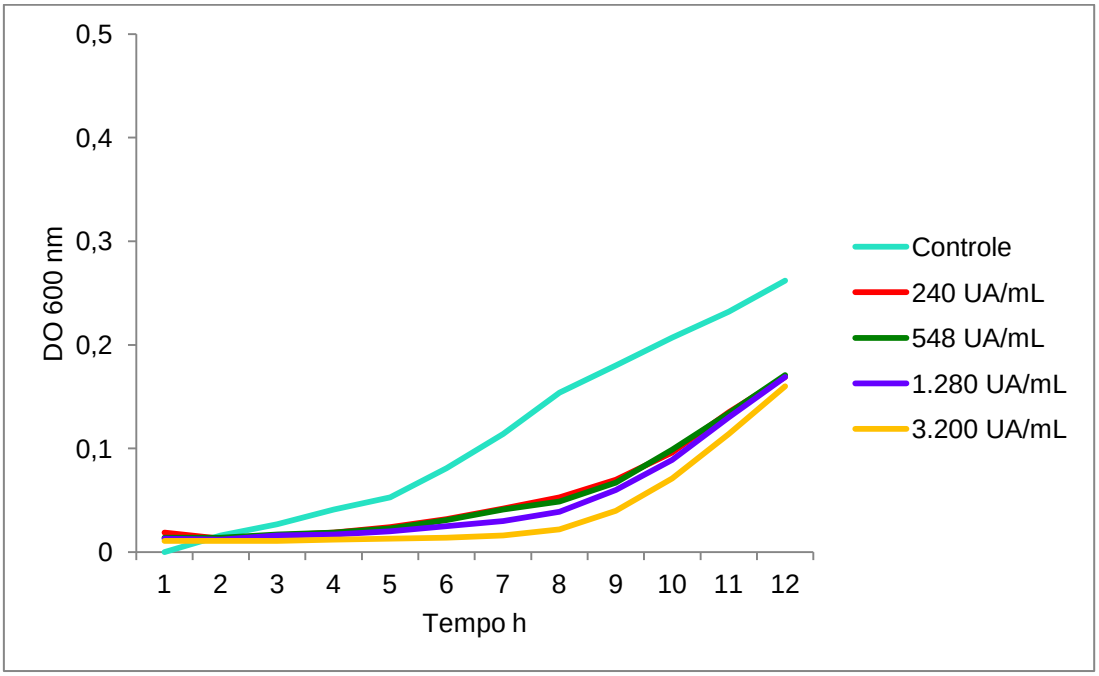
Microrganismos	Testes/concentrações	UA/mL
L. monocytogenes 104	Monocultura	1.600
	J 0x	1.600
	J 10x	1.600
	J 100x	3.200
	J 1000x	1.600
	L 0x	6.400
	L 10x	6.400
	L 100x	1.600
	L 1000x	3.200
	M 0x	3.200
	M 10x	3.200
	M 100x	800
	M 1000x	1.600
	N 0x	3.200
	N 10x	3.200
	N 100x	3.200
	N 1000x	800
E. faecalis ATCC12755	Monocultura	3.200
	P 0x	3.200
	P 10x	3.200
	P 100x	6.400
	P 1000x	6.400
	Q 0x	6.400
	Q 10x	3.200
	Q 100x	3.200
	Q 1000x	3.200
	R 0x	3.200
	R 10x	6.400
	R 100x	6.400
	R1000x	3.200
	S 0x	3.200
	S 10x	6.400
	S 100x	800
	S1000x	1.600

A Densidade Óptica a 600 nm das culturas de *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS acrescido de diferentes quantidades de SLC de *Pediococcus acidilactici* ET34 está apresentada na **Tabela 7** e as respectivas curvas de multiplicação podem ser vistas na **Figura 3**.

