



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

Dissertação de Mestrado

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGÔNICO DE ESPÉCIES DE *Lactobacillus* SOBRE *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*

Larissa Batista Poppi

**Lorena – SP – Brasil
2005**

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Universitária da
FAENQUIL

Poppi, Larissa Batista
P831a Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus*
sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*/
Larissa Batista Poppi.- - Lorena, 2005.
113f.: il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia
Química de Lorena. Departamento de Biotecnologia.
Orientador: Ismael Maciel de Mancilha.

1. Biotecnologia 2. Efeito antagônico 3. *Lactobacillus* 4.
Escherichia coli O157:H7 5. *Listeria monocytogenes* . I.
Mancilha, Ismael Maciel, orientador. II. Título

CDU

574.6

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGÔNICO DE ESPÉCIES DE
Lactobacillus* SOBRE *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria
monocytogenes

Dissertação de mestrado apresentada
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia Industrial.

Banca Examinadora:

Dr. Ismael Maciel de Mancilha - Faenquil - SP
Dr. Antônio José Piantino Ferreira - USP - SP
Dra. Maria da Graças de Almeida Felipe - Faenquil - SP

Estudante:

Larissa Batista Poppi

Lorena - SP - Brasil
2005

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGÔNICO DE ESPÉCIES DE
Lactobacillus SOBRE *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria
monocytogenes***

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado aprovada pela banca examinadora.

Dr. Ismael Maciel de Mancilha
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

**Lorena - SP - Brasil
2005**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Nivaldo e Judith e a minha irmã Lenise pela compreensão e apoio.

Ao Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha pela orientação, apoio e incentivo ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira, pela orientação e colaboração para realização deste trabalho.

Ao André pela constante presença, paciência e companheirismo.

A todos os amigos do Laboratório de Ornitopatologia da USP, Claudete, Laura, Jorge, Eliana, Marcelo, Amarílis, Antônio Carlos, Cristina, Luciana, Lílian, Maria José e em especial Débora e Carina pelo companheirismo e convívio durante a realização da parte experimental.

A todos os amigos do DEBIQ, em especial, Lili, Débora, Rita, Giovani, Talita, Amanda, Sandra Borges, Carlos e Priscila.

A todos meus amigos que não são do DEBIQ, em especial Ana Paula, Annya, Thalita, Maria Fernanda, Gabis, Maíra, Carla, Gustavo, Júlio, Guto, Diego, Carol e Adriana que foram muito importantes nessa jornada.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biotecnologia.

A Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGÔNICO DE ESPÉCIES DE *Lactobacillus* SOBRE *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*. Larissa Batista Poppi. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Orientador: Dr. Ismael Maciel de Mancilha (Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, CP 116, Lorena, SP, Brasil). Banca Examinadora: Dr. Antônio José P. Ferreira e Dra. Maria das Graças A. Felipe. Agosto de 2005.

Os probióticos são conhecidos por promover o equilíbrio da flora microbiana intestinal afetando benéficamente o hospedeiro, destacando-se as bactérias lácticas como seus principais componentes. Entre os efeitos benéficos se destacam a supressão de bactérias indesejáveis, bem como a produção de substâncias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. O estudo do efeito de microrganismos probióticos sobre a inibição de patógenos é de grande interesse, uma vez que estas bactérias são agentes causadores de toxinfecções alimentares, como *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*.

No presente trabalho avaliou-se o efeito antagônico de oito cepas de *Lactobacillus* pertencentes às espécies *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* (30b e 30c), *L. plantarum* (11fb, 22c e 41b), *L. reuteri* (18fa e 19fa), *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (17fb) sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*. Para tanto avaliou-se o efeito das culturas de *Lactobacillus* sobre os microrganismos patogênicos utilizando a metodologia do ágar "spot test". A presença de substâncias antimicrobianas no sobrenadante foi avaliada acompanhando o crescimento celular dos patógenos por turbidimetria quando em contato com os mesmos. Através da técnica do ágar "spot test" verificou-se maior efeito de inibição pelas cepas de *Lactobacillus* na ausência de bicarbonato de sódio, sugerindo que os ácidos orgânicos são responsáveis pelo efeito. Verificou-se efeito bacteriostático sobre os microrganismos patogênicos na presença dos sobrenadantes com pH natural de todas as cepas de *Lactobacillus* e efeito bactericida dos sobrenadantes das cepas *L. reuteri* (19fa) e *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (17fb) e do pool sobre *Escherichia coli* O157:H7. Avaliou-se também o efeito dos sobrenadantes dos cultivos de *Lactobacillus* sobre as suspensões celulares das mesmas, verificando-se que os sobrenadantes das cepas *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* (30b e 30c) estimularam e as demais interferiram negativamente no crescimento das cepas de *Lactobacillus* estudadas.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTAGONISTIC EFFECT OF *LACTOBACILLUS* SPECIES ON *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 AND *LISTERIA*

MONOCYTOGENES. Larissa Batista Poppi. Master degree Dissertation. Post-Graduation Program in Industrial Biotechnology. Department of Biotechnology. Chemical Engineering Faculty of Lorena. Supervisor: Dr. Ismael Maciel de Mancilha (Department of Biotechnology, FAENQUIL, Lorena, SP, Brazil). Examining Board: Ismael Maciel de Mancilha (Chair), Dr. Antonio José Piantino Ferreira and Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe. August, 2005.

The probiotics are known by promoting the equilibrium of the microbial intestinal transit, beneficially affecting the host, distinguishing the lactic bacteria as their main components. The benefic effects such as the suppression of undesired bacteria and the production of anti-microbial substances like lactic acid, peroxide of hydrogen and bacterocins are stood out. The study of the effect of probiotic microorganisms on the inhibition of pathogenes is highly interesting, once these bacteria, mainly the *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*, are important agents that cause alimentary toxic infections.

The present work evaluated the antagonistic effect of eight *Lactobacillus* strains belonging to the *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* (30b and 30c), *L. plantarum* (11b, 22c, and 41b), *L. reuteri* (18fa and 19fa), *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (17fb) species on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. For this purpose, the effect of the substances present in the supernatant of *Lactobacillus* cultures on the pathogenic microorganisms was evaluated by using the "spot test" agar methodology and the cell growth of the pathogenes when in contact with the supernatants was accomplished by turbidimetry.

The highest inhibition effect was caused by the evaluated strains in the sodium bicarbonate absence, thus suggesting that the organic acids are responsible for this observed effect. A bacteriostatic effect on pathogenic microorganisms in the presence of supernatants with natural pH was verified for all *Lactobacillus* strains and bactericidal effect on *Escherichia coli* O157:H7 was verified in the presence of supernatants of the strains *L. reuteri* (19fa), *L. delbrueckii* subsp *delbrueckii* (17fb) and pool of eight species of *Lactobacillus*. The effect of the supernatants of *Lactobacillus* cultures on their cell suspensions was also evaluated, verifying that the supernatants of *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* (30b and 30c) stimulated and the others negatively interfered the cell growth of the evaluated *Lactobacillus* strains.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Microbiota intestinal.....	03
2.2 Microrganismos Patogênicos.....	05
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	05
2.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	07
2.3 Probióticos.....	10
2.3.1 <i>Definição e Composição</i>	10
2.3.2 <i>Mecanismos de Ação</i>	14
2.4 Exclusão competitiva.....	15
2.4.1 <i>Adesão</i>	19
2.4.2 <i>Produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio</i>	20
2.4.3 <i>Bacteriocina</i>	22
3 MATERIAL DE MÉTODOS.....	27
3.1 Microrganismos.....	27
3.2 Condições de manutenção dos microrganismos.....	27
3.3 Ativação dos microrganismos.....	28
3.4 Testes para confirmação das características da culturas.....	28
3.5 Obtenção das células de <i>Lactobacillus</i>	29
3.6 Obtenção dos sobrenadantes dos cultivos de <i>Lactobacillus</i>	30
3.7 Determinação do crescimento de bactérias patogênicas.....	31
3.8 Avaliação do efeito de inibidores de proteases sobre as bactérias patogênicas.....	31
3.9 Avaliação do efeito de espécies de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e <i>Listeria monocytogenes</i>	32
3.10 Avaliação do efeito de substâncias antimicrobianas produzidas pelas cepas de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e <i>Listeria monocytogenes</i>	33

3.11 Avaliação do efeito cruzado do sobrenadante sobre o desenvolvimento de cepas de <i>Lactobacillus</i>	34
4 RESULTADOS DE DISCUSSÃO.....	36
4.1 Determinação da população e caracterização dos microrganismos avaliados.....	36
4.2 Avaliação do Efeito de Inibidores de Proteases sobre as Bactérias Patogênicas.....	39
4.3 Avaliação do efeito de inibição de espécies de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e <i>Listeria monocytogenes</i>	40
4.4 Avaliação do efeito de substâncias antimicrobianas presentes nos sobrenadantes de culturas de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e <i>Listeria monocytogenes</i>	45
4.5 Avaliação do efeito do sobrenadante sobre o desenvolvimento de cepas de <i>Lactobacillus</i>	58
5 CONCLUSÕES.....	64
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
8 APÊNDICE.....	83

Lista de Tabelas

TABELA 1: Esquema representativo das microplacas utilizadas para a verificação do efeito antagônico entre as cepas de <i>Lactobacillus</i> . Onde: C corresponde à suspensão celular e S ao sobrenadante.....	35
TABELA 2: <i>Lactobacillus</i> cultivados em caldo MRS por 18 horas.....	36
TABELA 3: Crescimento das bactérias patogênicas na presença de inibidores de proteases.....	39
TABELA 4: Efeito de substâncias presentes nos sobrenadantes, a pH natural, sobre <i>L. monocytogenes</i> e <i>E. coli</i> O157:H7.....	48
TABELA 5: Concentração de ácido láctico produzido pelas cepas de <i>Lactobacillus</i> cultivados em caldo MRS por 18 horas.....	56

Lista de Figuras

- FIGURA 1:** Curva de crescimento de **A-** *Listeria monocytogenes* e **B-** *Escherichia coli* O157:H7..... **38**
- FIGURA 2:** Efeito de inibição de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7..... **41**
- FIGURA 3:** Efeito de inibição de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7, na presença de bicarbonato de sódio..... **41**
- FIGURA 4:** Efeito de inibição de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes*..... **41**
- FIGURA 5:** Efeito de inibição de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes*, na presença de bicarbonato de sódio..... **42**
- FIGURA 6:** Efeito de inibição de cepas de *Lactobacillus* sobre **A -** *Escherichia coli* O157:H7 e **B -** *Listeria monocytogenes* na presença e ausência de bicarbonato de sódio no meio MRS..... **43**
- FIGURA 7:** Curva de crescimento *L. monocytogenes* na presença dos sobrenadantes de *Lactobacillus* **A**-com pH 7,0 e **B**-sem ajuste de pH. Sobrenadantes de *Lactobacillus*: 11fb, 17fb, 18fa, 19fa, 22c, 30b, 30c, 41b, *pool A* , *pool B*, controle 1 e controle 2..... **47**
- FIGURA 8:** Curva de crescimento *E. coli* O157:H7 na presença dos sobrenadantes de *Lactobacillus* **A**-com pH 7,0 e **B**-sem ajuste de pH. Sobrenadantes de *Lactobacillus*: 11fb, 17fb, 18fa, 19fa, 22c, 30b, 30c, 41b, *pool A* , *pool B*, controle 1 e controle 2..... **49**

FIGURA 9: A - Curva de crescimento de *L. monocytogenes* - **A** e *E. coli* O157:H7 - **B** em meios MRS e BHI em diferentes pH. MRS pH 3,61, MRS pH 4,17, MRS pH 6,33, BHI pH 3,66, BHI pH 4,15 e BHI pH 7,38..... **55**

FIGURA 10: Curva de crescimento de **A**-*Lactobacillus plantarum* (11fb), **B**- *L. plantarum* (22c), **C**- *L. plantarum* (41c) quando em contato com sobrenadantes de *Lactobacillus*. Sobrenadantes de *Lactobacillus* 11fb, 17fb, 18fa, 19fa, 22c, 30b, 30c, 41b, controle 1, controle 2 e 75 µL de suspensão celular de *Lactobacillus* + 75 µL de caldo MRS pH 3,60..... **59**

FIGURA 11: Curva de crescimento de **A**- *Lactobacillus delbruecki* supb. *delbruecki* (17fb), **B**- *L. reuteri* (18fa), **C**- *L. reuteri* (19fa) quando em contato com sobrenadantes de *Lactobacillus*. Sobrenadantes de *Lactobacillus* 11fb, 17fb, 18fa, 19fa, 22c, 30b, 30c, 41b, controle 1, controle 2 e 75 µL de suspensão celular de *Lactobacillus* + 75 µL de caldo MRS pH 3,60..... **60**

FIGURA 12: Curva de crescimento de **A**- *Lactobacillus casei* supb. *pseudopantarum* (30b), **B**- *L. casei* supb. *pseudopantarum* (30c) quando em contato com sobrenadantes de *Lactobacillus*. Sobrenadantes de *Lactobacillus* 11fb, 17fb, 18fa, 19fa, 22c, 30b, 30c, 41b, controle 1, controle 2 e 75 µL de suspensão celular de *Lactobacillus* + 75 µL de caldo MRS pH 3,60..... **61**

1 INTRODUÇÃO

O termo probiótico foi proposto por Parker em 1974 para descrever os microrganismos vivos cuja ação produzia efeito oposto àqueles exercidos pelos antibióticos. De uma maneira geral os probióticos promovem o equilíbrio da flora microbiana intestinal afetando benéficamente o hospedeiro, destacando-se as bactérias lácticas como seus principais componentes, que também são constituintes da microbiota normal do homem e outros animais.

Nas últimas décadas, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando elucidar o mecanismo de ação das bactérias lácticas, consideradas GRAS, no organismo hospedeiro. Os efeitos descritos até o momento compreendem a supressão de bactérias e vírus indesejáveis; estimulação da imunidade local e sistêmica; alteração da atividade metabólica microbiana intestinal; produção de substâncias antibacterianas como ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas; competição por sítios de adesão; promoção da produção de muco intestinal e competição por nutrientes.

O estudo do efeito causado por probióticos sobre a inibição de patógenos é de grande interesse, uma vez que, tais bactérias são importantes agentes causadores de doenças do trato gastrointestinal. Dentre os microrganismos patogênicos de importância, no tocante à segurança alimentar, *Escherichia coli* desempenha papel importante na veiculação de doenças, que poderão apresentar-se agravadas, em função da cepa envolvida. Vários surtos de toxinfecção alimentar envolvendo principalmente o consumo de carne mal cozida, têm sido registrados, apontando *E. coli* como principal agente etiológico.

Escherichia coli O157:H7 pertence ao grupo EHEC (enterohemorrágicas), que apresenta característica peculiar quanto ao tipo de sintomas desencadeados por sua ação, manifestando-se sob a forma de diarreia sanguinolenta nos indivíduos acometidos e progredindo para quadros mais graves, como, colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica.

A carne bovina é uma das principais fontes potenciais de *E. coli* O157:H7, uma vez que o trato intestinal desses ruminantes é tido como

reservatório desta bactéria. Isto constitui-se num grave problema em frigoríficos, pois a contaminação da carne pode ocorrer durante o abate do animal, comprometendo todo o processo. Em estudo recente, pesquisadores verificaram que animais tratados com probióticos, exibiram uma diminuição nos níveis de *E. coli* O157:H7 na ordem de 50 a 60%.

Listeria monocytogenes, agente causador da listeriose, é de grande importância para a indústria alimentícia, pois esta bactéria é capaz de proliferar-se em ambientes refrigerados, condições que normalmente são estocados os alimentos. Os indivíduos acometidos por listeriose podem contrair infecção intra-uterina, meningite e septicemia. A incidência da listeriose é baixa, mas especial atenção tem sido dada devido sua alta taxa de mortalidade e seqüelas deixadas nos indivíduos, tendo em vista que esta infecção afeta o sistema nervoso central.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito antagônico de bactérias lácticas, que apresentam propriedades probióticas, sobre bactérias patogênicas, em particular *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microbiota intestinal

Antes de nascer o feto é estéril, porém com o nascimento ocorre um final abrupto desta esterilidade e a colonização microbiana começa imediatamente após o nascimento. Ocorre uma transferência de microrganismos natural à criança através da vagina materna e depois estes microrganismos são adquiridos do meio ambiente. Na fase adulta a microbiota intestinal é relativamente estável, entretanto em indivíduos idosos ocorre uma desestabilidade desta microbiota (GILL, 2003).

A microbiota normal do intestino atua como um mecanismo de defesa do indivíduo, ainda pouco explorado. Apesar das bactérias estarem distribuídas por todo o intestino, a maior concentração de microrganismos e, conseqüentemente maior atividade metabólica é encontrada no intestino grosso, sendo que mais de 500 espécies podem ser encontradas neste ambiente em um adulto humano (ISOULARI et al., 2004). Esses microrganismos convivem em relações simbióticas ou antagônicas, crescendo a partir dos alimentos que são ingeridos ou das secreções do trato gastrintestinal do hospedeiro (MITSUOKA, 1992).

De acordo com ADLERBERTH et al., (2000) a microbiota desempenha uma função importante que é a proteção contra a entrada de microrganismos indesejáveis no organismo. Estudos têm demonstrado que animais sem germes são mais susceptíveis às infecções, portanto a microbiota intestinal é considerada um importante constituinte de defesa da mucosa. Esta observação é conhecida como resistência à colonização tendo em vista que as bactérias da mucosa intestinal competem pelos mesmos sítios de ligação que as bactérias patogênicas, metabolizam os mesmos nutrientes e produzem compostos inibidores para o crescimento de patógenos ou impedem a entrada de bactérias transientes que não participam da microbiota intestinal.

ISOULARI (2004) mencionou que a interação entre bactéria e mucosa inata e sistema imune adaptado fornece uma base para a compreensão da função da microbiota intestinal em alcançar um organismo livre de

enfermidades, mesmo este sendo desafiado com a presença constante no lúmen intestinal de uma grande quantidade de antígenos provenientes de alimentos e microrganismos.

A importância da microbiota intestinal tem atraído muito interesse nos últimos anos, principalmente com respeito a diferentes maneiras que esta pode ser manipulada para melhorar a saúde. Os probióticos são suplementos que contêm microrganismos vivos que podem mudar tanto a composição como a atividade metabólica da microbiota, ou modular a reatividade do sistema imune de uma maneira benéfica (MACFARLANE & CUMMINGS, 2002).

