

Isolamento, caracterização bioquímica e molecular de *Enterococcus* bacteriocinogênicos em leite cru de búfala no sul do Brasil

Buboltz JR¹, Comerlato CB², Frazzon APG², Moura TM³

¹ Universidade Feevale; ² Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente; ³ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde.

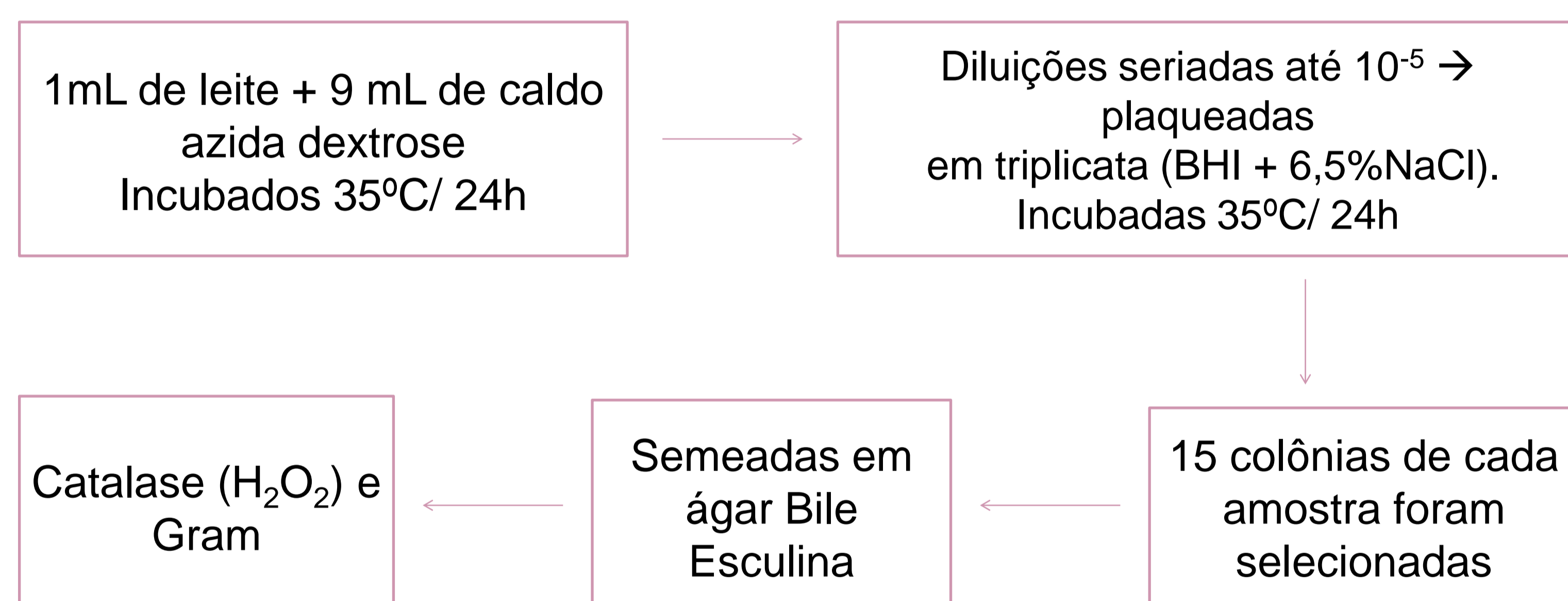
INTRODUÇÃO

A microbiota do leite de búfala in natura é extremamente variada sendo composta por bactérias ácido lácticas (BAL), na qual o gênero *Enterococcus* está presente. Na produção de queijo, os *Enterococcus* possuem um importante papel como flavorizante e aumentam a capacidade de fermentação. São considerados probióticos, pois contribuem no balanço microbial e no tratamento de gastroenterites em humanos e animais. Além disso, muitas cepas são produtoras de enterocinas que são sintetizadas ribossomicamente e liberadas no meio extracelular a fim de inibir bactérias deteriorantes de alimentos e patogênicas ao homem como a *Listeria monocytogenes*.