Tabela 7. Densidade Óptica a 600 nm das culturas de *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS contendo diferentes quantidades de SLC de *Pediococcus acidilactici* ET34

Tempo	Controle	SLC (UA/mL)			
		240	548	1280	3200
1h	0	0,019	0,014	0,013	0,011
2h	0,016	0,013	0,014	0,012	0,011
3h	0,027	0,016	0,017	0,016	0,011
4h	0,041	0,019	0,019	0,017	0,012
5h	0,053	0,024	0,023	0,02	0,013
6h	0,081	0,032	0,031	0,025	0,014
7h	0,114	0,042	0,041	0,03	0,016
8h	0,154	0,053	0,049	0,039	0,022
9h	0,18	0,07	0,067	0,06	0,04
10h	0,207	0,096	0,099	0,089	0,071
11h	0,232	0,135	0,134	0,13	0,114
12h	0,262	0,169	0,171	0,169	0,16

Figura 3. Curvas de multiplicação de *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS contendo diferentes quantidades de SLC de *Pediococcus acidilactici* ET34



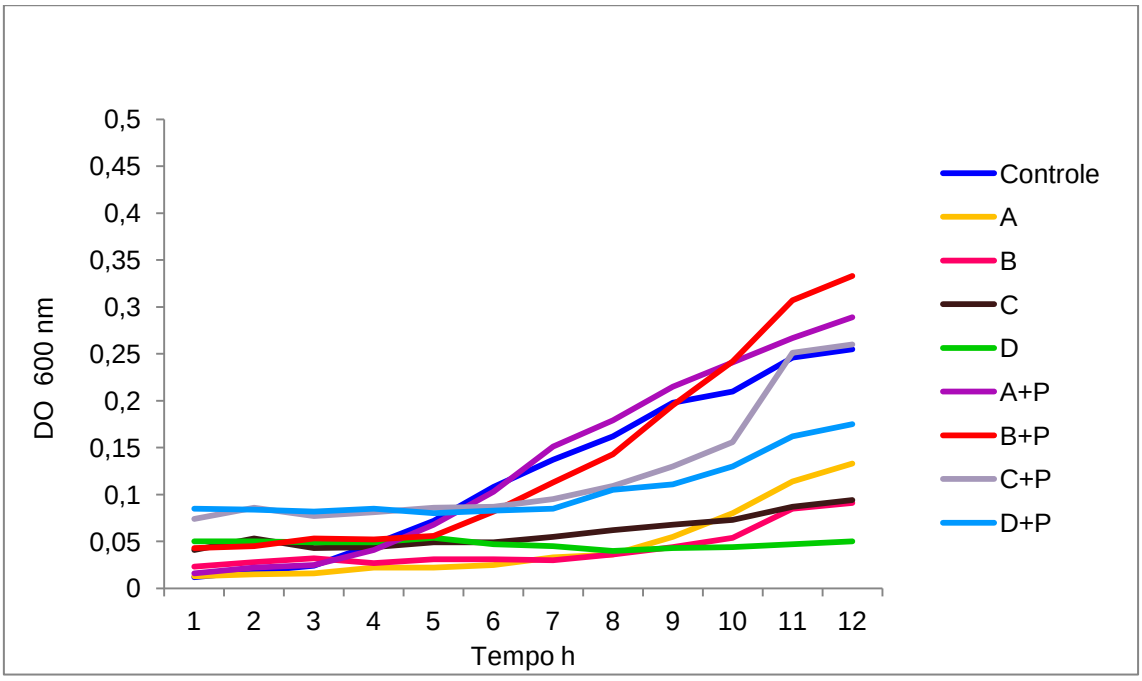
Os resultados na **Tabela 7** e **Figura 3** evidenciam que a bacteriocina de *P. acidilactici* ET34 adicionada ao caldo MRS causou um aumento na duração da fase lag da curva de multiplicação de *L. monocytogenes* 104. Na presença da bacteriocina, a fase logarítmica de multiplicação iniciou-se após 8 horas, enquanto na curva controle a fase lag foi imperceptível.

O efeito do tratamento do SLC de *P. acidilactici* ET34 com protease de *Streptomyces griseus* na multiplicação de *L. monocytogenes* 104 está apresentado na **Tabela 8** e **Figura 4**.