MITSUOKA (1992) relatou que em diferentes regiões do trato gastrointestinal estão presentes grupos específicos de microrganismos, que são capazes de produzir uma grande variedade de compostos que apresentam diferentes efeitos na fisiologia intestinal, assim como outras influências sistêmicas. De acordo com este autor podem ser produzidas também várias enzimas, que podem atuar metabolicamente no intestino e na conversão de substâncias em compostos que podem ser benéficos ou nocivos ao hospedeiro. Esses compostos podem afetar a nutrição, a fisiologia, a eficácia de drogas, a carcinogênese, o processo de envelhecimento, assim como a resistência do hospedeiro à infecção além de alguns poderem causar doenças.

As bactérias nocivas podem formar compostos tóxicos para o hospedeiro destacando-se as substâncias putrefativas (amônia, H₂S, aminas, fenol, indol e outros) e ácidos biliares secundários. Essas substâncias podem prejudicar o intestino diretamente e são também parcialmente absorvidas, contribuindo ao longo da vida do hospedeiro, para o processo de envelhecimento, câncer e outros problemas geriátricos (MITSUOKA, 1992).

2.2 Microrganismos Patogênicos

2.2.1 *Escherichia coli* O157:H7

Dentre as diversas espécies de microrganismos patogênicos *Escherichia coli*, pertencente ao grupo das Enterobactérias, é capaz de produzir potentes toxinas, dentre elas a "Shiga-like" que causa danos à parede do intestino.

O gênero *Escherichia* compreende seis espécies: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris* e *E. blattae*. *E. coli* classificada como bastonete Gram negativo é o organismo aeróbio mais comum no trato gastrintestinal dos homens e de muitos outros animais e sua presença em alimentos e água é indicadora de poluição fecal (KUNTZ, 1999).

Contudo em anos recentes *E. coli* tem sido reconhecida como uma espécie patogênica causadora de doenças intestinais. Existem as *E. coli*: Enteropatogênicas (EPEC), Enterotoxigênicas (ETEC), Enteroenvasivas (EIEC), Enterohemorrágicas (EHEC), Enteroaderentes-agregadas (EA-AggEC), sendo que *E. coli* enterohemorrágica é causadora de dois tipos de enfermidades graves: colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (HUS) (VARNAM e EVANS, 1991, KUNTZ, 1999).

Segundo PADHYE & DOYLE (1992) a colite hemorrágica apresenta um período de incubação de 3 a 4 dias, mas em idosos pode durar até 8 dias e em crianças canadenses houve casos com duração de 1 a 14 dias. Os primeiros sintomas são fortes dores abdominais, diarréia, vômitos e náuseas, seguidos de diarréia sanguinolenta por um ou dois dias. O indivíduo contaminado pode apresentar quadro febril nos primeiros dias, mas nem sempre esse sintoma se manifesta. A diarréia sanguinolenta é característica das espécies enterohemorrágicas e associada principalmente ao sorotipo O157:H7.

A síndrome urêmica hemolítica (HUS) se manifesta inicialmente com diarréia seguida de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e falha renal aguda. A HUS pode causar problemas neurológicos e quando associada ao sorotipo O157:H7 pode provocar diarréia sanguinolenta e

febre alta. Os principais riscos das complicações sistêmicas estão associados à toxina Shiga-like (LIOR, 1993).

Escherichia coli O157:H7 possui três diferentes fatores virulentos, que parecem desempenhar papel crucial na patogênese. O primeiro é a produção da toxina citotóxica "Shiga-like" (SLT I e II), o segundo é a produção de hemolisina a qual está relacionada com a alfa hemolisina de outras espécies de *Escherichia* e o último é a capacidade que esta bactéria tem de aderir-se e colonizar a superfície intestinal. A fixação na superfície da mucosa previne a perda da bactéria por peristaltismo e promove um aumento na concentração de toxinas liberadas pela célula (KUNTZ, 1999).

E. coli O157:H7 foi isolada pela primeira vez em 1975 de uma mulher californiana que apresentou diarreia sanguinolenta intensa (RILEY, et al. 1983). Esta bactéria foi responsável por vários surtos, destacando-se dentre esses um de mais de 500 indivíduos contaminados, incluindo 4 mortos no noroeste dos Estados Unidos (GRIFFIN et al., 1991; DOYLE, 1991; PADHYE et al., 1992). Outros surtos menores aconteceram nos estados da Califórnia, Nevada e Idaho (TARR, 1993). No Canadá também se registrou histórico de surtos provocados pela ingestão de *E. coli* O157:H7 (GRIFFIN et al., 1993).

As características específicas de *E. coli* O157:H7 permitem a fácil disseminação desta bactéria, como sobrevivência em valores de pH menores que 2 em temperaturas menores que 5°C e dose infectante muito baixa, associada ao consumo de menos de 50 células (KUNTZ, 1999, CLEARY, 2004).

As doenças causadas por *E. coli* O157:H7 estão relacionadas ao consumo de carnes mal cozidas, leite, água, maçã e maionese (GRIFFIN et al., 1991; LIOR, 1993; MADDEN, 1993; RICE, 1993). A contaminação se dá pelo contato entre pessoas, água de piscinas e lagos quando se banham nestes locais contaminados (GRIFFIN et al., 1991). Em estudos conduzidos por CLEARY (2004) verificou-se que quando uma criança está infectada, outros membros da mesma família adoecem ou ficam colonizados. DENG et al., 1998 verificaram que *E. coli* O157:H7 é encontrada em maiores quantidades quando o pH dos alimentos é alto e KUDVA et al., 1996 relacionou a incidência de *E. coli* O157:H7 com a variação do clima,

constatando maior incidência em climas quentes, sendo que nos Estados Unidos, nos meses de junho a novembro, esta incidência é 31% maior que nos demais meses do ano .

No Brasil, no estado do Rio de Janeiro, em pesquisa realizada por CERQUEIRA et al., (1999), se isolou pela primeira vez *Escherichia coli* O157:H7, quando 197 amostras de reto bovino foram analisadas. As amostras provenientes de gado de leite, gado de corte e de abatedouro foram utilizadas para a detecção de *E. coli* produtoras da toxina "Shiga-like", sendo encontrada uma incidência de 71% nas amostras. Três amostras, sendo uma isolada de gado de corte e duas de gado leiteiro foram positivas para *E. coli* O157:H7, sendo reportado pela primeira vez o isolamento dessa bactéria em nosso país.

Para se determinar a ocorrência, sorotipos e virulência de cepas de *Escherichia coli* produtoras da toxina "Shiga-like" (STEC), 153 amostras de fezes de gado de 6 fazendas no estado de São Paulo foram analisadas. Encontrou-se 202 cepas de STEC, sendo que a porcentagem mínima de contaminação foi de 3,8 e a máxima de 84,6%, dependendo da fazenda analisada, sendo que dentre estas, somente duas cepas de *Escherichia coli* O157:H7 (0,6%) foram isoladas e não apresentaram atividade citotóxica (IRINO, 2005).

A temperatura ótima de crescimento da *E. coli* é de 37°C, podendo variar de 4 a 44°C, sendo que *E. coli* O157:H7 é capaz de sobreviver em carne moída por nove meses a uma temperatura de -20°C. Este sorotipo é caracterizado por não ser capaz de fermentar sorbitol em 24 horas (MENG et al., 1994).

A progressão dos sintomas da colite hemorrágica e HUS não podem ser prevenidas, e experimentos "in vitro" sugerem que os antibióticos aumentam a produção das toxinas pelas bactérias enterohemorrágicas, podendo agravar os casos (KUNTZ, 1999; CLEARY, 2004).

2.2.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, agente causador da listeriose, foi reconhecida como patógeno animal em 1924 em Cambridge por Murray

(MENA et al., 2004 e MCLAUHLIN et al., 2004), mas em 1980 com o aumento da ocorrência desta doença, que pode ser fatal, o interesse por esse microrganismo se renovou (BARBALHO et al., 2005; MCLAUHLIN et al., 2004).

O gênero *Listeria* compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. welshimeri* (BELL & KYRIAKIDES, 1998). Todas as espécies de *Listeria* são amplamente distribuídas na natureza e têm sido isoladas do solo, vegetação, esgoto, água, alimentação animal, carnes frescas e congeladas incluindo a de aves, e fezes de animais saudáveis incluindo o homem (MCLAUHLIN et al., 2004).

Dentre os alimentos que veiculam estas espécies de microrganismos destacam-se carnes cruas ou congeladas de boi, porco e aves, leite e derivados, produtos marinhos, frutas e outros vegetais (OKUTAMI et al., 2004, LIN & CHOU, 2004).

Listeria monocytogenes é um microrganismo Gram-positivo, anaeróbio facultativo, podendo crescer em pH que varia de 4,1 a 9,2 e a temperaturas de 1 a 45°C (MURPHY et al., 2004; LIN & CHOU, 2004). Essa bactéria também é capaz de sobreviver e proliferar-se em alimentos refrigerados, embalados a vácuo, em atmosfera modificada e em ambientes com pouca quantidade de água; medidas comumente utilizadas como técnicas de conservação de alimentos. O número de bactérias nestes alimentos pode aumentar de 100 células/grama, que é a maior dose aceita para pessoas saudáveis, para mais de 10⁴ células/grama, num período de 3 a 4 semanas, que é o tempo de vida de prateleira de muitos produtos, como a carne. Produtos congelados prontos para consumo, que são estocados sob refrigeração por 10-15 dias, representam um grande risco para se contrair listeriose, quando consumidos sem o devido aquecimento para a eliminação das células bacterianas (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2003).

Também foi reportado por GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., (2003) que *Listeria monocytogenes* apresenta um curto tempo de geração em produtos marinhos (pH 6,1-7,6) quando comparado a produtos cárneos (pH 5,1-6,2). Isto se deve, em parte, ao pH dos produtos marinhos ser próximo ao ideal

para o crescimento de *Listeria monocytogenes*, que ocorre melhor em pH próximo do neutro.

Em adultos a listeriose pode ocorrer na forma invasiva ou não invasiva. Os sintomas iniciais são parecidos com os da gripe (febre, fadiga, mal-estar, náusea, cólicas, vômitos e diarreia) e a listeriose invasiva em adultos é caracterizada por septicemia e meningite (WALLS & BUCHANAN, 2005). Mulheres grávidas acometidas por listeriose podem apresentar no feto infecção sistêmica grave e na forma invasiva pode ocorrer aborto espontâneo. Em adultos e jovens, a doença se apresenta principalmente como septicemia ou infecção do sistema nervoso central (MCLAUHLIN et al. 2004). Estão mais susceptíveis à infecção, além de grávidas, recém-nascidos, idosos e pessoas com o sistema imune comprometido (WAARD et al., 2002; WALLS & BUCHANAN, 2005).

A maioria dos casos de listeriose em adultos e jovens ocorre entre imunossuprimidos, pacientes submetidos à terapia com esteróides ou citotóxicos ou ainda com neoplasmas malignos. Outro grupo de risco inclui pacientes com AIDS, diabéticos, indivíduos com válvulas no coração, alcoólatras e acometidos por cirrose. Listeriose cutânea e ocular podem ocorrer, especialmente depois do contato com o animal ou material infectado, podendo resultar em séria infecção sistêmica (MCLAUHLIN et al., 2004).

Enquanto a incidência de listeriose em humanos é baixa (2-15/milhão) a mortalidade é estimada entre 20-40%, e os sobreviventes, particularmente aqueles que apresentaram alteração no sistema nervoso central, podem desenvolver seqüelas (MCLAUHLIN et al., 2004; MENA et al., 2004). No entanto, o número de incidências pode ser alterado se levarmos em consideração os estudos realizados por MCLAUHLIN et al., (2004) nos quais relataram que muitos casos de listeriose não são diagnosticados porque as devidas análises microbiológicas não são efetuadas. Os autores afirmam que alguns casos só são diagnosticados por necropsia, que não é realizada em todos os pacientes, que fetos perdidos no início da gestação são raramente investigados, assim como indivíduos acometidos por diarreia febril. Geralmente estes casos quando são diagnosticados não são comunicados aos órgãos especializados.

No Brasil, em estudo realizado por BARBALHO et al., (2005) foram encontradas amostras contaminadas por *Listeria monocytogenes* em indústrias de beneficiamento de aves. Esse contaminante foi observado em carcaça de frango e nas mãos e luvas dos trabalhadores em diferentes etapas do processo.

HOFER et al., (2000) utilizando técnicas fenotípicas, caracterizaram espécies e sorotipos de 3112 isolados de *Listeria* de diferentes origens de infecção, em humanos (7,9%) e animais (7,6%), como também de vários veículos, como alimentos (74,8%) e meio ambiente (9,55) e em diferentes regiões do Brasil coletados no período de 1971 a 1997. Os resultados revelaram que 24,8% das cepas isoladas foram identificadas como *Listeria monocytogenes*, sendo 95,9% de origem humana, 40,2% de origem animal, 12,3% de alimentos e 19,9% do meio ambiente.

A incidência de *Listeria monocytogenes* em alimentos e sua alta taxa de mortalidade têm contribuído para que esse patógeno seja considerado um risco para a saúde pública (MENA et al., 2004).

Um elevado número de estudos referentes a medidas para se avaliar os alimentos, prevenir a contaminação por *Listeria monocytogenes* e prevenir o crescimento desta em alimentos prontos para consumo indicam que se deve: a) adequar embalagens com tratamentos listericidas, b) reduzir o tempo de prateleira e/ou c) usar microrganismos competitivos para minimizar o crescimento da bactéria patogênica (WALLS & BUCHANAN, 2005).

2.3 Probióticos

2.3.1 Definição e Composição

A palavra probiótico, *pro* (a favor) e *bio* (vida), foi citada pela primeira vez por Lilley and Stiwell em 1965 caracterizando substâncias secretadas por um microrganismo, as quais estimulavam o crescimento de outro. Porém, Metchnikoff no início do século passado já havia notado efeito benéfico em indivíduos que consumiam iogurte contendo lactobacilos (FULLER, 1992a; VANBELLE et al., 1990).

A definição de probiótico tem sofrido alterações conforme os avanços alcançados nas pesquisas. Em 1974 Parker reformulou o conceito de probióticos como sendo organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. As bactérias probióticas também foram definidas como bactérias viáveis, em cultura única ou mista, afetando benéficamente o hospedeiro em razão de promover a melhora das propriedades da microflora indígena (DONOHUE et al., 1998, HAVENAAR & VELD, 1992). Entretanto GUARNER & SCHAAFSSMA (1998) definiram probiótico como microrganismos vivos, que ingeridos em certa quantidade, exercem efeito benéfico no hospedeiro além da nutrição básica inerente, a qual tem recebido grande aceitação no meio científico.

Os principais microrganismos que apresentam propriedades probióticas são as bactérias lácticas que apresentam algumas características comuns, a saber: são Gram positivas, normalmente catalase negativa, asporogênicas, desprovidas de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar, e produtoras de ácido láctico (FERREIRA, 2003, GOMES et al., 1999). As bactérias lácticas, através da fermentação, transformam alguns açúcares especialmente a lactose, em ácidos orgânicos tais como ácidos láctico e acético.

De acordo com FERREIRA (2003) o termo "bactéria ácido láctica" inclui atualmente 15 gêneros: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são correntemente utilizados em preparações probióticas em nível tecnológico sendo não patogênicas e consideradas como GRAS (Generally Reconised As Safe) (GOMES et al., 1999).

No tocante as leveduras, em algumas espécies não patogênicas do gênero *Saccharomyces*, tem sido observado estimulação do crescimento de outros microrganismos, incluindo bactérias lácticas; por fornecer metabólitos essenciais como piruvato, aminoácidos e vitaminas. Têm sido reportado (JESPERSEN, 2003) que *Saccharomyces cerevisiae*, bem como outras espécies de leveduras são pectinase ativas, que desempenham um papel importante na disponibilização de substratos para outros

microrganismos e conseqüentemente a degradação de moléculas complexas.

Segundo JESPERSEN (2003), as leveduras do gênero *Saccharomyces* têm demonstrado efeito probiótico. Em experimentos clínicos estas mostraram ser efetivas contra gastroenterites agudas infantis e diarreia seguida de tratamento com antibióticos e possuir efeito de inibição sobre *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* e *Clostridium difficile*, bem como ser capaz de modular o sistema imune estimulando a produção de IgA e o sistema de fagocitose em camundogos (RODRIGUES et al., 2000).

As espécies mais pesquisadas incluem *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*, mas outras menos comuns tais como *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Issatchenkia orientalis* também apresentam propriedades probióticas (MAIA et al., 2001; LARA-FLORES et al., 2003; COSTALOS et al., 2003).

Segundo FULLER, (1992b) os produtos probióticos devem conter uma ou mais linhagens de microrganismos e oferecidos aos animais na forma de pó, cápsulas, tabletes, grânulos ou pasta. Podem ser administrados por inserção direta na boca, na dieta ou água dos animais.

As preparações probióticas podem conter uma ou mais espécies de microrganismos e são definidas como cepa única (que contém somente uma cepa de certa espécie), multicepas (que contém mais de uma cepa da mesma espécie ou pelo menos do mesmo gênero) ou multiespécies (que contém cepas de diferentes espécies pertencentes a gêneros diferentes) (TIMMERMAN et al., 2004).

Para que exerça a função desejada deve-se escolher cuidadosamente a cepa a ser utilizada e as bactérias devem possuir determinadas características, tais como a capacidade de passar pelo trato gástrico sem perder suas funções, atingindo a mucosa intestinal, onde desempenharão o papel benéfico interferindo no desenvolvimento de microrganismos patogênicos no trato intestinal do hospedeiro (FULLER, 1992b).

FULLER (1992b) também afirmou que um probiótico se mostra adequado quando existe a possibilidade de prepará-lo e estocá-lo como produto viável em escala industrial, tendo assim que permanecer viável e

estável por um longo período. O probiótico também deve sobreviver, não necessariamente crescer, no intestino e produzir efeito benéfico ao hospedeiro.

Segundo FIORAMONTI et al., (2003) e MACFARLANE et al., (2002) no processo de seleção das cepas de microrganismos com função probiótica deve-se considerar alguns parâmetros importantes tais como:

- Ser totalmente seguro ao hospedeiro (não-patogênica e não-tóxica);
- Ser resistente à acidez gástrica e às secreções pancreáticas;
- Aderir às células epiteliais;
- Garantir proteção contra microrganismos patogênicos através do processo de exclusão competitiva;
- Secretar substâncias inibidoras como ácidos;
- Resistir aos antibióticos;
- Tolerar aos aditivos alimentares;
- Ser estável nos alimentos;
- Contribuir para a nutrição do hospedeiro, como, por exemplo, produzir vitaminas.