Esse trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar *Enterococcus* de amostras de leite cru de búfala, além de detectar a produção de substância antagonista.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento: Nesse estudo, foram isolados *Enterococcus* de 4 amostras de leite cru de búfala entre maio e julho de 2013.



Armazenamento: - 20°C em criotubos contendo BHI caldo + 50% glicerol.

Identificação:

Fenotípica
Manual of Clinical Microbiology (Teixeira et al., 2011)

- Produção de ácidos → fontes de carbono
- Utilização do piruvato e hidrólise da arginina

Genotípica

- PCR gênero-específico: gene *tuf*
- PCR espécie-específico: Multiplex (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*)

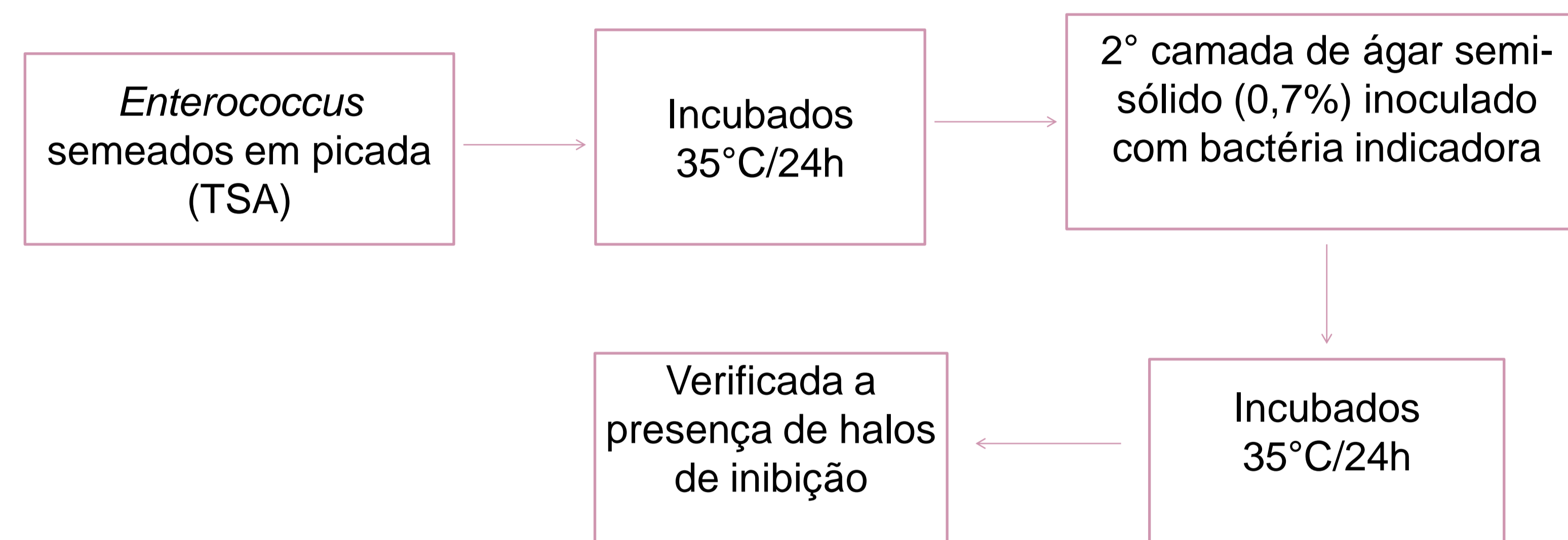
Perfil de Susceptibilidade – CLSI 2013

- Disco-difusão
- Antimicrobianos:** ampicilina (10µg), estreptomicina (10µg), gentamicina (120µg), vancomicina (30µg), tetraciclina (30µg), eritromicina (15µg), cloranfenicol (30µg), ciprofloxacina (5µg), nitrofurantoína (300µg) e norfloxacino (10µg).