Tabela 8. Densidade Óptica a 600 nm das culturas de *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS acrescido de SLC de *P. acidilactici* ET34 com atividade de 240 UA/mL (**A**), 2133 UA/mL (**B**), 4266 UA/mL (**C**) e 5120 UA/mL (**D**) e os respectivos SLC tratados com protease (**A+P**, **B+P**, **C+P** e **D+P**)

Tempo (h)	**SLC**								
	0	**A**	**B**	**C**	**D**	**A+P**	**B+P**	**C+P**	**D+P**
1	0,012	0,013	0,023	0,041	0,05	0,016	0,043	0,074	0,085
2	0,018	0,015	0,028	0,053	0,05	0,022	0,045	0,086	0,084
3	0,024	0,016	0,032	0,043	0,049	0,025	0,053	0,077	0,082
4	0,047	0,022	0,027	0,044	0,049	0,041	0,052	0,081	0,085
5	0,072	0,022	0,031	0,049	0,054	0,068	0,056	0,086	0,080
6	0,108	0,025	0,031	0,049	0,047	0,103	0,082	0,087	0,083
7	0,137	0,033	0,030	0,055	0,045	0,151	0,113	0,095	0,085
8	0,162	0,036	0,036	0,062	0,040	0,179	0,143	0,109	0,105
9	0,198	0,055	0,044	0,068	0,043	0,215	0,195	0,130	0,111
10	0,210	0,080	0,054	0,073	0,044	0,241	0,242	0,156	0,130
11	0,246	0,114	0,085	0,087	0,047	0,267	0,307	0,251	0,162
12	0,255	0,133	0,091	0,094	0,050	0,289	0,333	0,260	0,175

Figura 4. Curvas de multiplicação de *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS acrescido de SLC de *P. acidilactici* ET34 com atividade de 240 UA/mL (**A**), 2.133 UA/mL (**B**), 4.266 UA/mL (**C**) e 5.120 UA/mL (**D**) e os respectivos SLC tratados com protease (**A+P**, **B+P**, **C+P** e **D+P**)



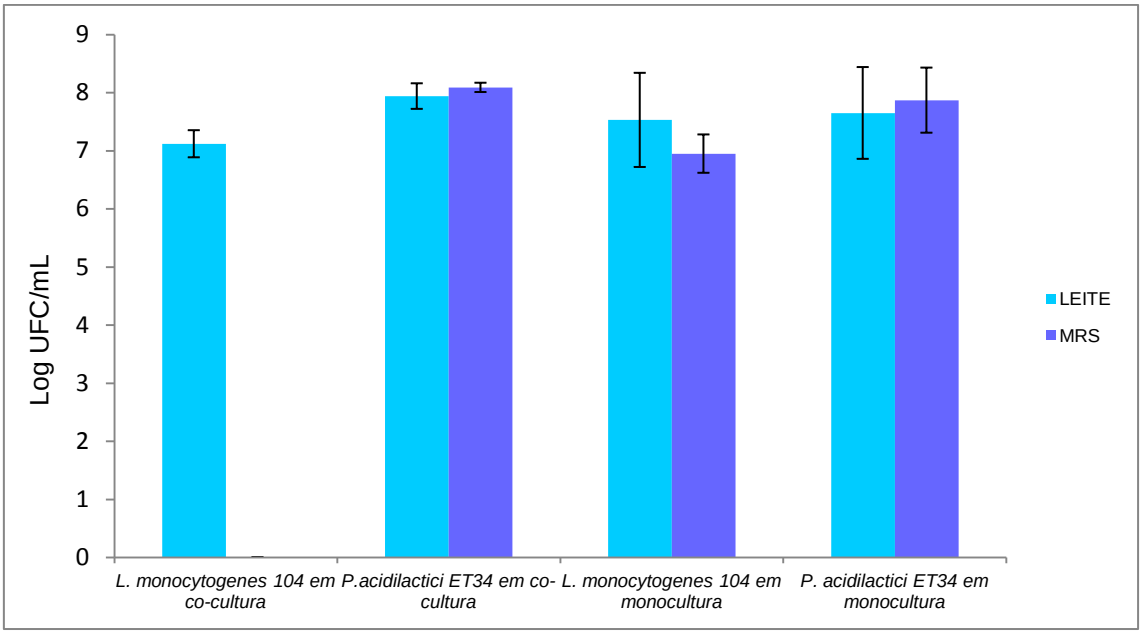
Os resultados da **Tabela 8** e **Figura 4** confirmam que a atividade antimicrobiana do SLC de *P. acidilactici* ET34 é consequência da ação de compostos de natureza proteica, ou seja, de bacteriocinas, e não de compostos de outra natureza. A ação inibitória foi dose-dependente, tendo sido bacteriostática por pelo menos 12 h para o SLC com atividade de 5.120 UA/mL.