Para a demonstração da atividade probiótica de certas cepas de microrganismos estudos com humanos devem ser realizados (duplo-cego, controle com placebo). Estudos "in vitro" ou com animais como teste de resistência aos sais biliares, adesão à mucosa intestinal, efeitos das células imunocompetentes ou antimutagênicas, são muito úteis na pré-seleção das cepas, porém deve ser demonstrada a eficácia em humanos (GUARNER & SCHAAFSMA, 1998).

Segundo MOTTET & MICHETTI (2005) para assegurar qualidade e confiança no uso de probióticos em humanos, foram publicados pela união entre FAO (Food and Agriculture Organization) e WHO (World Health Organization) alguns critérios e normas de extrema relevância que incluem: a) identificação do gênero e cepa por métodos aceitos internacionalmente como hibridização DNA-DNA ou seqüência do DNA codificando 16SrRNA e identificação da cepa por eletroforese; b) os produtos devem conter rótulos estipulando o gênero, espécie e cepa, quantidade (número viável de cada cepa probiótica), formulação (líquido, pó, micro-encapsulado, bactéria revestida), condições de estocagem, indicação da quantidade mínima para

ingestão diária para conferir o efeito benéfico e o nível de comprovação do efeito benéfico; c) testes de segurança incluindo a de resistência a antibióticos, produção de toxinas, atividade hemolítica, a de infecção em modelos animais imunosuprimidos, bem como registrar efeitos nos consumidores e d) ter os benefícios avaliados em experimentos aleatorizados prospectivos duplo-cego com controle ao acaso.

2.3.2 Mecanismos de Ação

Desde os anos 90 um grande número de estudos têm reportado e sustentado que a nossa saúde pode ser afetada pelo consumo diário de bactérias específicas, como os probióticos, considerados uma das categorias de maior sucesso entre os alimentos funcionais (SAXELIN et al., 2005).

Os probióticos podem ser considerados como uma maneira original para fornecer constituintes ativos contra alvos no trato gastrintestinal. Probióticos naturais ou geneticamente modificados são as origens destes constituintes, agindo também como vetores, protegendo a atividade do ácido no estômago e atuando nos sítios do intestino onde serão ativos (MARTEAU et al., 2002).

Os probióticos atuam afetando o sistema imune, reforçando a barreira da mucosa, por exclusão competitiva e suprimindo as inflamações intestinais segundo SAXELIN et al., (2005).

De acordo com diversos autores (VANBELLE et al., 1990; HAVENAAR et al., 1992; LINK-AMSTER et al., 1994; ISOLAURI et al., 1998; OUWEHAND, 1998; NICOLI et al., 2003) o mecanismo de ação dos probióticos ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, as pesquisas desenvolvidas visando seu esclarecimento sugerem os seguintes efeitos:

- Probióticos inibem a proliferação de bactérias patogênicas pela produção de ácidos orgânicos e substâncias antibióticas, ou pela redução do pH;
 - Produzem H₂O₂ e previnem a adesão de bactérias patogênicas;
 - Produzem metabólitos capazes de neutralizar toxinas bacterianas *in situ* ou pela inibição de sua produção;
-

- Produzem enzimas que auxiliam na digestão e utilização dos alimentos, ou promove a detoxificação resultante da presença de metabólitos produzidos pela flora intestinal;
- Estimulam o sistema imunológico;
- Produzem vitaminas e aumentam a atividade celular no tocante à síntese de lactase, sacarase e maltase;
- Proliferam-se no trato digestivo do hospedeiro e competem com as bactérias patogênicas;
- Reduzem o catabolismo microbiano, promovendo melhor equilíbrio da flora microbiana tendo como consequência a redução na produção e adsorção de substâncias como amônia e aminas;
- Garante melhor proteção pelos sais biliares e ácidos graxos contra a sua biotransformação em produtos nocivos e tóxicos à saúde do hospedeiro.

Segundo revisão reportada por MERCENIER et al., (2003) os probióticos, considerados alimentos funcionais, apresentam também efeitos benéficos ao hospedeiro no tocante a:

- Intolerância à lactose
- Influência positiva na microflora intestinal
- Prevenção de infecções no trato intestinal
- Melhora do sistema imune
- Redução de reações inflamatórias e alérgicas
- Efeito anticarcinogênico
- Efeito hipocolesterolêmico
- Efeito antihipertensivo
- Redução de infecções urogenitais
- Prevenção ou inibição de infecção causada por *Helicobacter pylori*
- Sensação de bem-estar

2.4 Exclusão competitiva

A microbiota intestinal contribui na proteção do hospedeiro contra patógenos exógenos, prevenindo o estabelecimento desses microrganismos no trato gastrointestinal. Waaij em 1971 caracterizou esse efeito como

resistência a colonização e Lloyd em 1977 como exclusão competitiva (HAVENAAR & VELD 1992).

Segundo SERVIN et al., (2003), KALANTZOPOULOS (1997) e JIN et al., (1996) as bactérias lácticas apresentam grande efeito inibitório sobre o crescimento e a produção de toxinas de muitas outras espécies de bactérias. Esta atividade antagônica pode ser resultado de competição por nutrientes; diminuição do potencial redutor; produção de ácido láctico e ácido acético, resultando num decréscimo de pH. Outras propriedades incluem a produção de compostos inibidores como peróxido de hidrogênio; dióxido de carbono e diacetil; produção de compostos antimicrobianos, como bacteriocinas e antibióticos; destruição de estruturas moleculares básicas dos ácidos nucleicos e proteínas celulares; adesão às células da mucosa e epitélio do intestino.

Os agentes antimicrobianos são definidos como substâncias que matam ou previnem o crescimento de microrganismos. As denominações bactericida, fungicida, viricida indicam o tipo de microrganismo destruído e bacteriostático se refere aos agentes que apenas inibem o crescimento das bactérias, bem como fungistático, dos fungos (PELCZAR et al., 2003).

Em estudo realizado por GAGNON et al., (2004) com espécies de bifidobactéria de origem humana, foi verificado, utilizando o método do "spot test", atividade antagônica desta espécie sobre *Escherichia coli* O157:H7. Os autores sugeriram que a ação antagônica se deve à produção de ácidos tais como láctico, pois quando bicarbonato foi adicionado ao ágar, ocorreu uma considerável redução na atividade de inibição. Neste mesmo estudo os autores avaliaram também a aderência de bifidobactéria às células Caco-2, verificando boa adesão e alto potencial em reduzir *Escherichia coli* O157:H7. Contudo o mecanismo pelo qual bifidobactérias inibem a adesão de patógenos às células humanas "in vitro" não foi totalmente esclarecido.

Seis espécies de bifidobactérias isoladas de fezes de crianças mostraram eficaz efeito antagônico sobre *Listeria monocytogenes* "in vitro". Contudo os sobrenadantes neutralizados de culturas de bifidobactérias apresentaram baixa inibição sobre o microrganismo patogênico testado. Os sobrenadantes foram concentrados 10 vezes e testados quanto ao seu

efeito inibitório. Os resultados demonstraram que dos seis sobrenadantes testados, três foram capazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*, indicando que os sobrenadantes não concentrados apresentavam baixa concentração de compostos inibidores. Os autores reportaram que o mecanismo de ação de bifidobactérias sobre *L. monocytogenes* não está totalmente esclarecido, mas é independente do pH, e o aquecimento do sobrenadante não interfere no seu modo de ação. Por outro lado, os sobrenadantes quando tratados com as enzimas tripsina, proteinase K e pronase E tiveram o efeito antagônico completamente eliminado (TOURÉ et al., 2003).

CHAVEERACH et al., (2004) demonstraram que *Lactobacillus* (P93) possui propriedades de inibição sobre espécies de *Campylobacter*, sugerindo que este efeito antagônico se deve à combinação de ácidos orgânicos e a produção de peptídeos que apresentam ação antimicrobiana.

LEE (2005) comparou a capacidade fermentativa de cepas de *Lactobacillus* isoladas e em culturas mistas em batelada. O estudo foi realizado em meio MRS com as seguintes espécies de *Lactobacillus*, *L. delbruecki* supb. *lactis* (ATCC 12315), *L. casei* (NRRL-B1445), *L. delbruecki* (NRRL-B445), *L. helveticus* (NRRL-B1937) e *L. casei* (NRRL-B1922) e analisou crescimento celular, utilização de glicose, síntese de ácido láctico e produção de aminoácidos. Os resultados mostraram que a cepa B-1445 foi a melhor produtora de ácido láctico, quando cultivadas isoladamente. Foi verificado um efeito benéfico quando todas as cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas no mesmo meio com relação à produção de ácido láctico. O rendimento na produção de ácido láctico em relação ao consumo de glicose foi de 85,8% para a cepa B-1445 e 95% para a cultura mista, sendo a velocidade de produção maior para a cultura mista, indicando uma interação sinérgica entre estas cepas para a produção de ácido láctico.

JIN et al., (1996) estudaram a capacidade de *Lactobacillus*, isolados do intestino de aves, em inibir microrganismos patogênicos, incluindo cinco do gênero *Salmonella* e três sorotipos de *Escherichia coli*. Os resultados mostraram que os 12 isolados de *Lactobacillus* foram capazes de inibir o crescimento dos patógenos testados em graus variáveis. Os autores salientaram que os *Lactobacillus* não só se fixam no epitélio intestinal e

bloqueiam os sítios de aderência onde os patógenos poderiam estar aderidos, mas também os inibem pela produção de substâncias que interferem no crescimento dos mesmos no intestino, como os ácidos orgânicos. Observou-se também que peróxido de hidrogênio ou bacteriocinas não causaram efeito inibitório, pois quando testados na presença de catalase e tripsina ou pronase, respectivamente, o efeito antagônico do sobrenadante não se mostrou alterado. Portanto, concluíram os autores, que o efeito de inibição observado pode ter sido causado somente pela produção de ácidos orgânicos.

Na Universidade do Alabama nos EUA foi realizada uma pesquisa utilizando carneiros e microrganismos probióticos. Avaliou-se o efeito de *L. acidophilus*, *S. faecium*, uma mistura de *L. acidophilus* e *S. faecium* e uma mistura de *L. acidophilus*, *S. faecium*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. plantarum*, administradas na dieta dos animais sobre *Escherichia coli* O157:H7 presente nas fezes. Os resultados mostraram que a mistura contendo *L. acidophilus*, *S. faecium*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. plantarum* foi a que melhor reduziu a população de *E. coli* O157:H7. Segundo os autores, a redução do número de *E. coli* O157:H7 pode ter ocorrido devido à fixação de bactérias probióticas no trato gastrointestinal, promovendo a secreção de metabólitos inibitórios a *E. coli* O157:H7. O melhor desempenho zootécnico foi observado quando os animais foram alimentados com a cultura mista de cinco microrganismos probióticos, o que pode ter repercutido favoravelmente no balanço da microbiota do intestino resultando na redução de microrganismos patogênicos. Contudo este mecanismo de ação deve ser elucidado (LEMA et al., 2001).

SHU et al., (2002) estudaram o efeito de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 sobre *Escherichia coli* O157:H7 in vivo, utilizando camundongos, onde os animais foram primeiramente alimentados com os probióticos e posteriormente infectados com o patógeno. Os resultados demonstraram que a alimentação dos animais com *L. rhamnosus* reduziu a incidência de *E. coli* O157:H7, sugerindo que essa redução pode estar associada com o aumento da resposta imune humoral e celular dos animais. Os autores observaram também uma alta fagocitose no grupo de animais que recebeu o probiótico, quando comparado com o controle.

FERNÁNDEZ et al., (2003) avaliaram o efeito antagônico de duas cepas de *Lactobacillus* (*L. gasseri* e *L. acidophilus*) e verificaram que estas eram capazes de inibir *Clostridium*, *Campylobacter* e *Listeria* devido à produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, utilizando a metodologia do ágar "spot test".

PEREIRA et al., (2004) estudando o potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum* e de *Lactobacillus fermentum* verificaram que essas espécies inibiram as cepas EPEC e ETEC de *Escherichia coli*. Segundo os autores essa inibição pode ter sido provocada pela ação de bacteriocinas, pois utilizou-se uma metodologia na qual o pH se manteve constante, eliminando assim o efeito de acidificação do meio, devido à produção de ácidos; contudo o exato mecanismo pelo qual os lactobacilos inibiram os patógenos não puderam ser elucidados. Neste mesmo estudo verificou-se o efeito dos sobrenadantes das culturas de bactérias probióticas, cujos resultados foram positivos para a inibição das cepas EPEC e ETEC de *Escherichia coli*.

Pesquisadores do Instituto Americano da Carne (AMI) observaram que a presença de bactérias probióticas quando adicionadas à ração de gado, além de aumentar sua performance zootécnica, reduziu a incidência de *Escherichia coli* O157:H7 nas fezes dos animais em 50-60%. Neste experimento os animais foram divididos em três grupos e foram administradas três dietas diferentes. As fezes dos animais foram analisadas e os animais cuja dieta continha probióticos teve uma incidência de *E. coli* O157:H7 em média 60% menor que os demais (ROEN, 2002).

2.4.1 Adesão

A presença de algumas bactérias no trato intestinal é dependente da sua habilidade em aderir ao epitélio intestinal (FULLER, 1992a). Os lactobacilos de origem intestinal possuem propriedades adesivas que os permitem inibir a colonização e/ou prevenir a colonização por microrganismos patógenos (SERVIN, et al. 2003).

Segundo ROSTAGNO et al., (2003) os probióticos competem com os patógenos pelos receptores celulares como, por exemplo, α -glucosamina. A

maioria dos probióticos pode interagir com a membrana intestinal, formando uma parede de defesa contra os patógenos invasores, ou seja, formam uma “película biológica” que evita a aderência de microrganismos indesejáveis.

De acordo com SERVIN et al., (2003) o processo de adesão microbiana de bactérias lácticas inclui, além de outros fatores, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ácidos lipoteicóicos.

Um dos mecanismos de ação dos probióticos é a inibição pela competição por sítios de adesão bacteriana na superfície do epitélio intestinal. FERNANDEZ et al., (2003) estudaram a aderência de *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus acidophilus*, e verificaram que as duas cepas apresentaram esta propriedade, sendo a primeira mais fortemente aderida às células Caco-2. No caso do *Lactobacillus gasseri* o mecanismo de aderência envolve proteínas e carboidratos, possivelmente glicoproteínas, enquanto no caso do *Lactobacillus acidophilus*, parece depender de carboidratos, sendo que cátions divalentes estão envolvidos neste mecanismo.

A adesão de bifidobactérias às células Caco-2 foi avaliada separadamente ou em competição com *Escherichia coli* O157:H7. Verificou-se que *Bifidobacterium bifidum* e *B. pseudolongum* são capazes de reduzir a adesão de *E. coli* O157:H7 em mais de 50% (GAGNON et al., 2004).

GOPAL et al., (2001) estudaram as propriedades de adesão “in vitro” de três cepas probióticas, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, usando diferentes células intestinais humanas incluindo HT-29, Caco-2 e HT29-MTX. As três cepas mostraram forte adesão, permanecendo fixadas às mono-camadas das células epiteliais depois de serem extensivamente lavadas, evidenciando que a adesão é mais que uma propriedade física não específica.

2.4.2 Produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio

O modo de ação dos ácidos orgânicos (acético, fórmico e láctico) é atribuído pela redução direta do pH intracelular por ionização dos ácidos não dissociados (BARBOSA & TORRES, 1999). A ação inibitória dos ácidos

orgânicos na forma não dissociada é de 100 a 600 vezes maior do que a forma dissociada. Os ácidos orgânicos não dissociados podem permear a membrana celular por difusão e liberar prótons na célula. O influxo de prótons parece induzir a acidificação do citoplasma e dissipar o potencial de prótons da membrana (EKLUND, 1983). Isto induz ao rompimento da força próton motora e inibe o mecanismo de transporte de substrato, o processo de geração de energia e a síntese de macromoléculas (DIEZ-GONZALES & RUSSEL, 1997).

O principal metabólito produzido pelas bactérias lácticas é o ácido láctico, que pode diminuir o pH do meio, sendo suficiente para exercer efeito de inibição sobre muitos microrganismos. A concentração de ácido láctico encontrada em muitos alimentos fermentados pode ser suficiente para impactar a estabilidade microbiológica (EARNSHAW, 1992). Em adição ao efeito do pH, outros ácidos graxos de cadeia curta não-dissociados, mediam o efeito antimicrobiano resultando na diminuição do gradiente de próton, podendo ser letal às bactérias susceptíveis. Os ácidos graxos de cadeia curta são frequentemente produtos finais de fermentações anaeróbias e podem ser tóxicos se o meio não estiver tamponado. As bactérias diferem uma das outras em relação à sensibilidade aos ácidos graxos de cadeia curta (RUSSEL, 1991).

Segundo NES et al., (2004) e ROSSLAND et al., (2005) o principal fator antimicrobiano identificado nas bactérias ácido lácticas é a habilidade que estas têm de produzir ácidos orgânicos e conseqüentemente diminuir o pH. Outros fatores como a produção de peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e etanol podem contribuir para garantir a integridade de alimentos fermentados, porém a contribuição destes é secundária.

O ácido acético e o ácido propiônico são produzidos em quantidades traços por bactérias lácticas. Os ácidos acético e propiônico possuem valores de pK_a mais altos que o do ácido láctico e por essa razão possuem uma maior proporção de moléculas não-dissociadas quando comparados com o ácido láctico em um dado pH (EARNSHAW, 1992).

Algumas espécies de *Lactobacillus* e *Lactococcus* apresentam atividade lipolítica e sobre determinadas condições produzem significantes concentrações de ácidos graxos, que apresentam atividade antimicrobiana.

Os ácidos graxos com cadeias carbônicas de 12 a 16 átomos de carbono são mais efetivos. (EARNSHAW, 1992).

Conforme DAESCHEL (1989) os lactobacilos têm a capacidade de gerar peróxido de hidrogênio por diversos mecanismos. Pelo fato dos lactobacilos não possuírem a enzima catalase, ocorre um acúmulo de peróxido de hidrogênio no meio de cultivo, podendo reagir com outros compostos formando substâncias inibitórias (BUCHANAN & GIBBSONS, 1974).