Método da Dupla Camada:

(Tagg et al.; 1971)

- Amostra teste: *Enterococcus* isoladas de leite de búfala cru;
- Bactérias indicadora: 10 isolados de *Listeria monocytogenes* com diferentes sorotipos (1/2c, 1/2b, 4b, 1c,4c, 1/2a) foram testados para fins de comparação.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 40 *Enterococcus* foram isolados de 4 amostras de leite cru de búfala. Sendo que todos apresentaram-se como cocos Gram positivos, arranjados em cadeias curtas, tétrades e duplas, e catalase negativos.

Identificação:

PCR para os genes *tuf* e 16SrRNA → positivos para todos os isolados.

Identificação fenotípica:

- 1 *E. gallinarum*
- 39 *E. faecalis*

Perfil de susceptibilidade:

- A maioria dos isolados apresentaram perfil sensível aos antimicrobianos testados (CLSI 2013)
- Um isolado que apresentou resistente à eritromicina, tetraciclina e estreptomicina foi retirado do estudo

Ensaio de Dupla Camada:

- Das 40 amostras isoladas, 21 apresentaram halos de inibição;
- As *Listerias monocytogenes* sorotipo 1/2a mostraram maior sensibilidade à substância antagonista e os sorotipo 1/2b maior resistência.

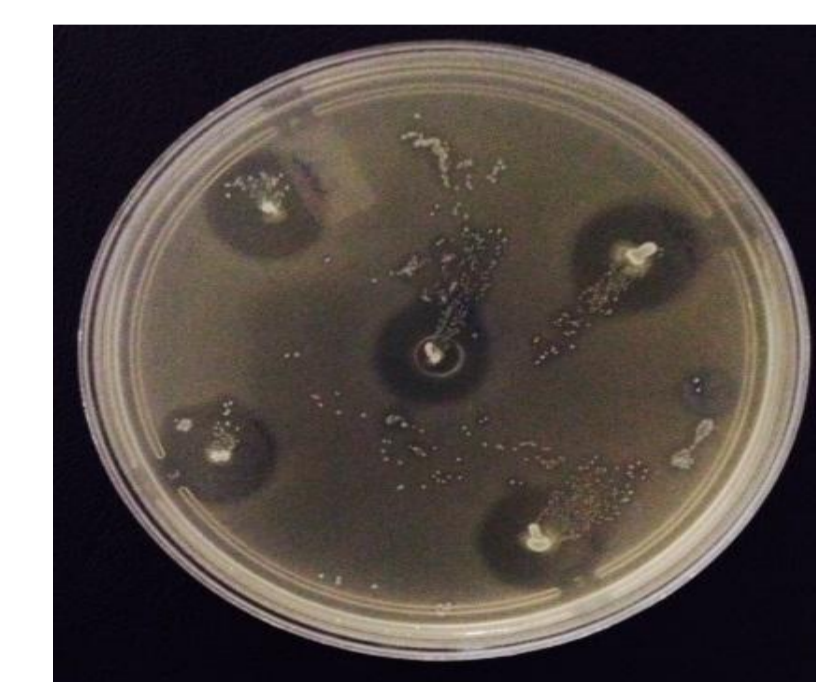


Figura 1. Arquivo Pessoal - Ensaio da dupla camada; halos de inibição frente à *L. monocytogenes*.

CONCLUSÃO

Os *Enterococcus* isolados do leite cru de búfala mostraram atividade antimicrobiana contra a maioria dos sorotipos de *Listeria monocytogenes* podendo servir futuramente como um biopreservante de alimentos. Além disso, mais estudos devem ser realizados visando a utilização em escala industrial e a substituição dos biopreservantes químicos pelos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22st informational supplement M100-S22. Wayne, PA: CLSI; 2013.
- NES IF, YOON S-S, DIEP DB. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. Food Sci Biotechnol, V.16(5), P.675–690; 2007.
- TAGG, J. e MCGIVEN, A. Assay system for bacteriocins. Appl Microbiol, v.21, p.943,1971.
- TEIXEIRA L.M.; CARVALHO, M.G.; SHEWMAKER, P.L. & FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; WARNOCK, D.W. Manual of Clinical Microbiology 10th ed., Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2011, p 350-364.