Quanto ao efeito de co-culturas na indução da produção de bacteriocinas por *Lb. sakei* MBSa1 e por *P. acidilactici* ET34, nos diferentes testes realizados, observou-se que os resultados para as duas cepas foram muito semelhantes. Observou-se que as cepas *E. faecalis* ATCC12755 e *L. monocytogenes* 104 não atuaram como indutoras de produção de bacteriocinas por *Lb. sakei* MBSa1 ou por *P. acidilactici* ET34, assim como também não foram os metabólitos exógenos e/ou endógenos destas duas cepas.

Quanto aos testes de inibição de *L. monocytogenes* 104 quando em co-cultura com *P. acidilactici* ET34 em leite em pó desnatado reconstituído e em

caldo MRS, após 24h de co-cultura, os resultados podem ser vistos na **Figura 5**.

Figura 5. Contagens de *Listeria monocytogenes* 104 e de *Pediococcus acidilactici* ET34 (Log UFC/mL) quando em co-cultura e em monocultura, em leite em pó desnatado reconstituído e em caldo MRS, após incubação a 37°C por 24 h



Os resultados da **Figura 5** indicam que a multiplicação de *L. monocytogenes* 104 em caldo MRS é inibida quando em co-cultura com *P. acidilactici* ET34 por 24 h, enquanto essa inibição não ocorre quando a co-cultura é feita em leite em pó reconstituído. Os resultados dos experimentos controle com as monoculturas em MRS e em leite em pó desnatado indicaram que houve boa multiplicação dos microrganismos em teste nos dois casos, ou seja, a ausência de atividade no leite deve ser decorrente de interferentes presentes que inibiram a produção de bacteriocinas por *P. acidilactici* ET34 ou causaram a perda da atividade da bacteriocina produzida.

Segundo Somkuti & Steinberg (2010), a glicose presente no caldo MRS é de fácil degradação por *P. acidilactici* ET34, permitindo a produção de bacteriocinas e matrizes à base de lactose não são adequadas para a

produção de bacteriocina por *P. acidilactici*, pois esse gênero bacteriano possui capacidade limitada para a fermentação da lactose, o que explicaria os resultados observados neste estudo. No entanto, quando Somkuti & Steinberg (2010) utilizaram *St. thermophilus* e *Lb delbrueki* subsp. *bulgaricus* em co-cultura com *P. acidilactici,* houve um aumento na produção de bacteriocina, certamente porque a lactose presente no leite foi transformada em glicose e galactose pela enzima β-galactosidase de *St. thermophilus* e *Lb. delbrueki* subsp. *bulgaricus*, sendo então a galactose fermentada por *P. acidilactici*, com produção de bacteriocina. Cavicchioli et al. (2017) também não obtiveram atividade contra *Listeria* quando *Pediococcus pentosaceus* ST65ACC foi co-cultivado com *L. monocytogenes* em uma matriz láctea. *P. pentosaceus* ST65ACC produziu uma quantidade máxima de bacteriocina de aproximadamente 3.000 UA/mL, da 6ª até a 9ª hora de co-cultivo, decaindo para menos de 1.000 UA/mL nas 9 horas seguintes, certamente em consequência da capacidade limitada da cepa fermentar a lactose. É, portanto, possível supor que a quantidade de bacteriocina produzida por *P. acidilactici* ET34 no leite não foi suficiente para ter uma ação contra *L. monocytogenes* 104 quando os dois microrganismos foram co-cultivados.