Em estudo realizado por SAMELIS et al., (2005) verificou-se o efeito de nisina (bacteriocina) na presença e ausência de ácidos orgânicos (acético e láctico) ou sais (acetato de sódio ou diacetato) como inibidores de *Listeria monocytogenes* em embutido de carne de porco. O embutido foi inoculado com a bactéria patogênica e recebeu os tratamentos antes de ser embalado a vácuo e estocado a 4°C por 120 dias. Neste estudo mostrou-se que o efeito de nisina combinada com ácido acético, diacetato de sódio e benzoato de potássio é mais efetivo que a de ácido láctico, acetato de sódio e sorbato de potássio, sendo esses dois tratamentos mais efetivos que nisina adicionada isoladamente.

2.4.3 Bacteriocina

Bacteriocinas são substâncias antimicrobianas de estrutura protéica com um estreito espectro de atividade quando comparada aos antibióticos. As bacteriocinas são sintetizadas ribossomicamente, não sendo letais para as células que as produzem (DE MARTINIS et al., 2002a).

Bacteriocinas são secretadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, patogênicas e não patogênicas (BARBOSA & TORRES, 1999), podendo competir com outros microrganismos que se desenvolvem no mesmo meio. A produção de bacteriocinas é fortemente dependente de pH, fonte de nutrientes e temperatura de incubação (TODOROV et al., 2005).

As bacteriocinas constituem uma fração dos compostos inibidores produzidos pelas bactérias lácticas (NAVARRO et al., 1999). Deste modo essas substâncias podem exercer efeito benéfico ao hospedeiro por inibir o crescimento de bactérias patogênicas em alimentos e no intestino.

KALANTZOPOULOS (1997) verificou que *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus* podem neutralizar a ação de enterotoxinas produzidas por cepas patogênicas de *Escherichia coli* no intestino, através da produção de bacteriocinas específicas, e também pela capacidade dessas bactérias aderirem à parede intestinal.

De acordo com KLAENHAMER (1982) as bactérias lácticas produzem bacteriocinas que podem ser classificadas em: I – Lantibióticos, II – Peptídeos pequenos estáveis ao calor, III – Proteínas grandes termosensíveis e IV – Proteínas complexas que requerem adicionalmente carboidratos ou lipídeos na molécula para expressarem a atividade antimicrobiana.

Os mecanismos de ação das bacteriocinas ainda não estão esclarecidos, segundo DE MARTINIS et al., (2002b). De acordo com estes autores, supõe-se que a ação letal das bacteriocinas se processe em três estágios: (1) ligação de bacteriocina ao receptor da membrana, que garantirá sua entrada na célula; (2) transporte através da membrana, de mecanismo ainda desconhecido; (3) morte celular, pela formação de poros na membrana.

KALCHAYANAND et al., (1992) sugeriu uma hipótese de mecanismo de ação para as moléculas de bacteriocinas. As bacteriocinas seriam adsorvidas na superfície celular e entrariam nas células de bactérias Gram positivas sensíveis e destabilizariam a função da membrana. As ligações das moléculas de bacteriocinas nos receptores da superfície celular de células sensíveis provavelmente prejudicam as funções da parede celular e causam alteração conformacional. Então as moléculas de bacteriocinas conseguiriam entrar nas células através da parede prejudicada. Em células Gram positivas não produtoras, mas resistentes, as bacteriocinas são adsorvidas pela superfície celular, porém a conformação da parede celular não é alterada. Em células produtoras de bacteriocinas, proteínas específicas lhes conferem imunidade para proteger a conformação da parede celular em condições normais.

As células de bactérias Gram negativas e Gram positivas resistentes às bacteriocinas foram submetidas ao aquecimento, congelamento e exposição a ácidos fracos. As células que sobreviveram a estes tratamentos

foram colocadas em contato com bacteriocinas e tornaram-se sensíveis (KALCHAYANAND et al., 1992).

LASH et al., (2005) estudaram o efeito da temperatura e do pH na atividade antimicrobiana do sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 sobre quatro patógenos, incluindo bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Para isso o sobrenadante foi incubado em temperaturas diferentes e o pH ajustado para valores que variaram de 1 a 14, de uma em uma unidade. Então os sobrenadantes foram colocados em contato com as suspensões de células dos microrganismos patogênicos. Verificou-se que em temperaturas acima de 30°C e pH menor que 4 ou acima de 5 a atividade do sobrenadante do *Lactobacillus plantarum* foi completamente inibida. O sobrenadante também foi tratado com enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina ou α -quimotripsina) e a atividade antimicrobiana foi eliminada quando o mesmo foi tratado com quaisquer destas enzimas. Os autores explicam que a inativação pela temperatura e pelo pH pode ser devido ao fato da proteína ter um alto peso molecular (122KDa), sendo assim, degradada mais rapidamente por mudanças de temperatura ou pH.

AVONTS et al., (2004) observaram a degradação de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus gasserii*, que se iniciou simultaneamente à morte celular. Os autores sugerem que a lise celular causando a liberação de proteases intracelulares pode ter degradado a bacteriocina. Neste estudo também observou-se uma maior estabilidade na atividade de bacteriocinas, produzidas por várias espécies de *Lactobacillus*, cultivadas em leite, quando comparadas com as bacteriocinas produzidas em caldo MRS. Esta observação pode estar associada com a adsorção da bacteriocina pelas células produtoras em caldo MRS, enquanto no leite, componentes específicos deste meio podem ter interferido na adsorção resultando em níveis de bacteriocina mais estáveis.

Em estudo realizado por MARTINEZ & DE MARTINIS (2005) a atividade anti-listeria de bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei* 1 foi avaliada em temperaturas de 8°C e 15°C. Foi utilizado o ágar "spot test" como metodologia. Os autores concluíram que a inibição de *Listeria monocytogenes* pela bacteriocina em questão foi dependente da

temperatura, pois na temperatura de 15°C a atividade antimicrobiana foi parcialmente desativada.

TODOROV et al., (2005) estudou a produção de duas bacteriocinas (ST28MS e ST26MS) por *Lactobacillus plantarum* em diferentes meios. Quando *L. plantarum* cresceu em caldo BHI foi detectada baixa produção de bacteriocina, mesmo com o bom crescimento da bactéria, sugerindo que nutrientes específicos são requeridos para a produção de bacteriocina. Também pode ser observado que em caldo MRS detectou-se bacteriocina depois de 5 horas de crescimento, sugerindo que este peptídeo é um metabólito primário. Com relação à fonte de nitrogênio, o máximo nível de bacteriocina foi atingido quando se utilizou triptona como única fonte de nitrogênio, já os carboidratos glicose, sacarose, maltose e manose atingiram os níveis máximos de produção desta substância. Com 5 ou 10 g/L de KH_2PO_4 ou K_2HPO_4 como fonte de potássio os maiores níveis de bacteriocina foram atingidos.

MESSI et al., (2001) testaram 134 bactérias ácido lácticas isoladas de embutidos italianos quanto a produção de substâncias antimicrobianas. *Lactobacillus plantarum* se mostrou produtor de bacteriocina, denominada plantaricin 35d, capaz de antagonizar *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Levando em conta a atividade bactericida, natureza protéica, resistência ao aquecimento e baixo peso molecular plantaricin 35d pode ser classificada como peptídeos pequenos estáveis ativos contra *Listeria*, pertencentes a classe II de acordo com a definição de KLAENHAMMER (1982).

Lactobacillus plantarum BS isolado de risoto de camarão se mostrou um potente produtor de bacteriocina, sendo esta estável a pH que varia de 4,0 a 7,0, com atividade reduzida em pH 2,0 e 9,0. Testes iniciais com respeito ao espectro de atividade antimicrobiana de substâncias presentes no sobrenadante de uma suspensão celular deste probiótico foi realizado utilizando a metodologia do ágar "spot test" e observou-se efeito inibitório sobre o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* (ELEGADO et al., 2004).

NES & JOHNSBORG (2004) relataram que como o observado com os tradicionais antibióticos, a exposição de células bacterianas a algumas

bacteriocinas resultou em desenvolvimento de resistência. A habilidade de desenvolver mecanismos de resistência é provavelmente causado sobre a habilidade das células de mudar a composição lipídica da membrana, porém não se sabe se este resultado é devido a mutação espontânea.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo - USP.

3.1 Microrganismos

Foram avaliadas oito cepas de *Lactobacillus* caracterizadas como probióticas, pertencentes às espécies *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* (30b e 30c), *L. plantarum* (11fb, 22c e 41b), *L. reuteri* (18fa e 19fa), *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (17fb) da coleção de culturas do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ – USP, São Paulo. Uma cepa patogênica de *Listeria monocytogenes* foi obtida da mesma coleção e *Escherichia coli* O157:H7 foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Geraldo di Biase - Volta Redonda-RJ.

3.2 Condições de manutenção dos microrganismos

As bactérias probióticas foram mantidas sob congelamento a -20°C em Leite Desnatado Reconstituído (LDR) 10% contendo 5% de glutamato de sódio. Durante os experimentos os microrganismos foram mantidos refrigerados a 4°C em placas com ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) constituído por 10 g/L de peptona (BACTO™), 8 g/L de extrato de carne (BBL™), 4 g/L de extrato de levedura (OXOID), 20 g/L de glicose (SYNTH), 2 g/L de fosfato dipotássico (RIEDEL-DE HAËN), 5 g/L acetato de sódio·3H₂O (SYNTH), 2 g/L de citrato triamoniaco (SYNTH), 0,2 g/L sulfato de magnésio·7H₂O (RIEDEL-DE HAËN), 0,05 g/L de sulfato de manganês·4H₂O (ECIBRA), 1 mL/L de Tween 80 (SYNTH) e ágar 15 g/L, a pH 6,2.

As cepas de *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* foram conservadas em ágar semi-sólido LB (Luria Bertani) sob refrigeração a 4°C, composto por 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L NaCl e 8 g/L ágar e mantidas em placas contendo ágar BHI (Brain Heart Infusion),

constituído por 20 g/L de infusão de cérebro de vitelo, 25 g/L de infusão de coração bovino, 10 g/L de peptona proteose, 2 g/L de dextrose, 5 g/L de cloreto de sódio e 2,5 g/L de fosfato dissódico.

3.3 Ativação dos microrganismos

Para a ativação dos microrganismos as culturas de lactobacilos foram descongeladas a temperatura ambiente e repicadas três vezes consecutivas em tubo de ensaio contendo 4 mL de caldo MRS, esterilizado a 121°C/20 min, e incubados por 18 horas a 37°C sob agitação de 40 rpm em incubadora SUPEROHM. Alíquotas de 1 mL da suspensão celular foram retiradas e diluídas em série em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e plaqueadas em ágar MRS para a determinação da população bacteriana.

As culturas das bactérias patogênicas mantidas em ágar semi-sólido foram repicadas três vezes consecutivas em caldo BHI esterilizado a 121°C/20 min e incubadas em condições aeróbias a 37°C por 18 horas conforme descrito por GAGNON et al., (2004) e TOURÉ et al., (2003).

3.4 Testes para confirmação das características das culturas

As colônias que apresentaram características típicas das espécies estudadas, tais como tamanho da colônia (2-5 mm), formato convexo, superfície lisa, brilhosa, e sem pigmentos (KLANDER & WEISS, 1986) foram submetidas às provas bioquímicas, como verificação da produção de catalase, coloração de Gram (MADIGAN et al., 2000) e fermentação dos principais açúcares.

Para os lactobacilos foi utilizado caldo base contendo 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de fosfato dipotássico, 2 g/L de citrato de amônio, 5 g/L de acetato de sódio, 0,5 g/L sulfato de magnésio·7H₂O, 0,2 g/L sulfato de magnésio·7H₂O, 1 mL/L de Tween 80, 0,5 g/L de vermelho de fenol (MERCK) e 10 g/L do açúcar teste (arabinose, celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manitol, manose, melezitose, melibiose, rafinose, rhamnose, salicina, sorbitol, sacarose,

trealose e xilose) a partir de soluções a 20% esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 µm (Sartorius, Minisart High-Flow). Um volume de 1,9 mL deste meio foi transferido para tubos de ensaio estéreis que receberam em seguida 0,1 mL do açúcar teste e duas alçadas da suspensão dos microrganismos ativados. Na sequência os tubos foram incubados em estufa a 37°C, durante 7 dias para observação da mudança de coloração em função da redução do vermelho de fenol pelo açúcar teste (KLANDER & WEISS, 1986).

Para caracterização de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 seguiu-se o mesmo procedimento utilizando o caldo fosfato triptose contendo 20 g/L de triptose (DIFCO), 5 g/L de cloreto de sódio (MERCK), 0,5 g/L de vermelho de fenol (MERCK) e 2 g/L de açúcar teste em soluções a 20% esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 µm (Sartorius, Minisart High-Flow). Os açúcares arabinose, galactose, glicose, lactose, manitol, melezitose, melibiose, rhamnose, sacarose, sorbitol e xilose foram utilizados para caracterização de *L. monocytogenes* e para *E. coli* O157:H7 arabinose, celebiose, glicose, lactose, maltose, melibiose, manitol, rafinose, rhamnose, salicina, sorbitol, sacarose, trealose e xilose.

A atividade da catalase foi determinada em lâminas através da transferência de colônias recém ativadas dos lactobacilos e das bactérias patogênicas, que foram gotejadas, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, com solução de H₂O₂ 30% para observação do desprendimento de oxigênio (MAC FADDIN, 1980).

3.5 Obtenção de células de *Lactobacillus*

O concentrado de células das cepas individuais de lactobacilos foi obtido através da ativação das mesmas em caldo MRS a 37 °C/18 horas em shaker a 40 rpm e posterior centrifugação a 10000 x g por 10 min a 4°C (Centrífuga 5804R, EPPENDORF). Os *pellets* obtidos foram lavados três vezes consecutivas em solução PBS (Phosphate Buffer Saline) 0,1 M, pH 7,4, ressuspensos em solução de sacarose 20% e congelados a -80°C em microtubos de 1,5 mL (Eppendorf).

A obtenção do concentrado de célula para a formação do *pool* de *Lactobacillus* foi realizada de duas maneiras, denominadas *pool* A (PA) e *pool* B (PB). Para a obtenção do *pool* A cada cultura foi ativada três vezes consecutivas em caldo MRS nas mesmas condições descritas no item 3.3, e do último repique foram retiradas alíquotas de 4 mL, que foram transferidas para um único frasco estéril. Em seguida, a suspensão de células resultante desta mistura foi inoculada em frasco com tampa rosqueável contendo 288 mL de caldo MRS estéril e incubado a 37°C por 18 horas sob agitação de 40 rpm, obtendo-se o respectivo *pool* A de lactobacilos. Para a obtenção do *pool* B as oito cepas de *Lactobacillus* foram individualmente ativadas em caldo MRS nas mesmas condições e ao final reunidas (32 ml) em um mesmo tubo previamente esterilizado. Posteriormente, as suspensões celulares do PA e PB foram centrifugadas a 10000 xg por 10 min a 4°C, lavadas três vezes consecutivas em solução PBS 0,1M, pH 7,4, ressuspensas em solução de sacarose a 20% e congeladas -80°C em microtubos de 1,5 ml (Eppendorf).

3.6 Obtenção do sobrenadante dos cultivos de *Lactobacillus*

Aos sobrenadantes resultantes da centrifugação das suspensões celulares das cepas de lactobacilos individuais e do PA e PB, conforme descrito no item anterior, foram adicionados inibidores de proteases, nas concentrações de 0,3 mg de ácido etilenodiamino tetra acético - EDTA, 2 µg de aprotinina e 0,7 µg de pepstatina por mL de sobrenadante.

Os inibidores de proteases são utilizados adicionando-os aos sobrenadantes em concentrações pré-determinadas para evitar a degradação das proteínas, com ênfase para as bacteriocinas, produzidas pelos *Lactobacillus* devido à ação de proteases (BOLLAG et al., 1996).

Os *Lactobacillus* podem produzir substâncias protéicas que exercem efeito de inibição, denominadas bacteriocinas, que podem ser degradadas pela ação proteolítica das proteases ou pela adsoção às células produtoras (AVONTS et al., 2004).

O pH dos sobrenadantes foi medido em pHmetro (Ultra Basic Benchtop, DENVER Instrument) sendo que parte deste sobrenadante teve o pH ajustado para 7,0 e parte foi mantido a pH natural, sendo posteriormente filtrados em membranas 0,45 μ m (Sartorius, Minisart High-Flow) e acondicionados em microtubos de 1,5 ml (Eppendorf) a -80°C.

Os sobrenadantes que não tiveram o pH ajustado foram caracterizados quanto à sua composição em ácido láctico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters 786), nas seguintes condições: coluna BIO RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura da coluna 45°C; detector de índice de refração WATERS 410, eluente H₂SO₄ 0,01, fluxo de 0,6 mL/min; volume de amostra injetada, 20 μ L. As amostras, após devidamente diluídas, foram filtradas em filtro Sep Pak C18 (Millipore) e o eluente filtrado a vácuo em membrana HAVP 0,45 μ m de poro, 47 mm de diâmetro (Millipore) e simultaneamente desgaseificado por ultra-som (Thorton) por 25 minutos.

3.7 Determinação do crescimento das bactérias patogênicas

Primeiramente, alçadas das suspensões individuais de células de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, previamente ativadas, conforme descrito no item 3.3, foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4 mL de caldo BHI e em seguida retiradas alíquotas de 500 μ L que foram transferidas para cubetas descartáveis, estéreis (uvette – EPPENDORF) e incubadas a 37°C, onde foi monitorada a leitura da densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro Biomate 3, THERMO SPECTRONIC, em intervalos de uma hora por um período de 7 horas, utilizando-se 500 μ L de caldo BHI como branco.

3.8 Avaliação do efeito dos inibidores de proteases sobre as bactérias patogênicas

Os inibidores de proteases, EDTA, pepstatina, aprotinina e PMSF (fenil metil sulfonil fluoreto) nas concentrações de 0,3 mg, 0,7 μ g, 2 μ g e 174 μ g por mL de suspensão celular, respectivamente, foram adicionados

individualmente e conjuntamente, em tubos de ensaio contendo os cultivos de *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* em caldo BHI, para verificar se estes inibidores de proteases interferem no desenvolvimento das bactérias patogênicas, para evitar que os resultados fossem "mascarados". Em seguida os tubos foram incubados a 37°C por 18 horas e as respectivas suspensões celulares foram plaqueadas em ágar BHI nas mesmas condições.

