



Evento	Salão UFRGS 2014: SIC - XXVI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2014
Local	Porto Alegre
Título	Isolamento, caracterização bioquímica e molecular de Enterococcus bacteriocinogênicos em leite cru de búfala no sul do Brasil.
Autor	JÚLIA ROBERTA BUBOLTZ
Orientador	TIANE MARTIN DE MOURA
Instituição	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

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 *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. Nesse estudo, foram avaliadas 4 amostras de leite cru de búfala entre maio e julho de 2013. Um mililitro de leite foi adicionado em 9mL de caldo azida dextrose, meio seletivo para enterococos e estreptococos. Foram realizadas diluições seriadas e estas foram inoculadas em ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI) acrescido de 6,5% de NaCl. Após a incubação, colônias foram selecionadas aleatoriamente colônias de cada amostra que foram e semeadas em meio diferencial ágar bile esculina. Na sequência, foi realizada coloração de Gram e catalase em todas as amostras. O armazenamento foi realizado a -20°C em criotubos contendo BHI caldo e 50% de glicerol. A identificação do gênero foi realizada pela reação em Cadeia de Polimerase (PCR) empregando oligonucleotídeos gênero-específico *tuf* e um PCR da região 16SrRNA Para identificação das espécies foram empregadas provas bioquímicas seguindo as recomendações do *Manual of Clinical Microbiology*. Foi verificada a produção de ácido pelos micro-organismos utilizando diferentes fontes de carbono, a utilização do piruvato e a hidrólise da arginina. Todas as espécies foram confirmadas através de um PCR multiplex para as seguintes espécies mais prevalentes: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*. A detecção do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi testada através do método de disco-difusão, segundo o CLSI 2013, com os antimicrobianos: ampicilina, estreptomina, gentamicina, vancomicina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacino, nitrofurantoína e norfloxacino. Na triagem dos isolados produtores de substância antagonista foi realizado o teste da dupla camada segundo Tagg *et al.* em 1971, para a verificação do halo de inibição. Para isso, foram utilizados os enterococos isolados frente aos diferentes sorotipos (1/2c, 1/2a, 1/2b, 4c, 4b e 1c) de *L. monocytogenes* (n=10). Foram isolados 40 *Enterococcus* de 4 amostras de leite cru de búfala. Todos se apresentaram como cocos Gram positivos e com arranjo característico do gênero. Além disso, todos isolados eram catalase negativos. O PCR dos genes *tuf* e 16SrRNA foram positivos para todos os isolados confirmando o gênero microbiano. Através da identificação fenotípica, pode-se detectar a presença de um isolado de *Enterococcus gallinarum* e 39 *Enterococcus faecalis*, os quais foram confirmados através do PCR multiplex. Todos os isolados foram sensíveis aos antimicrobianos testados com exceção de um que apresentou resistência a três antimicrobianos e foi excluído do estudo. No método da dupla camada para triagem de enterocinas, das 40 amostras isoladas, 21 foram produtoras de substância antagonista. Como conclusão do presente estudo, os enterococos isolados de amostra de leite cru de búfala mostraram atividade antimicrobiana contra todos os sorotipos de *L. monocytogenes* mostrando seu potencial como biopreservante de alimentos. Além disso, um biopreservante natural, pode um dia vir a substituir os preservantes químicos utilizados na indústria de alimentos. Como continuidade do estudo, pretende-se agora, avaliar a presença de genes de enterocinas, nas amostras e verificar a presença de fatores de virulência nestas amostras.

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.