Na contramão dos resultados apresentados e de outros estudos, Gutierrez-Cortés et al. (2018) mostraram recentemente que *Pediococcus pentosaceus* 147 quando em co-cultura com *Lactobacillus plantarum* produziu maior quantidade de bacteriocina(51.000 UA/mL) quando comparado com a monocultura (19.200 UA/mL). A produção de bacteriocina de *P. pentosaceus* 147 foi maior em caldo MRS adicionado de soro de leite do que em caldo MRS simples. Segundo os autores do estudo, esse resultado se deve, provavelmente, a individualidade da cada cepa do gênero *Pediococcus* spp., pois poucas cepas são capazes de fermentar lactose como citado por Papagianni & Anastasiadou (2009). Essa contradição indica que mais investigação é necessária para esclarecer os efeitos de possíveis interações entre as BAL presentes em um alimento, bem como o efeito dos componentes dos alimentos na produção das bacteriocinas pelas BAL bacteriocinogênicas. Os recentes estudos do fenômeno de *quorum sensing* deverão trazer novas informações para o entendimento da dinâmica da bacteriocinogênese de bactérias láticas.

5 CONCLUSÕES

- *E. faecalis* ATCC12755, *Lb. sakei* ATCC15521 e *L. monocytogenes* 104 não são microrganismos indutores de produção de bacteriocina por *Lb. sakei* MBSa1 e *P. acidilactici* ET34.

- Os metabólitos contidos no SLC produzidos pelas cepas bacteriocinogênicas *Lb. sakei* MBSa1 e *P. acidilactici* ET34 não são indutores na produção de suas próprias bacteriocinas.

- Os filtrados e a inativação pelo calor das culturas *E. faecalis* ATCC12755, *Lb. sakei* ATCC15521 e *L. monocytogenes* 104 não aumentam a quantidade de bacteriocina produzida pelas cepas bacteriocinogênicas *Lb. sakei* MBSa1 e *P. acidilactici* ET34 comparando com a monocultura, indicando que os metabólitos exógenos também não são indutores na produção de bacteriocina.

- A ação antimicrobiana de *P. acidilactici* ET34 contra *L. monocytogenes* 104 é bacteriostática na população de *Listeria* nas primeiras 8 horas e dependente da quantidade de bacteriocina produzida.

- A bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici* ET34 é a responsável pela ação bacteriostática de *Listeria monocytogenes* 104, e com ação dependente da quantidade.

- *P. acidilactici* ET34 não inibe *L. monocytogenes* em leite em pó reconstituído, provavelmente devido à incapacidade de produzir bacteriocina em decorrência de sua capacidade limitada de fermentação da lactose ou à ação de interferentes presentes no leite.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, H.; KIM, J.; KIM, W. J. Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. **Food Control**. v. 80, p. 59-66, 2017.

ALBUQUERQUE, M. A. C.; BEDANI, R.; LEBLANC, J.G.; SAAD, S. M. I.; Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by starter and probiotic cultures in fermented soymilk. **International Journal of Food Microbiology**. v. 261, p. 35-41, 2017.

ALVAREZ-SIEIRO, P.; MONTALBÁN-LOPEZ, M.; MU, D.; KUIPERS, O. P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p.2939-295, 2016.

AXELSSON, L.; LINDSTAD, G.; NATERSTAD, K. Development of an inducible gene expression system for *Lactobacillus sakei*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 115–120, 2003.

AYMERICH, M. .; GARRIGA, M.; MONFORT, J. .; NES, I.; HUGAS, M. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 33–45, 2000.