3.9 Avaliação do efeito de espécies de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*

A detecção da atividade antimicrobiana dos microrganismos probióticos sobre *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* foi avaliada empregando-se o método do ágar "spot test" com uma repetição.

As culturas puras de lactobacilos mantidas em solução de sacarose 20% e o concentrado de culturas correspondentes ao *pool* A e *pool* B, foram descongeladas a temperatura ambiente e inoculadas (2µL) em "spots" em placas de Petri contendo ágar MRS. O mesmo procedimento foi adotado com ágar MRS adicionado de 3 g/L de bicarbonato de sódio para neutralização dos ácidos produzidos pelas bactérias lácticas. As placas com os "spots" foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida foram incubadas a 37°C por 18-24 horas. Após este período foram adicionados às placas 10 mL de meio BHI contendo 1% de ágar à 45°C e 3% (v/v) de uma suspensão de *E. coli* O157:H7 ou de *L. monocytogenes* previamente ativadas, sendo que no último repique a ativação durou 7 horas para *L. monocytogenes* e 5 horas para *E. coli* O157:H7. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C aerobiamente por 18 horas e observadas as zonas de inibição pela formação de halos ao redor das colônias de lactobacilos conforme descrito por GAGNON et al., (2004) e TOURÉ et al., (2003).

Alíquotas de 1 mL das respectivas suspensões celulares foram diluídas em série em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e plaqueadas em ágar BHI para a contagem das células.

3.10 Avaliação do efeito de substâncias antimicrobianas produzidas pelas cepas de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* 0157:H7 e *Listeria monocytogenes*

As culturas individuais e o *pool* de lactobacilos que apresentaram atividade antagônica sobre *E. coli* 0157:H7 e *L. monocytogenes*, conforme descrito no item anterior, foram avaliados quanto à produção de substâncias inibitórias presentes no sobrenadante. Para tanto empregou-se a metodologia semelhante à proposta por LASH et al., (2002), que consistiu em acompanhar a o crescimento celular por turbidimetria da bactéria patogênica quando em contato com os sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus*.

Os sobrenadantes das respectivas suspensões de células das oito cepas de lactobacilos e do *pool* A e B, com e sem ajuste de pH, foram descongelados a temperatura ambiente. Alíquotas de 300 µL destes sobrenadantes foram transferidas para cubetas estéreis juntamente com 300 µL das suspensões dos microrganismos patogênicos e incubadas a 37°C/7 horas.

A suspensão celular de *E. coli* O157:H7 foi obtida após 2 horas e a de *L. monocytogenes* após 3 horas de crescimento em caldo BHI, sendo que alíquotas de 1 mL destas foram retiradas e diluídas em série, em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e plaqueadas em ágar BHI para contagem das células.

Como controle 1 foram transferidos para as cubetas 300 µL de caldo MRS e 300 µL da suspensão de células patogênicas e como controle 2 apenas 600 µL das referidas suspensões em caldo BHI. Utilizou-se como branco uma mistura de 300 µL de caldo MRS e 300 µL de caldo BHI. As cubetas foram incubadas a 37° C e as respectivas densidades ótica foram monitoradas a 600 nm em intervalos de 1 hora durante 7 horas. Em seguida as culturas foram plaqueadas em ágar BHI para se verificar o crescimento destes microrganismos.

Com vistas a se verificar o efeito do pH sobre o desenvolvimento dos microrganismos patogênicos, realizou-se testes com os caldos BHI e MRS

com pH ajustados para 3,60 e 4,20, em substituição aos sobrenadantes seguindo o mesmo procedimento descrito acima.

3.11 Avaliação do efeito cruzado do sobrenadante sobre o desenvolvimento de cepas de *Lactobacillus*

Para verificar se o sobrenadante das cepas de *Lactobacillus* exerce efeito de inibição sobre as células do mesmo gênero, com o objetivo de se definir um procedimento adequado para compor o *pool* foram realizados testes, em microplacas de fundo chato contendo 96 poços, em triplicata. Para tanto foram transferidos para cada poço 75 µL da suspensão celular de cada lactobacilos pré-ativados e 75 µL dos sobrenadantes (item 3.6) conforme demonstrado na TABELA 1. O controle foi constituído de 75µL de caldo MRS estéril + 75 µL da suspensão das respectivas cepas de lactobacilos. Avaliou-se ainda o crescimento dos lactobacilos em caldo MRS a pH 3,60, empregando-o em substituição ao sobrenadante. Utilizou-se como branco 150 µL de caldo MRS. As microplacas foram incubadas 37°C sob agitação de 40 rpm.

O crescimento microbiano foi verificado através da leitura da densidade ótica a 600 nm em leitor de ELISA (ELx800, Universal Microplate Reader, BIO-TECK Instruments) em intervalos de 1 hora, durante 8 horas.

TABELA 1: Esquema representativo das microplacas utilizadas para a verificação do efeito antagônico entre as cepas de *Lactobacillus*. Onde: C corresponde à suspensão celular e S ao sobrenadante.

C11fb + S11fb	C11fb + S17fb	C11fb + S18fa	C11fb + S19fa	C11fb + S22c	C11fb + S30b	C11fb + S30c	C11fb + S41b	Branco	C11fb	C11fb + MRS	C11fb + MRS pH 3,6
C17fb + S11fb	C17fb + S17fb	C17fb + S18fa	C17fb + S19fa	C17fb + S22c	C17fb + S30b	C17fb + S30c	C17fb + S41b		C17fb	C17fb + MRS	C17fb + MRS pH 3,6
C18fa + S11fb	C18fa + S17fb	C18fa + S18fa	C18fa + S19fa	C18fa + S22c	C18fa + S30b	C18fa + S30c	C18fa + S41b		C18fa	C18fa + MRS	C18fa + MRS pH 3,6
C19fa + S11fb	C19fa + S17fb	C19fa + S18fa	C19fa + S19fa	C19fa + S22c	C19fa + S30b	C19fa + S30c	C19fa + S41b		C19fa	C19fa + MRS	C19fa + MRS pH 3,6
C22c + S11fb	C22c + S17fb	C22c + S18fa	C22c + S19fa	C22c + S22c	C22c + S30b	C22c + S30c	C22c + S41b		C22c	C22c + MRS	C22c + MRS pH 3,6
C30b + S11fb	C30b + S17fb	C30b + S18fa	C30b + S19fa	C30b + S22c	C30b + S30b	C30b + S30c	C30b + S41b		C30b	C30b + MRS	C30b + MRS pH 3,6
C30c + S11fb	C30c + S17fb	C30c + S18fa	C30c + S19fa	C30c + S22c	C30c + S30b	C30c + S30c	C30c + S41b		C30c	C30c + MRS	C30c + MRS pH 3,6
C41b + S11fb	C41b + S17fb	C41b + S18fa	C41b + S19fa	C41b + S22c	C41b + S30b	C41b + S30c	C41b + S41b		C41b	C41b + MRS	C41b + MRS pH 3,6

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da população e caracterização dos microrganismos avaliados

As espécies de *Lactobacillus* que apresentam propriedades probióticas, avaliadas no presente trabalho, foram devidamente ativadas em caldo MRS, cujas populações e pH dos cultivos encontram-se apresentados na TABELA 2. Observa-se uma variação na ordem de 10^7 e 10^9 UFC/mL entre as cepas de *Lactobacillus* estudadas.

TABELA 2: *Lactobacillus* cultivados em caldo MRS por 18 horas

Cepas de Lactobacillus	População	pH
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 11fb	$6,2 \cdot 10^8$	4,10
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 22c	$8,9 \cdot 10^8$	3,83
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 41b	$3,9 \cdot 10^8$	3,88
<i>Lactobacillus delbruecki</i> supb <i>delbruecki</i> - 17fb	$1 \cdot 10^9$	3,86
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 18fa	$2,2 \cdot 10^8$	4,29
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 19fa	$1 \cdot 10^7$	3,96
<i>Lactobacillus casei</i> supb <i>pseudopantarum</i> - 30b	$3,3 \cdot 10^9$	3,95
<i>Lactobacillus casei</i> supb <i>pseudopantarum</i> - 30c	$7,9 \cdot 10^9$	3,98
Pool A	$8,3 \cdot 10^8$	3,93
Pool B	$9 \cdot 10^8$	3,90

Estes resultados são semelhantes àqueles obtidos por AVONTS et al., (2004) que avaliaram o crescimento celular de 7 cepas de *Lactobacillus* empregadas em produtos comerciais, em fermentador de 15 L em caldo MRS e verificaram uma população máxima de $6,3 \cdot 10^9$ UFC/mL para *L. casei* YIT 9029 e mínima para *L. acidophilus* ACC e *L. acidophilus* IBB 801 de $7,9 \cdot 10^7$ UFC/mL.

OSTLIE et al., (2005) estudaram o efeito da temperatura no crescimento de bactérias probióticas em leite UHT (Ultra High Temperature) e verificaram que na temperatura de 37°C todas as cepas de *Lactobacillus* avaliadas (*L. acidophilus* La5 e 1748, *L. johnsonii* LA1, *L. rhamnosus* GG e *L. reuteri* SD2112) atingiram populações de células viáveis que variaram de $4,5 \cdot 10^8$ a $1,6 \cdot 10^9$ UFC/mL, em período de incubação de 12 a 24 horas.

Neste mesmo estudo verificou-se que o pH inicial do meio caiu de 6,7 para valores de 3,9 a 4,4 dependendo da cepa envolvida.

GARRO et al., (2004) estudando o efeito da temperatura no crescimento de *Bifidobacterium longum* CRL 849 e *Lactobacillus fermentum* CRL 251 em "leite de soja", verificaram que o máximo crescimento foi obtido a 37°C e que *Lactobacillus fermentum* alcançou uma população máxima de $1,95 \times 10^9$ e *Bifidobacterium longum* $1,52 \times 10^9$, sendo o pH final de 4,5 para ambos cultivos.

Após a ativação, as cepas de *Lactobacillus* foram devidamente caracterizadas, cujos resultados confirmaram que estes microrganismos apresentam as características específicas de *Lactobacillus*, ou seja, são Gram-positivos, catalase negativos, com morfologia e perfil de fermentação de *Lactobacillus plantarum*, *L. reuteri*, *L. delbruecki* subsp. *delbruecki* e *L. casei* subsp. *pseudopantarum*, de acordo com KLANDLER & WEISS (1986).

As bactérias patogênicas *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 foram ativadas em caldo BHI e verificou-se que estes microrganismos apresentaram características típicas de suas espécies, como Gram-positiva para *Listeria* e Gram-negativa para *Escherichia*, catalase positivas, com morfologia e perfil de fermentação característicos, de acordo com os critérios descritos por SEELIGER & JONES (1986) e BRENNER (1986).

As curvas de crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 em caldo BHI, representadas na FIGURA 1, demonstram que *L. monocytogenes* inicia a fase exponencial de crescimento após três horas de cultivo atingindo uma população de $1,7 \times 10^9$ UFC/mL e *E. coli* O157:H7 após 2 horas com 3×10^6 UFC/mL. Estas informações foram importantes para definir os procedimentos de avaliação da inibição do crescimento destes microrganismos.

Verifica-se que *Listeria monocytogenes* apresenta crescimento mais lento quando comparada a *Escherichia coli* O157:H7 (FIGURA 1).

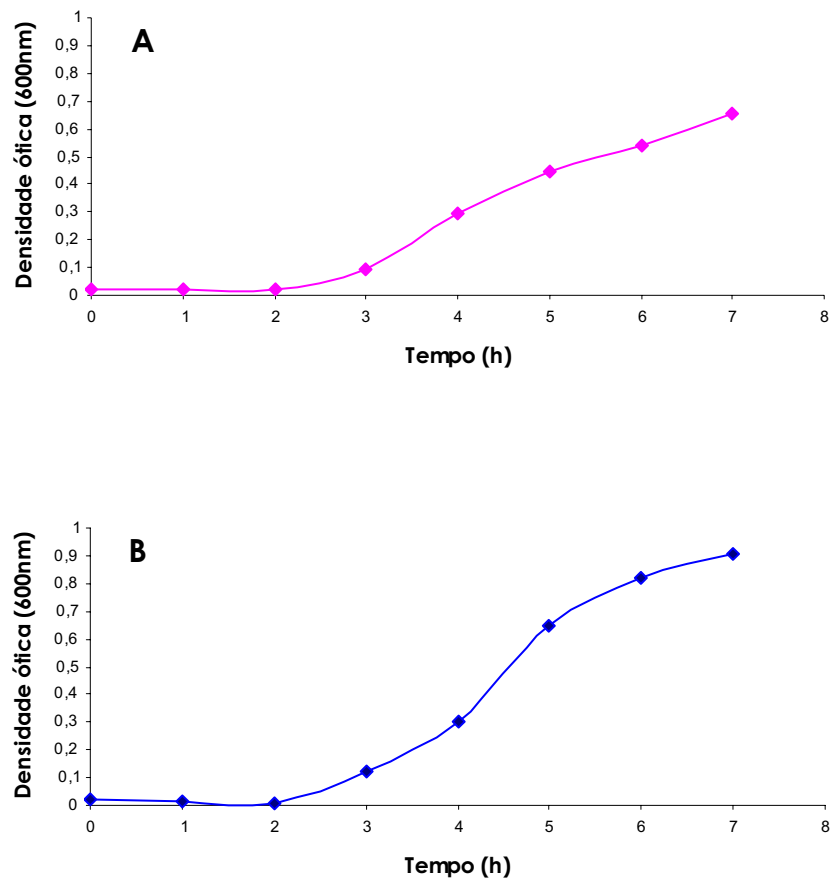


FIGURA 1: Curva de crescimento de **A-** *Listeria monocytogenes* e **B-** *Escherichia coli* O157:H7

TAMPLIN et al., (2005) estudando o crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 em carne moída em diferentes temperaturas verificaram que na temperatura de 40°C a fase log se inicia aproximadamente após 2 horas de cultivo. ROBINSON et al., (2005) verificaram que numa concentração salina de 0,9 M e 1,2 M em meio TSB (Tryptone Soya Broth) a fase lag de *Listeria monocytogenes* varia de 2,87 a 3,91 horas na temperatura de 37°C.

A influência da viscosidade do meio TSB sobre o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* foi estudada por STECCHINI et al., (2004) e observou-se que a fase lag desta bactéria aumentou conforme o aumento da viscosidade do meio, variando de 1,62 a 8,0 horas à temperatura de 30°C.

4.2 Avaliação do efeito de inibidores de proteases sobre as bactérias patogênicas

Avaliou-se o efeito de EDTA, aprotinina, pepstatina e PMSF (LOPES et al., 1999) sobre o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, cujos resultados encontram-se demonstrados na TABELA 3. Verifica-se que EDTA, pepstatina e aprotinina não apresentaram efeito de inibição sobre o desenvolvimento destes microrganismos, o que não foi observado na presença de PMSF (fenil metil sulfonil fluoreto). Desta forma, o efeito de inibição observado na presença dos inibidores em conjunto se deve provavelmente a presença de PMSF.

TABELA 3: Crescimento das bactérias patogênicas na presença de inibidores de proteases.

Inibidores de Proteases	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
EDTA	-	-
Pepstatina	-	-
Aprotinina	-	-
PMSF	+	+
EDTA + Pepstatina + Aprotinina + PMSF	+	+

(-) sem efeito de inibição (+) com efeito de inibição

Devido ao efeito de inibição causado pelo PMSF sobre as bactérias patogênicas, este não foi adicionado aos sobrenadantes do *Lactobacillus*.

Em pesquisa realizada por STEFANOVA et al. (2002) estudou-se a enzima bacteriana PBP 5 ("penicillin-binding protein" 5) presente em *Escherichia coli* quanto à sua estabilidade em diferentes pH, cinética de reação, inibição por reagentes ativos diretamente nos sítios. Esta enzima é uma das responsáveis pela biossíntese da parede celular e o efeito da inibição de sua atividade foi testado na presença de vários inibidores de proteínas, dentre estes PMSF. Verificou-se um leve efeito inibidor da enzima em questão. O mesmo pode ter ocorrido no presente trabalho, porém em maiores proporções, afetando o crescimento de *Escherichia coli* O157:H7.

4.3 Avaliação do efeito de inibição de espécies de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*

O efeito de inibição das espécies de *Lactobacillus* sobre *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 foi avaliado empregando-se a técnica conhecida como ágar "spot test", cujas FIGURAS 2, 3, 4 e 5 mostram os halos de inibição sobre os microrganismos patogênicos formados ao redor das colônias dos *Lactobacillus* e os resultados encontram-se representados na FIGURA 6. A população de células das cepas avaliadas, expressa em UFC presente em 2 μ L foi de $1,2 \times 10^7$ para *Lactobacillus plantarum* (11fb), 2×10^7 para *L. delbruecki* supb. *delbruecki* (17fb), $4,4 \times 10^6$ para *L. reuteri* (18fa), 2×10^5 para *L. reuteri* (19fa), $1,8 \times 10^7$ para *L. plantarum* (22c), $6,6 \times 10^7$ para *L. casei* supb. *pseudopantarum* (30b), $1,6 \times 10^8$ para *L. casei* supb. *pseudopantarum* (30c), $7,8 \times 10^6$ para *L. plantarum* (41b) e $1,7 \times 10^7$ para o pool A. Para *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 o inóculo foi de aproximadamente 10^8 UFC adicionadas em 10 mL de BHI semi-sólido.

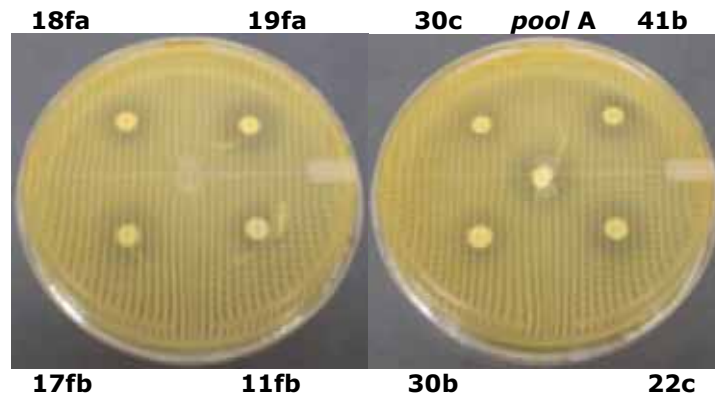


FIGURA 2: Efeito de inibição de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7

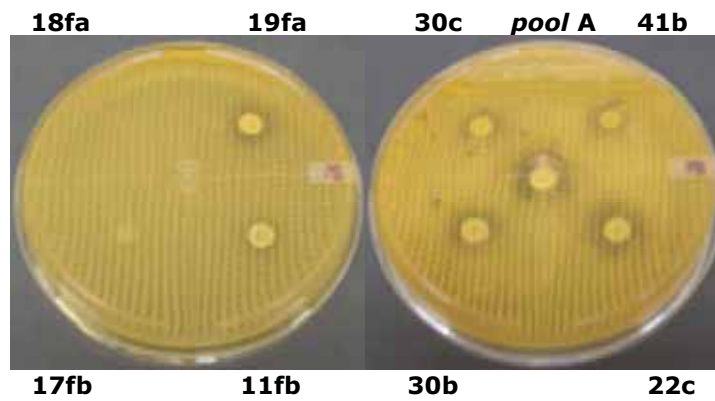


FIGURA 3: Efeito de inibição de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7, na presença de bicarbonato de sódio

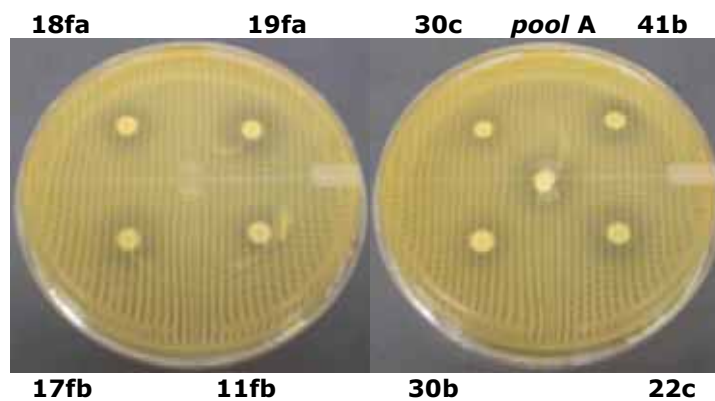


FIGURA 4: Efeito de inibição de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes*

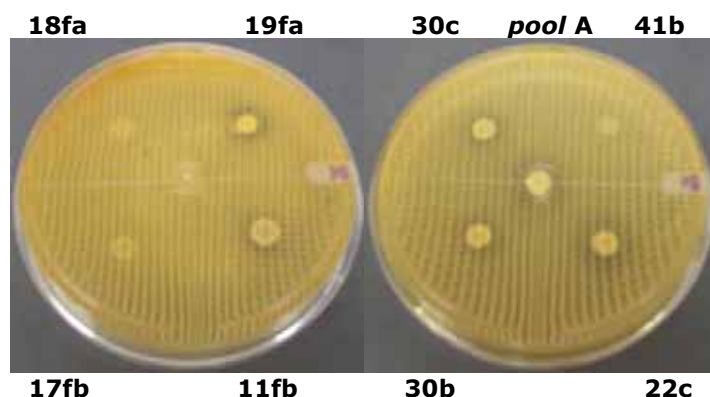


FIGURA 5: Efeito de inibição de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes*, na presença de bicarbonato de sódio

Verifica-se que os maiores efeitos de inibição foram observados com as cepas *L. plantarum* 22c e *L. casei* supb. *pseudopplantarum* 30b sobre *E. coli* O157:H7 (A), na ausência de bicarbonato de sódio. Por outro lado, nas placas cujo ágar continha bicarbonato de sódio observou-se a formação de menores halos de inibição, com exceção para a cepa *L. reuteri* 19fa que apresentou o mesmo efeito de inibição independente da presença de bicarbonato de sódio. A cepa *L. plantarum* 41b apresentou maior efeito de inibição na presença de bicarbonato de sódio. As cepas *L. delbruecki* supb *delbruecki* 17fb e *L. reuteri* 18fa não cresceram na presença de bicarbonato de sódio. Isto pode ter ocorrido devido ao pH do meio em 6,9, desfavorável para o crescimento destas cepas de *Lactobacillus*.

No que diz respeito a *L. monocytogenes* (B) observa-se que os resultados foram mais homogêneos, porém com efeito de inibição menor do que o observado para *E. coli* O157:H7. Nota-se que a cepa *L. reuteri* 19fa foi a que exerceu maior efeito de inibição na ausência de bicarbonato de sódio. O efeito antagônico observado na ausência de bicarbonato de sódio se deve provavelmente à presença de ácidos orgânicos, principalmente ao ácido láctico, produzidos pelas cepas de *Lactobacillus*.

O bicarbonato de sódio tem a função de neutralizar os ácidos produzidos no metabolismo das bactérias lácticas, portanto, a inibição

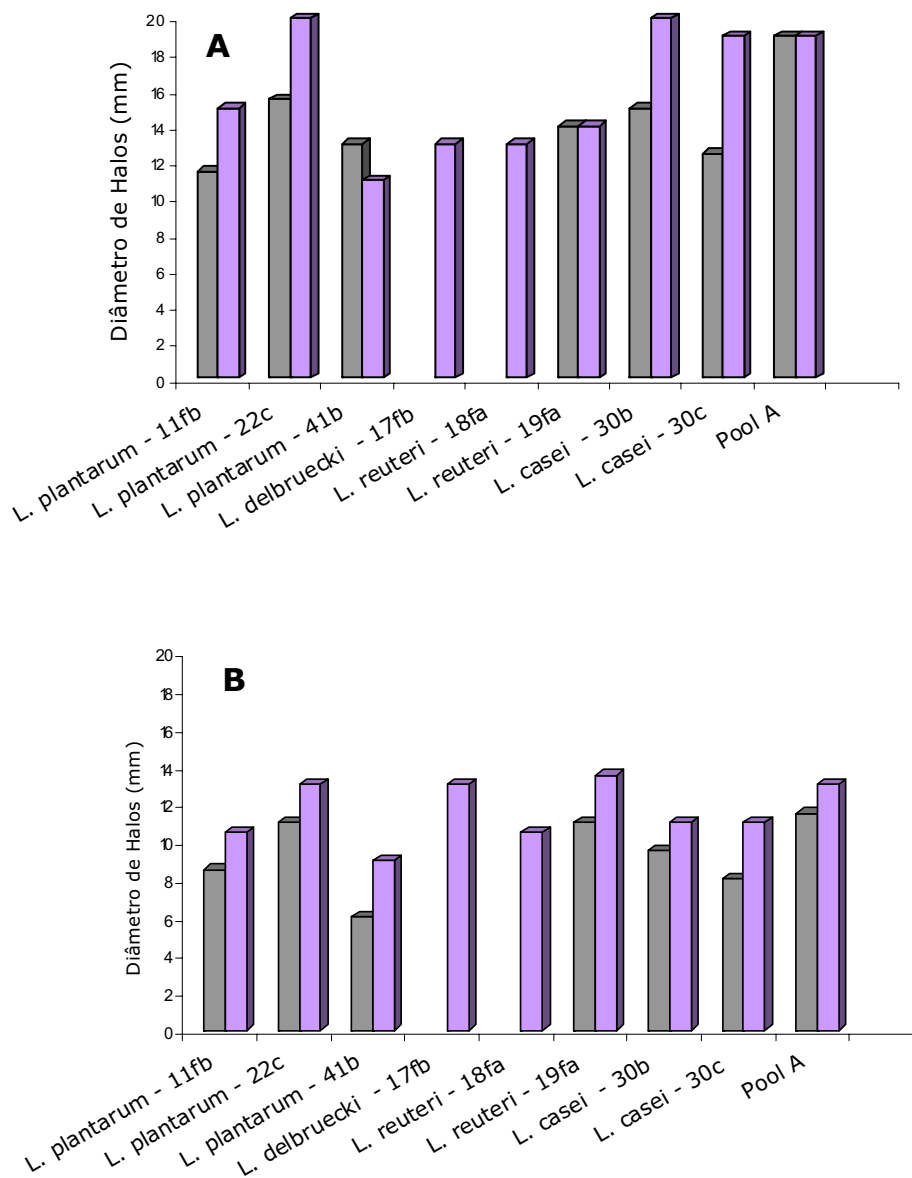


FIGURA 6: Efeito de inibição de cepas de *Lactobacillus* sobre **A** - *Escherichia coli* O157:H7 e **B** - *Listeria monocytogenes* na presença (■) e ausência (■) de bicarbonato de sódio no meio MRS.

causada pelas cepas de *Lactobacillus* sobre as bactérias patogênicas na presença de bicarbonato de sódio, pode ter ocorrido devido à presença de outras substâncias que não os ácidos, como por exemplo peróxido de hidrogênio ou substâncias protéicas, conhecidas como bacteriocinas.

Em estudo realizado por GAGNON et al., (2004), empregando-se a mesma metodologia, verificou-se que dez cepas de bactérias lácticas do gênero *Bifidobacterium* foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* O157:H7. O diâmetro dos halos observados variaram de 13 a 30 mm, sendo que na presença de bicarbonato de sódio estes autores observaram uma significativa redução no diâmetro dos halos, entretanto estes não desapareceram, sugerindo que a produção de ácidos (acético e láctico) não foi o único fator que colaborou para a atividade antagônica observada.

Em pesquisa realizada no Brasil por DE MARTINIS et al., (2003) vinte amostras de produtos cárneos foram avaliadas para verificar a presença de bactérias lácticas produtoras de substâncias antimicrobianas. Observou-se que *Leuconostoc* sp. e *Lactobacillus sakei* foram capazes de inibir o crescimento de nove cepas de *Listeria monocytogenes* utilizando a metodologia do ágar "spot test". Como na metodologia utilizada o efeito de ácidos e peróxido de hidrogênio foi eliminado por neutralização e adição de catalase, respectivamente, os pesquisadores sugeriram que bacteriocinas causaram o efeito antimicrobiano.

ELEGADO et al., (2004) estudaram a capacidade de *Lactobacillus plantarum* BS em inibir bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* pela metodologia do ágar "spot test". Os resultados demonstraram que dentre as cepas avaliadas *L. monocytogenes* foi a única inibida por *L. plantarum*. Avaliou-se também o efeito do extrato de bacteriocina semi-purificado, onde as bacteriocinas foram parcialmente purificadas por precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e cromatografia de filtração em gel. Os resultados com o extrato de bacteriocina semi-purificada diferiram daqueles obtidos com as células. Quando as células foram colocadas em contato direto com os microrganismos patogênicos não se observou o efeito de inibição, o que foi observado quando em contato com o extrato de bacteriocina purificado, indicando que as células dos microrganismos alvos

não foram afetadas devido provavelmente a quantidade insuficiente de bacteriocina presente na suspensão de *L. plantarum*.

Cepas de *Lactobacillus acidophilus* UO001 e *Lactobacillus gasseri* UO002 foram testadas contra *Listeria*, *Campylobacter* e *Clostridium* utilizando a técnica do ágar "spot test", cujos resultados demonstraram uma forte inibição de ambas as bactérias lácticas sobre estes patógenos. Para caracterizar os compostos inibidores produzidos pelas cepas de *Lactobacillus* o sobrenadante das culturas foi avaliado quanto à presença de bacteriocinas e ácidos orgânicos por difusão em ágar (well diffusion). Os resultados mostraram que os ácidos orgânicos, provavelmente o ácido láctico, produzidos no metabolismo homofermentativo das espécies de *Lactobacillus* em questão, foram os responsáveis pelo efeito antagônico observado, e que não houve inibição quando o sobrenadante foi tratado com a enzima lactato desidrogenase que atua no ácido láctico (FERNÁNDEZ et al., 2003).

HEIKKILA & SARIS (2003) isolaram bactérias do leite de mulheres saudáveis no período de amamentação, destacando-se bactérias ácido lácticas das espécies *Lactobacillus rhamnosus*, *L. crispatus*, *Lactococcus lactis* e *Leucostoc mesenteroides* e demonstraram que essas espécies exercem um forte efeito de inibição sobre *Staphylococcus aureus* empregando-se a metodologia do ágar "spot test".

4.4 Avaliação do efeito de substâncias antimicrobianas presentes nos sobrenadantes de culturas de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*

Sabe-se que as bactérias ácido lácticas, dentre elas, os *Lactobacillus*, são produtoras de substâncias capazes de antagonizar microrganismos patogênicos, como os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e substâncias antimicrobianas de natureza protéica, conhecidas como bacteriocinas. Com o intuito de verificar a produção de substâncias antimicrobianas pelas cepas de *Lactobacillus* e averiguar se estas inibiam *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 foi colocado em contato o sobrenadante das cepas de *Lactobacillus* com as suspensões celulares das bactérias patogênicas em questão. O crescimento destas bactérias

patogênicas foi acompanhado por turbidimetria em intervalos de 1 hora por 7 horas, cujos resultados encontram-se apresentados nas FIGURA 7 e FIGURA 8.

Observa-se que o crescimento de *L. monocytogenes* na presença dos sobrenadantes, a pH 7,0 das oito cepas de lactobacilos foi semelhante ao controle (FIGURA 7A). Nota-se que o *pool* B (composto pelo sobrenadante das suspensões de células das oito cepas de *Lactobacillus* ativados individualmente) parece ter estimulado o crescimento da bactéria patogênica, observando-se maior crescimento na presença deste sobrenadante quando comparado ao controle.

Os *Lactobacillus* são produtores de aminoácidos, sendo que algumas cepas produzem estes metabólitos em grandes variedades e quantidades (LEE, 2005). Desta forma, existe a possibilidade do *pool* B ter estimulado o crescimento de *L. monocytogenes* devido à diversidade de aminoácidos presentes no meio, uma vez que foi formado a partir da junção dos sobrenadantes das oito cepas de *Lactobacillus*.

Verifica-se também que os sobrenadantes que tiveram seus valores de pH ajustados para 7,0 não exerceram efeito inibitório sobre *L. monocytogenes* diferente dos resultados obtidos quando se plaqueou a bactéria patogênica em questão na presença de bicarbonato de sódio, conforme demonstrado na FIGURA 6, onde o bicarbonato de sódio tem a função de neutralizar os ácidos produzidos pelos *Lactobacillus*. Esta observação sugere que os ácidos produzidos não foram totalmente neutralizados pelo bicarbonato de sódio.

Segundo LASH et al., (2005) o método de análise usado, que envolve o acompanhamento do crescimento celular, é mais sensível quando comparado com as técnicas do ágar "spot test" e difusão em poços, onde o diâmetro do halo é o indicador de inibição, pois analisa a atividade antibacteriana diretamente entre os sobrenadantes de lactobacilos e a cultura teste em meio líquido.

Nota-se que os sobrenadantes dos cultivos das cepas de *Lactobacillus* cujos pH não foram ajustados exerceram efeito de inibição sobre o desenvolvimento de *L. monocytogenes* conforme demonstrado na FIGURA 7B. Este efeito pode ser considerado bacteriostático, pois quando este

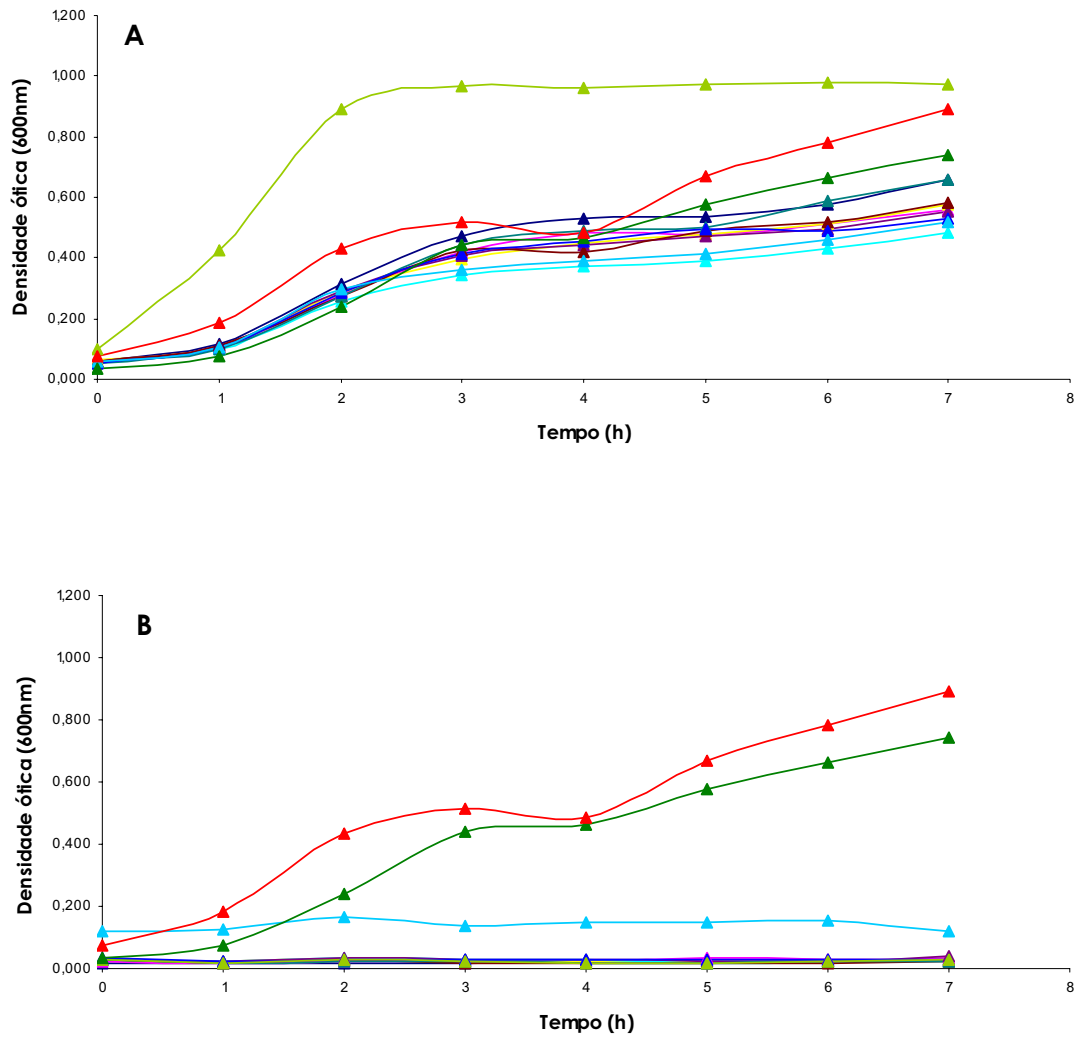


FIGURA 7: Curva de crescimento de *L. monocytogenes* na presença dos sobrenadantes de *Lactobacillus* **A-** a pH 7,0 e **B-** sem ajuste de pH. Sobrenadantes de *Lactobacillus*: ▲- 11fb, ▲- 17fb, ▲- 18fa, ▲- 19fa, ▲- 22c, ▲- 30b, ▲- 30c, ▲- 41b, ▲- pool A, ▲- pool B, ▲-controle 1 e ▲- controle 2.

microrganismo está em contato com o sobrenadante não se multiplica. Após sete horas de contato das células de *Listeria monocytogenes* e os respectivos sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus*, estas foram plaqueadas em ágar BHI e observou-se o crescimento da bactéria patogênica em todos os casos conforme apresentado na TABELA 4.