BALCIUNAS, E. M., CASTILLO MARTINEZ, F. A., TODOROV, S. D., FRANCO, B. D. G. DE M., CONVERTI, A., & OLIVEIRA, R. P. DE S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, p. 134–142, 2013.

BARBOSA, M. S.; TODOROV, S.D.; BELGUESMIA, Y.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; IVANOVA, I.V.; CHOBERT, J-M.; HAERTLÉ, T. Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* MBSa1 isolated from Brazilian salami. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 1195-1208, 2014.

BHUNIA, A.K.; JOHNSON, M. C.; RAY, B.; KALCHAYANAND, N. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. **Journal of Applied Bacteriology**. v.70, p. 25-33, 1991.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, ed. 4, p. 281-370, 2002.

CAVICCHIOLI, V. Q.; CAMARGO, A. C.; TODOROV, S.D.; NERO, L. A. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 100, ed. 4, p. 2526-2535, 2017.

CHAILLOU, S.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M. C.; CORNET, M.; CRUTZ-LE COQ, A. M.; DUDEZ, A. M.; MARTIN, V.; BEAUFILS, S.; DARBON-RONGÈRE,

E.; BOSSY, R.; LOUX, V.; ZAGOREC, M. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1527–1533, 2005.

CHANOS, P.; MYGIND, T. Co-culture inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.100, p. 4297-4308, 2016.

CHIKINDAS, M. L.; WEEKS, R.; DRIDER, D.; CHISTYAKOV, V. A.; DICKS, L. MT. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion of Biotechnology**, v. 49, p. 23-28, 2018.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature reviews Microbiology**, v.3, ed. 10, p.777-788, 2005.

DE CARVALHO, K. G.; BAMBIRRA, F. H. S.; KRUGER, M. F.; BARBOSA, M. S.; OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, A. M. C.; NICOLI, J. R.; BEMQUERER, M. P.; DE MIRANDA, A.; SALVUCCI, E. J.; SESMA, F. J. M.; FRANCO, B. D. G. M. Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 381–390, 2010.

DE PRISCO, A.; VAN VALENBERG, H. J. F.; FOGLIANO, V.; MAURIELLO, G. Microencapsulated starter culture during yoghurt manufacturing, effect on

technological features. **Food and Bioprocess Technology**. v. 10, ed. 10, p. 1767-1777, 2017.

DIMITRELLOU, D.; KANDYLIS, P.; KOURKOUTAS, Y.; KANELLAKI, M. Novel probiotic whey cheese with immobilized lactobacilli on casein. **Food Science and Technology**. v. 86, p. 627-634, 2017.

ELSHAFEI, A. M. Role of microorganisms in food contamination, processing and safety. **Journal of Food Microbiology**. v. 1, ed. 1, p. 1-2, 2017.

GAO, Y.; JIA, S.; GAO, Q.; TAN, Z. A novel bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sake* C2, isolated from traditional Chinese fermented cabbage. **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 76–81, 2010.

GAO, Y.; LI, D.; LIU, X. Effects of *Lactobacillus sakei* C2 and sakacin C2 individually or in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*, chemical and odor changes of vacuum-packed sliced cooked ham. **Food Control**, v. 47, p. 27–31, 2015.

GARG, N.; KAUR, B. Biopreservative potential and stability assessment of *Pediococcus acidilactici* BA28. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, p. 980-989, 2015.

GARSA, A. K.; KUMARIYA, R.; KUMAR, A.; LATHER, P.; KAPILA, S.; SOOD, S. K. Industrial cheese whey utilization for enhanced production of purified pediocin PA-1. **Food Science and Technology**, v. 59, p. 656-665, 2014.

GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 11, n. 96, p. 20140065–20140065, 2014.

GONZALEZ, C. F.; KUNKA, B. S. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. **Applied Environment Microbiology**. v. 53, p. 2534-2538, 1987.