PLEASANTS et al., (2001) estudaram o comportamento de uma cepa produtora de bacteriocina, *Lactobacillus sake* 706, na presença de *L. monocytogenes*. As duas cepas foram cultivadas isoladamente e em co-cultura em meio MRS e tiveram seu desenvolvimento, pH e produção de bacteriocina acompanhados. Os resultados revelaram que a presença de bacteriocina causa grande impacto no desenvolvimento de *L. monocytogenes*, reduzindo rapidamente o número deste microrganismo na população mista.

TABELA 4: Efeito de substâncias presentes nos sobrenadantes, a pH natural, sobre *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7

Cepas de <i>Lactobacillus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 11fb	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 22c	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 41b	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Lactobacillus delbruecki</i> supb. <i>delbruecki</i> - 17fb	Bactericida	Bacteriostático
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 18fa	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 19fa	Bactericida	Bacteriostático
<i>Lactobacillus casei</i> supb. <i>pseudopantarum</i> - 30b	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Lactobacillus casei</i> supb. <i>pseudopantarum</i> - 30c	Bacteriostático	Bacteriostático
Pool A	Bacteriostático	Bacteriostático
Pool B	Bactericida	Bacteriostático

No que diz respeito ao desenvolvimento de *E. coli* O157:H7 na presença dos sobrenadantes de *Lactobacillus* com pH ajustado (FIGURA 8A), verifica-se que o crescimento da bactéria patogênica não se altera, quando comparado ao controle 1 (*E. coli* O157:H7 + MRS).

As células de *Escherichia coli* O157:H7 na presença dos respectivos sobrenadantes sem ajuste de pH de *Lactobacillus*, FIGURA 8B, não se

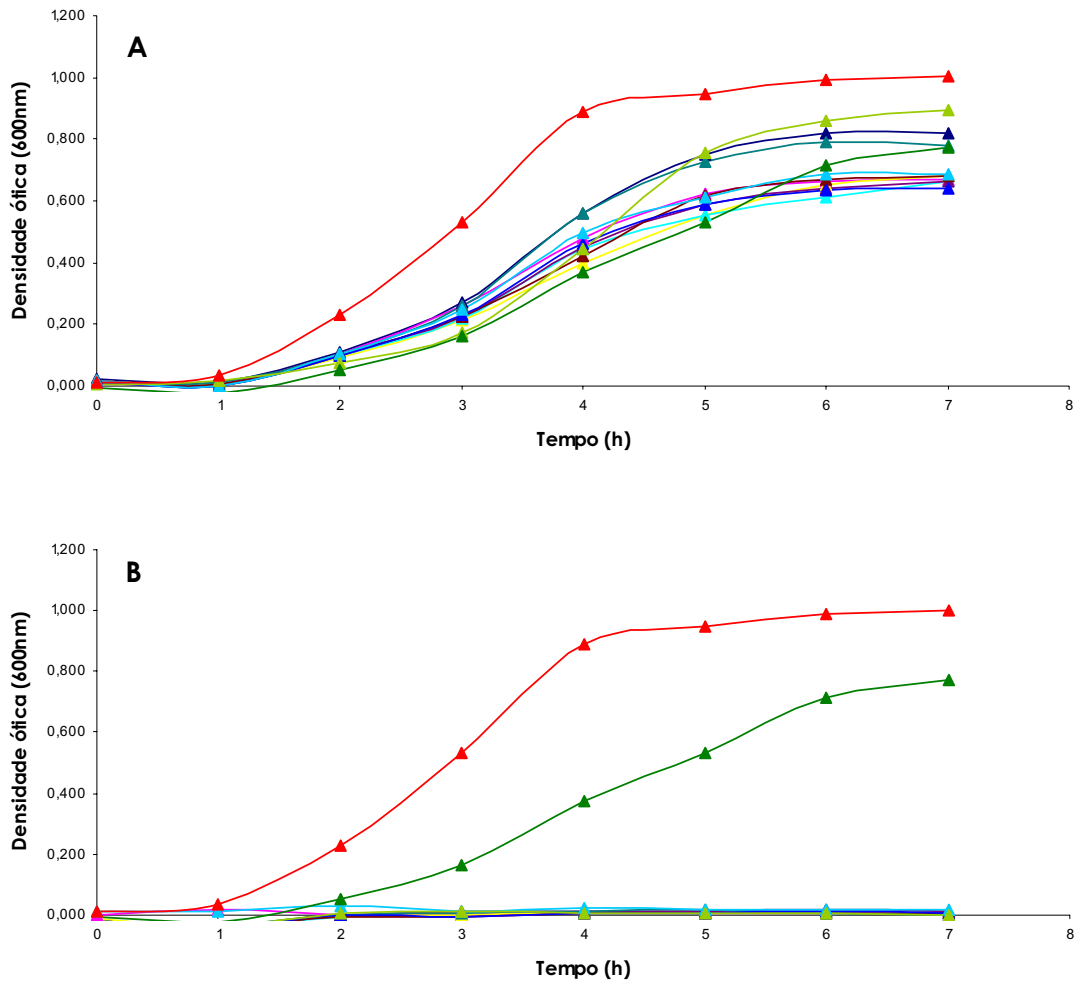


FIGURA 8: Curva de crescimento de *E. coli* O157:H7 na presença dos sobrenadantes de *Lactobacillus* **A-** a pH 7,0 e **B-** sem ajuste de pH. Sobrenadantes de *Lactobacillus*: ▲- 11fb, ▲- 17fb, ▲- 18fa, ▲- 19fa, ▲- 22c, ▲- 30b, ▲- 30c, ▲- 41b, ▲- pool A, ▲- pool B, ▲- controle 1 e ▲- controle 2.

não se desenvolvem. Verifica-se (TABELA 4) que substâncias presentes nos sobrenadantes exerceram efeito bacteriostático sobre esse patógeno. Nota-se ainda, efeito bactericida exercido por duas cepas (*Lactobacillus delbrueckii* supb. *delbrueckii* - 17fb e *Lactobacillus reuteri* - 19fa) e pelo *pool* B de lactobacilos, visto que não se observou a formação de colônias em meio específico.

Nota-se que os sobrenadantes das cepas de *L. delbrueckii* supb. *delbrueckii* - 17fb, *L. reuteri* - 19fa e do *pool* B só exerceram efeito bactericida sobre a bactéria gram-negativa. Sugere-se que as substâncias antimicrobianas produzidas por estes microrganismos podem afetar bactérias gram-positivas e não gram-negativas devido às diferenças observadas na estrutura da parede celular destes microrganismos.

TIMMERMAN et al., (2004) estudaram um *pool* formado por doze cepas de lactobacilos incubadas em co-cultura. Os autores observaram que havia competição entre as cepas de *Lactobacillus* e que o *pool* resultante da fermentação destas cepas foi um produto final diferente do obtido com as cepas individuais. Os autores sugeriram também que a fermentação deve-se proceder separadamente, seguida da mistura das culturas, para assim aumentar a funcionabilidade das multicepas de probióticos.

Produtos constituídos de várias cepas de microrganismos probióticos podem atingir um amplo espectro de atividade antimicrobiana. Estes podem conter bactérias lácticas que apresentam efeito bactericida contra diversos patógenos, uma vez que na literatura é raro encontrar uma cepa de microrganismo que possui alta atividade antimicrobiana sobre diferentes patógenos.

Lactobacillus reuteri é capaz de produzir uma substância denominada reuterina. Esta substância apresenta um baixo peso molecular, pH neutro, não é protéica, é solúvel em água e possui atividade antibacteriana, antimicótica e antiprotozoária (SUNG et al., 2003). Esta pode ser a substância responsável pelo efeito bactericida sobre *E. coli* O157:H7 causado pelo sobrenadante da bactéria ácido láctica *Lactobacillus reuteri* 19fa utilizada no presente trabalho.

Bactérias lácticas isoladas de queijo produzido na Espanha foram avaliadas quanto à atividade antagônica sobre *L. monocytogenes* e outras

bactérias patogênicas. A metodologia utilizada foi a de difusão em ágar (*well diffusion*) e nenhuma das bactérias lácticas que incluíam cepas de *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. casei* subsp. *casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus* subsp. *cremosis*, *Leuconostoc mesenteroide* subsp. *dextranicum* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* foi capaz de antagonizar *Listeria monocytogenes* e outros patógenos testados (HERREROS et al., 2005).

Foi observado por LASH et al., (2005) que *Lactobacillus plantarum* exerce efeito inibitório sobre um amplo espectro de microrganismos, incluindo bactérias Gram positivas e Gram negativas, dentre elas *Listeria innocua* e *Escherichia coli*. Estes autores avaliaram o efeito de inibição do sobrenadante, quanto a sua estabilidade frente a diferentes temperaturas, pH e enzimas proteolíticas, sobre espécies de bactérias patogênicas. Os resultados revelaram que o sobrenadante da suspensão de *L. plantarum* perdeu a atividade antimicrobiana em temperaturas superiores a 30°C e o mesmo ocorreu quando o pH foi ajustado para valores maiores que 5,0 e menores que 4,0, sugerindo que o composto causador da inibição foi ativo somente nessa faixa de pH.

O mesmo efeito pode ter ocorrido no presente trabalho quando duas cepas de *Lactobacillus* (17fb e 19fa) e *pool B* mostraram efeito bactericida sobre *E. coli* O157:H7. Notou-se que na presença do sobrenadante que teve o pH ajustado a 7,0, a bactéria patogênica se desenvolveu e, na presença do sobrenadante sem ajuste de pH verificou-se o efeito bactericida. O composto que pode ter exercido o efeito provavelmente é ativo em determinada faixa de pH, no caso ácido.

O efeito antimicrobiano causado por bactérias lácticas sobre microrganismos patogênicos é bastante relatado na literatura. Em estudo realizado por OGAWA et al., (2001) foi verificado que *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus acidophilus* YIT 0070 exercem efeito inibitório sobre o crescimento de *Escherichia coli* O157:H7. A atividade antimicrobiana foi avaliada em co-cultura e verificou-se que os valores de pH no meio de cultura de *E. coli* em co-cultura com *L. casei* e *L. acidophilus* foram menores quando comparados com a cultura da bactéria patogênica. Os autores sugeriram que o efeito bactericida causado por *Lactobacillus* sobre *E. coli*

depende da produção de ácido láctico, tendo como consequência a redução do pH. Neste experimento foi testado também o efeito de inibição de *Lactobacillus brevis* sobre *E. coli* O157:H7 que não mostrou o mesmo comportamento, o que demonstra, como no presente trabalho, que o efeito de inibição é dependente da espécie de *Lactobacillus*.

ARICIA et al., (2004) isolaram 21 cepas de *Lactobacillus* de fezes de crianças recém-nascidas, que foram avaliadas quanto à produção de ácidos, resistência a antibióticos, produção de H₂S e atividade antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC28213, *S. aureus* ATCC2392, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus*. Para a avaliação da atividade antimicrobiana, parte do sobrenadante do cultivo de *Lactobacillus* foi mantido em pH natural e parte foi neutralizado com NaOH 1N a pH 6,5 para se verificar a presença de metabólitos como bacteriocinas, utilizando-se a técnica de difusão em ágar. Os autores observaram que em sobrenadante com pH ajustado a 6,5 e presença de catalase, uma redução no efeito de inibição sobre os microrganismos patogênicos e concluíram que a atividade antibacteriana das cepas estudadas é afetada pela produção de H₂O₂ e ácidos.

BREDHOLT et al., (1999) isolaram cepas de *Lactobacillus sakei* de amostras de carnes que foram testadas na prevenção de contaminação por *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 em presunto. Os resultados mostraram que as bactérias lácticas foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos patogênicos. Dentre as cinco cepas testadas, apenas uma produziu bacteriocina e o efeito de inibição causado por essa cepa não diferiu das demais, portanto, o efeito observado, segundo os autores, parece não ter sido provocado por bacteriocinas. Desta forma, concluíram que novos estudos devem ser realizados a fim de se identificar a causa do efeito inibitório observado. Na etapa de seleção das cepas destas bactérias lácticas avaliou-se a velocidade de crescimento na temperatura de armazenamento do produto, sendo selecionadas as que apresentaram maior velocidade. Portanto os autores sugeriram que a disputa por nutrientes pode ter favorecido o desenvolvimento das bactérias ácido lácticas no presunto. Outro fator que foi considerado é o aumento na

concentração de ácido láctico, que pode ser responsável pelo efeito de inibição sobre os microrganismos patogênicos.

TYOPPONEN et al., (2003) estudaram o efeito de bioproteção provocado por culturas de *Lactobacillus rhamnosus* E-97800, *L. rhamnosus* LC-750, *L. plantarum* ALC01 e *Pediococcus pentosaceus* RM2000 sobre *Listeria monocytogenes* em embutidos. Para tanto as culturas lácticas e a bactéria patogênica foram inoculadas na fase de preparo do produto, cujos resultados demonstraram que as cepas bioprotetoras preveniram o crescimento de *L. monocytogenes* e resultou em produtos livres de *Listeria* na fase final de maturação. Os autores concluíram que esta observação se deve provavelmente a produção de substâncias antimicrobianas, porém novos estudos devem ser conduzidos a fim de se avaliar este efeito.

GOPAL et al., (2001) estudaram o efeito antimicrobiano de três cepas probióticas consistindo de *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* sobre *E. coli* O157:H7. Observaram que as três cepas reduziram a população da bactéria patogênica e que substâncias secretadas no meio pelas bactérias lácticas foram parcialmente afetadas por tratamentos com as enzimas lactato desidrogenase, tripsina e proteinase K, sugerindo que a inibição pode ser devido à ação sinérgica entre o ácido láctico e substâncias protéicas.

A avaliação do efeito antagônico não se limita a experimentos "in vitro", uma vez que cepas já testadas desta maneira são posteriormente avaliadas em animais e em humanos para terem seu efeito validado.

WAARD et al., (2002) estudaram o efeito da ingestão de *Lactobacillus casei* Shirota YIT9029 em ratos quando desafiados com *Listeria monocytogenes*. Os ratos foram infectados oralmente com 0,5 mL de uma suspensão contendo 10^9 células viáveis de *L. monocytogenes*, sendo que nos três dias que antecederam à infecção os mesmos haviam recebido doses diárias de 10^9 células viáveis de *Lactobacillus*. Verificou-se que a suplementação com *L. casei* reduziu a população de *Listeria* no trato gastrointestinal bem como no baço e fígado e que os mesmos são capazes de aumentar a resistência do hospedeiro frente a esse patógeno.

Camundongos foram alimentados com *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) para avaliação da proteção imune mediada pelos mesmos.

Para tanto os animais receberam um dieta suplementada com *Lactobacillus* (3×10^8 UFC/g) antes e depois do desafio oral com *E. coli* O157:H7. Os resultados mostraram que o probiótico fornecido aos camundongos pode reduzir severamente a infecção por *E. coli* O157:H7 e se sugere que esta redução se deve ao aumento da resposta imune humoral e celular dos animais (SHU & GILL, 2002).

Com o intuito de se avaliar o efeito bactericida e/ou bacteriostático do pH sobre as bactérias patogênicas estudadas, foram avaliados os meios MRS e BHI com pH ajustados a 3,6 e 4,2, cujos resultados encontram-se representados a FIGURA 9. Nota-se que nessas condições *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 não se desenvolveram, demonstrando o efeito bacteriostático do pH. As bactérias patogênicas foram também plaqueadas em meio BHI após sete horas de contato com os respectivos meios acidificados com o objetivo de verificar se o ácido apresenta efeito bactericida. Desta forma verificou-se que os meios acidificados não exercem efeito bactericida sobre *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, tendo em vista que se observou crescimento destes microrganismos em ágar BHI.

Segundo PHAN-THAN et al., (2002) o menor pH que *Listeria* pode resistir depende da composição do meio, da cepa e do estado fisiológico da mesma. Estes autores estudaram a influência do pH, utilizando HCl para ajuste do pH do meio, no desenvolvimento de duas cepas de *L. monocytogenes* e verificou-se que os pH 4,0 (LO28) e 3,5 (EGD) foram os menores valores que as cepas resistiram, entretanto GIANUZZI et al. (1996) estudaram o efeito dos ácidos ascórbico, cítrico e láctico na inibição de *Listeria monocytogenes* em temperatura de refrigeração (4° e 10°C). Estes autores verificaram para ambas as temperaturas, efeito bactericida do ácido láctico sobre *Listeria* em meio TSB a pH 4,0, 3,5 e 3,0.