GUTIERREZ-CORTÉS, C.; SUAREZ, H.; BUITRAGO, G.; NERO, L. A.; TODOROV, S. D. Enhanced bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* 147 in co-culture with *Lactobacillus plantarum* LE27 on cheese whey broth. **Frontiers of Microbiology**, v. 9, article 2952, 2018.

HOLCK, A.; AXELSSON, L.; BIRKELAND, S-T.; AUKRUST, T.; BLOM, H. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 2715-2720, 1992.

HOLCK, A. L.; AXELSSON, L.; HÜNHE, K.; KRÖCKEL, L. Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. **FEMS Microbiology Letters**, v. 115, n. 2-3, p. 143-149, 1994.

HUANG,Y.; LUO, Y.; ZHAI, Z.; ZHANG, H.; YANG, C.; TIAN, H.; LI, Z.; FENG, J.; LIU, H.; HAO, Y. Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. **Food Control**, v. 20, p. 1030-1035, 2009.

HUGAS, M.; MONFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 547–554, 1997.

JANG, S., LEE, J., JUNG, U., CHOI, H.S., SUH, H.J. Identification of anti-listerial domain from *Pediococcus pentosaceus* T1 derived from kimchi, a traditional fermented vegetable. **Food Control**, v. 43, p. 42–48, 2015.

JIANG, J.; SHI, B.; ZHU, D.; CAI, Q.; CHEN, Y.; LI, J.; QI, K.; ZHANG, M. Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 338–344, 2012.

KINGCHA, Y., TOSUKHOWONG, A., ZENDO, T., ROYTRAKULS, S., LUXANANIL, P., CHAREONPORNSOOK, K., VALYASEVI, R., JANG, S., LEE, J., JUNG, U., CHOI, H.S., SUH, H.J. Anti-*Listeria* activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. **Food Control,** v. 25, p. 190–196, 2012.

KLAENHAMMER, T. R. Genetic of bacteriocins produced by lactic-acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 39-86, 1993.

KOORT, J.; VANDAMME, P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W.; BJÖRKROTH, J. *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* is a later synonym of *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1621-1626, 2004.

LAIÑO, J. E.; DEL VALLE, M. J.; HEBERT, E. M.; DE GIORI, G. S.; LEBLANC, J. G. Folate production and *fol* genes expression by the dairy starter culture *Streptococcus thermophilus* CRL803 in free and controlled pH batch fermentations. **Food Science and Technology**. v. 85, p. 146-150, 2017.

LIU, C.; HU, B.; LIU, Y.; CHEN, S. Stimulation of Nisin Production from Whey by a Mixed Culture of *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 06, p. 129-132, 2006.

MALDONADO, A.; RUIZ-BARBA, J. L.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Production of plantaracin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of Gram-positive bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 181, p. 8-16, 2004a.

MALDONADO, A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; RUIZ-BARBA, J. L. Induction of plantaracin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with

specific Gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1556-1564, 2004b.

MAN, L-L.; MENG, X-C.; ZHAO R-H. Induction of plantaracin MG under co-culture with certain lactic acid bacterial strains and identification of luxS mediated quorum sensing system in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391. **Food Control**, v. 23, p. 462-469, 2012.

MARTINEZ, R. C. R.; MARTINIS, E. C. P. de; Evaluation of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* 1 against *Listeria monocytogenes* 1/2A growth and haemolytic activity. **Brazilian Journal Microbiology**, v.36, p. 83-87, 2005.

MECHOUD, M. A.; ÁLVAREZ, O. E.; CAYRÉ, M. E.; CASTRO, M. P.; MINAHK, C.; SAAVEDRA, L. Sakacin G is the main responsible bacteriocin for the anti-listerial activity of meat-borne *Lactobacillus curvatus* ACU-1. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 615–621, 2017.

MOKOENA, M. P.; Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1-13, 2017.

PAPAGIANNI, M., ANASTASIADOU, S. Pediocins: the bacteriocins of pediococci. sources, production, properties and applications. **Microbiol Cell Factories**, v.8, p. 1475-2859, 2009.

PETERNEL, M. Z.; MAJHENIČ, A. Č.; HOLO, H.; NES, I. F.; SALEHIAN, Z.; BERLEC, A.; ROGELJ, I. Wide-Inhibitory Spectra Bacteriocins Produced by *Lactobacillus gasseri* K7. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 2, n. 4, p. 233–240, 2010.

PORTO, M. C. W.; KUNIYOSHI, T. M.; AZEVEDO, P. O. S.; VITOLO, M.; OLIVEIRA, R. P. S. *Pediococcus* spp. : An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. **Biotechnology Advances**, v. 35, p. 361-374, 2017.

REMIGER, A.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. Identification of bacteriocin-encoding genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 28–34, 1996.

ROJO-BEZARES, B.; SAENZ, Y.; NAVARRO, L.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. **Food Microbiology,** v.24, p. 482-491, 2007.

RUIZ-BARBA, J. L.; CABALLERO-GUERRERO, B.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 413–417, 2010.

RZEPKOWSKA, A.; ZIELINSKA, D.; OLDAK, A.; KOLOZYN-KRAJEWSKA, D. Safety assessment and antimicrobial properties of the lactic acid bacteria strains isolated from polish raw fermented meat products. **International Journal of Food Properties**. v. 20, ed. 11, p. 2736-2742, 2017.

SAELIM, K.; JAMPAPHAENG, K.; MANEERAT, S. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* S0/7 isolated fermented stinky bean (Sa Taw Dong) and its use as a starter culture**. Journal of Functional Foods,** v. 38 part A, p. 370-377, 2017.

SALMINEN, S.; LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.; WRIGHT, A. V. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. In: WRIGHT, A. V.: AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: an introduction.4ª ed, Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group, 2012, cap. 1.

SAWA, N.; KOGA, S.; OKAMURA, K.; ISHIBASHI, N.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 61–69, 2013.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. K. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1901–1906, 1989.

SILVA, C. C. G.; SILVA, S. P. M.; RIBEIRO, S. C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-15, 2018.

SINGLA, V.; MANDAL, S.; ANAND, S.; TOMAR, S. K. Techno-functional attributes of *Pediococcus* spp.: A Review. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 4, p. 381-390, 2017.

SMID, E. J.; LACROIX, C. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 148–154, 2013.

SOBRINO, O. J.; RODRÍGUEZ, J. M.; MOREIRA, W. L.; CINTAS, L. M.; FERNÁNDEZ, M. F.; SANZ, B.; HERNÁNDEZ, P. E. Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 215–225, 1992.

SOMKUTI, G. A.; STEINBERG, D. H. Pediocin production in milk by *Pediococcus acidilactici* in co-culture with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 65-69, 2010.

SUGANTHI, V.; MOHANASRINIVASAN, V. Optimization studies for enhanced bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* KC692718 using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 3773-3783, 2015.

TABASCO, R.; GARCÍA-CAYUELA, T.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, p. 109-116, 2009.

TODOROV, S. D.; RACHMAN, C.; FOURRIER, A.; DICKS, L. M. T.; VAN REENEN, C. A.; PRÉVOST, H.; DOUSSET, X. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. **Anaerobe**, v. 17, n. 1, p. 23–31, 2011.

TOMÉ, E.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. C. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 285-294, 2008.

URSO, R.; RANTSIOU, K.; CANTONI, C.; COMI, G.; COCOLIN, L. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, n. 3, p. 232–239, 2006.

VAN REENEN, C. A.; DICKS, L. M. T.; CHIKINDAS, M. L. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 1131-1137, 1998.

VAUGHAN, A.; EIJSINK, V. G. H.; O'SULLIVAN, T. F.; O'HANLON, K.; VAN SINDEREN, D. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 131–138, 2001.

ZOMMITI, M.; ALMOHAMMED, H.; FERCHICHI, M. Purification and Characterization of a Novel Anti-Campylobacter Bacteriocin Produced by *Lactobacillus curvatus* DN317. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 8, n. 4, p. 191–201, 2016.