KOUTSOUMANIS & SOFOS (2004) estudaram o efeito do pH no crescimento de bactérias patogênicas, dentre elas *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7. Estas bactérias foram inoculadas em meio TSB a pH 3,5 (ajustado com ácido láctico) e seu desenvolvimento foi monitorado durante oito horas. Observou-se que a bactéria mais sensível ao pH foi

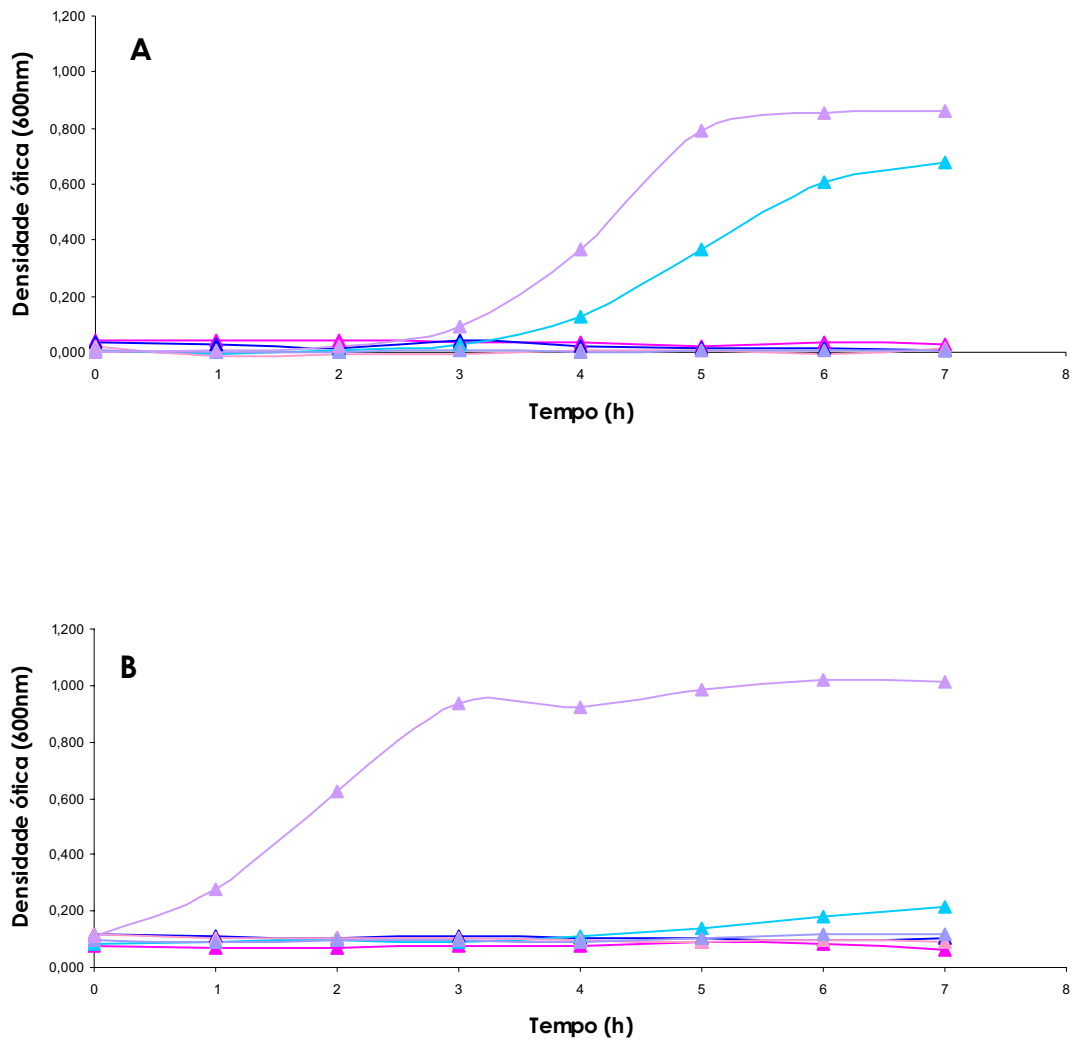


FIGURA 9: Curva de crescimento de *L. monocytogenes* - **A** e *E. coli* O157:H7 - **B** em meios MRS e BHI em diferentes pH. Onde: ▲ - MRS pH 3,61, ▲ - MRS pH 4,17, ▲ - MRS pH 6,33, ▲ - BHI pH 3,66, ▲ - BHI pH 4,15 e ▲ - BHI pH 7,38

Listeria monocytogenes seguida de *Escherichia coli* O157:H7, porém não se observou efeito bactericida.

CHENG et al., (2003) estudaram três cepas de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43889, ATCC 43895 e 993) quanto a tolerância ao ácido em meio TSB com pH ajustado com HCl a 3,0, 4,0 e 5,0 na temperatura de 37°C. Verificou-se que o percentual de sobrevivência das células de *E. coli* quando inoculadas por 120 min em meio acidificado para pH 3,0 foi de 4,2%, porém não se observou efeito bactericida. Em meio a pH 4,0 esse percentual subiu para aproximadamente 70%. Os autores testaram ainda a influência dos ácidos orgânicos láctico, acético e propiônico e observaram que o ácido láctico demonstrou ser o mais letal.

DATTA & BENJAMIM (1999) estudaram *E. coli* O157:H7 (AD305) quanto a sensibilidade ao ácido. Verificou-se que a interferência do ácido no desenvolvimento da bactéria em questão é dependente da concentração celular. Observou-se também que células na fase exponencial são mais inibidas do que na fase estacionária.

No presente trabalho foi quantificado o ácido láctico produzido pelas bactérias lácticas, cujos resultados encontram-se apresentados na TABELA 5.

TABELA 5: Concentração de ácido láctico produzido pelas cepas de *Lactobacillus* cultivados em caldo MRS por 18 horas.

Cepas de <i>Lactobacillus</i>	Ácido Láctico (g/L)
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 11fb	15,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 22c	18,39
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 41b	18,36
<i>Lactobacillus delbruecki</i> supb. <i>delbruecki</i> - 17fb	17,6
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 18fa	16,12
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 19fa	17,79
<i>Lactobacillus casei</i> supb. <i>pseudopantarum</i> - 30b	8,71
<i>Lactobacillus casei</i> supb. <i>pseudopantarum</i> - 30c	16,72
Pool A	19,14
Pool B	12,43

Nota-se que a maior quantidade de ácido láctico foi obtida com o *pool* A, resultante do crescimento das oito cepas de *Lactobacillus* conjuntamente. Observa-se que, com exceção de *L. casei* supb *pseudopantarum* - 30b, todas as demais cepas apresentaram produção de ácido láctico que variou entre 15 e 19,14 g/L.

O mesmo foi observado por LEE (2005), que verificou maior concentração de ácido láctico com cinco cepas de *Lactobacillus* quando crescidas em conjunto, produzindo cerca de 110 g/L em 70 horas de fermentação contra 90 g/L no mesmo tempo *L. casei* (NRRL-B1445). Quando as cepas cresceram separadamente apresentaram valores de 13,5 g/L, 14 g/L, 13,9 g/L, 8 g/L e 13,5 g/L para *Lactobacillus delbruecki* supb. *delbruecki* (ATCC 12315), *L. casei* (NRRL-B1445), *L. delbruecki* (NRRL-B445), *L. heveticus* (NRRL-B1937) e *L. casei* (NRRL-B1922) respectivamente. O autor sugeriu haver um aparente sinergismo entre as cepas.

Com relação ao efeito de inibição provocado pelo pH ácido sobre *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, a quantidade de ácido láctico produzido pelas cepas de *Lactobacillus* parece não influenciar no efeito bacteriostático, pois a adição de qualquer sobrenadante das cepas de *Lactobacillus* provocou este efeito.

GARRO et al., (2004) verificaram que na temperatura de 37°C a produção máxima de ácido láctico por *Lactobacillus fermentum* foi de 4,95 g/L e que em cultura mista com *Bifidobacterium longum* este valor foi o máximo alcançado quando estas bactérias foram cultivadas em "leite de soja".

KOURKOUTAS et al., (2005) quantificaram o ácido láctico produzido por *Lactobacillus casei*, isolado de um produto comercial, em meio sintético, que variou de 15,9 a 19,7 g/L numa temperatura de 37°C.

No presente trabalho observou-se (TABELA 4) que *L. delbruecki* supb. *delbruecki* - 17fb, *L. reuteri* - 19fa e o *pool* B apresentaram efeito bactericida sobre *E. coli* O157:H7. Este efeito possivelmente se deve à produção de outras substâncias antimicrobianas, como o H₂O₂ ou bacteriocinas. A quantidade de ácido láctico parece não influenciar no efeito bactericida, pois o *pool* A, que apresentou a maior produção de ácido láctico

(TABELA 5), não exerceu efeito bactericida sobre as bactérias patogências testadas.

4.5 Avaliação do efeito do sobrenadante sobre o desenvolvimento de cepas de *Lactobacillus*

Com o objetivo de melhor entender o comportamento das células que compõem o *pool* de *Lactobacillus*, formado pelo crescimento de todas as cepas em co-cultura, os sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus* foram colocados em contato com as células de *Lactobacillus*. As cepas de *Lactobacillus* também foram crescidas em caldo MRS com pH ajustado para 3,60 a fim de se verificar comportamento destes microrganismos em meio ácido. Os resultados encontram-se demonstrados nas FIGURAS 10, 11, 12.

Nota-se que as cepas de lactobacilos apresentaram diferentes comportamentos, sendo que os sobrenadantes exercem influência tanto positiva, como negativa, no desenvolvimento das mesmas.

Em relação ao crescimento das cepas de *Lactobacillus* frente ao meio acidificado, verifica-se que a cepa 41b foi a que menos sofreu interferência, atingindo 93,13 % do crescimento quando comparado ao controle.

As cepas 17fb, 22c, 19fa, 30c, 18fa, 11fb e 30b apresentaram crescimento correspondente a 77,95%, 76,34%, 73,31%, 67,78%, 57,10%, 42,66% e 33,76% respectivamente, em relação ao controle.

Os resultados demonstraram que todas as cepas de *Lactobacillus* quando em contato com sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum* (30b e 30c) tiveram seu crescimento favorecido, destacando-se as cepas 17fb, 19fa e 22c.

Todas as cepas de lactobacilos apresentaram baixo crescimento quando em contato com os sobrenadantes das demais cepas, sugerindo efeito antagônico, com exceção das cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum* (30b e 30c) que parecem não ser afetadas pelos sobrenadantes dos lactobacilos.

No presente trabalho algumas cepas mostraram-se sensíveis aos sobrenadantes da mesma espécie, porém um estudo mais aprofundado deve ser feito para avaliar se algumas destas cepas produzem substâncias

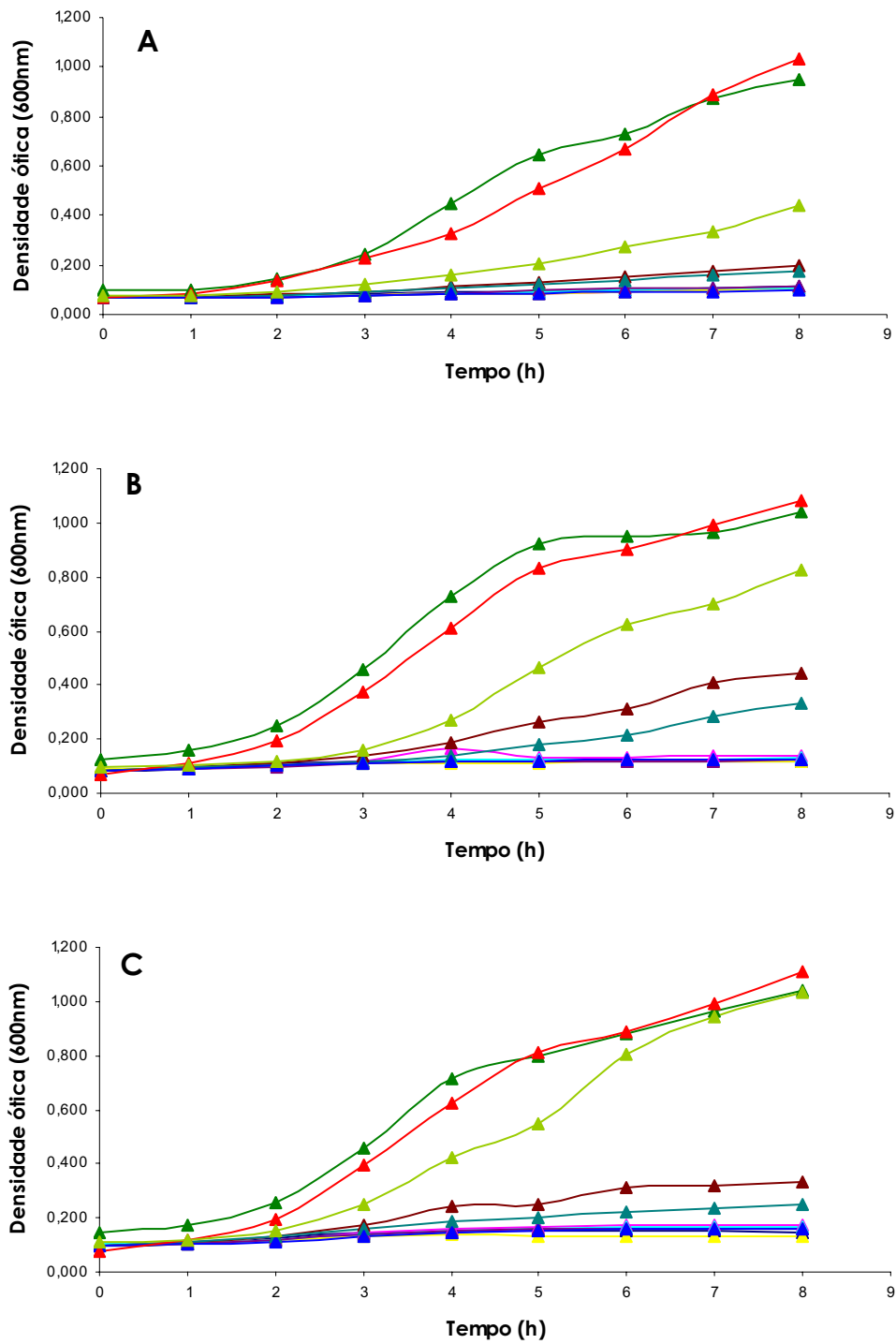


FIGURA 10: Curva de crescimento de **A-** *Lactobacillus plantarum* (11fb), **B-** *L. plantarum* (22c), **C-** *L. plantarum* (41c) quando em contato com sobrenadantes de *Lactobacillus*. ▲ - 11fb, ▲ - 17fb, ▲ - 18fa, ▲ - 19fa, ▲ - 22c, ▲ - 30b, ▲ - 30c, ▲ - 41b, ▲ - controle 1 constituído de 150 μ L de suspensão celular de *Lactobacillus* e ▲ - controle 2 constituído de 75 μ L de suspensão celular + 75 μ L de caldo MRS, ▲ - 75 μ L de suspensão celular de *Lactobacillus* + 75 μ L de caldo MRS pH 3,60.

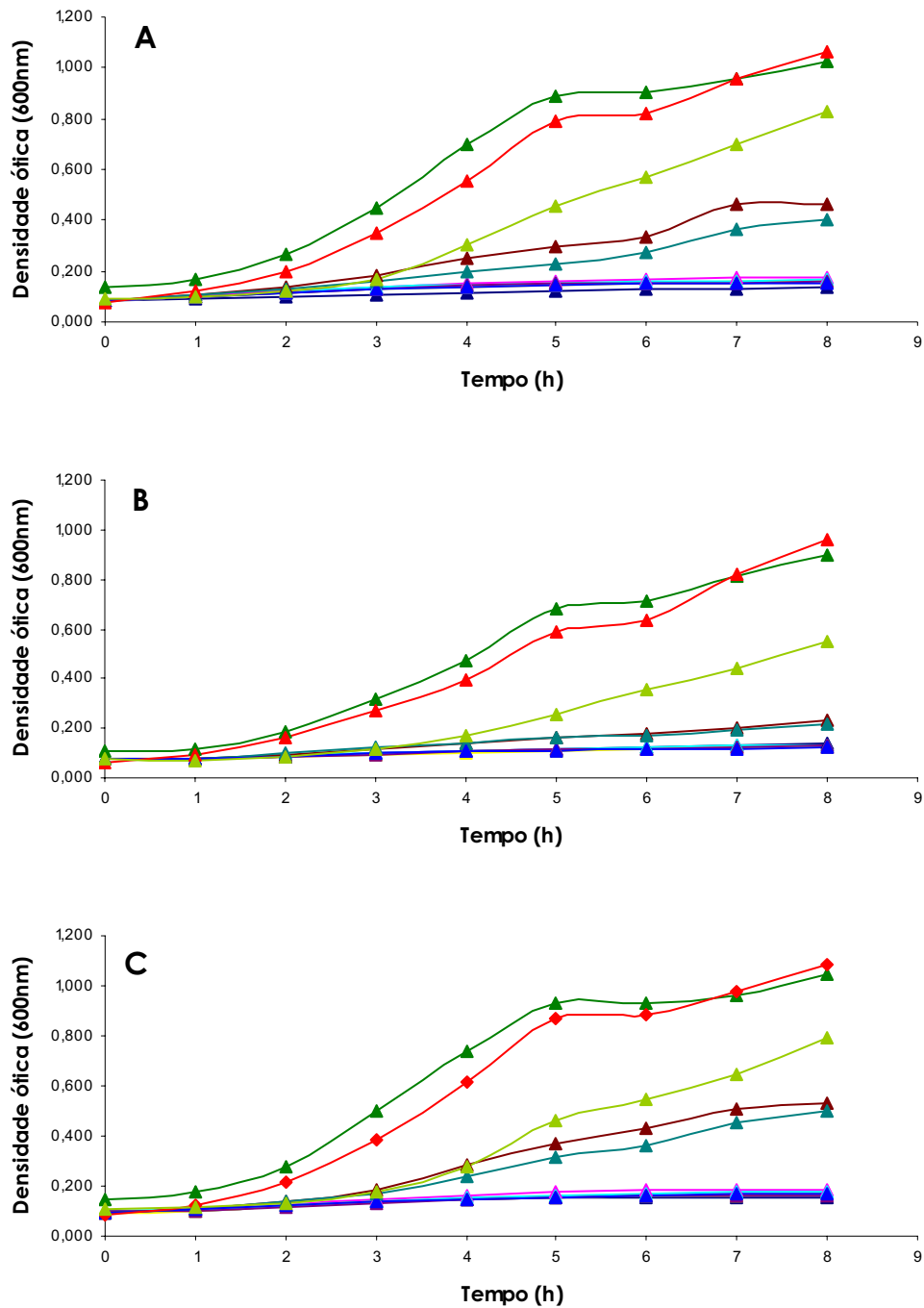


FIGURA 11: Curva de crescimento de **A-** *Lactobacillus delbrueckii* supb. *delbrueckii* (17fb), **B-** *L. reuteri* (18fa), **C-** *L. reuteri* (19fa) quando em contato com sobrenadantes de *Lactobacillus*.: ▲- 11fb, ▲- 17fb, ▲- 18fa, ▲- 19fa, ▲- 22c, ▲- 30b, ▲- 30c, ▲- 41b, ▲- controle 1 constituído de 150µL de suspensão celular de *Lactobacillus* e ▲- controle 2 constituído de 75µL de suspensão celular + 75µL de caldo MRS, ▲- 75 µL de suspensão celular de *Lactobacillus* + 75 µL de caldo MRS pH 3,60.

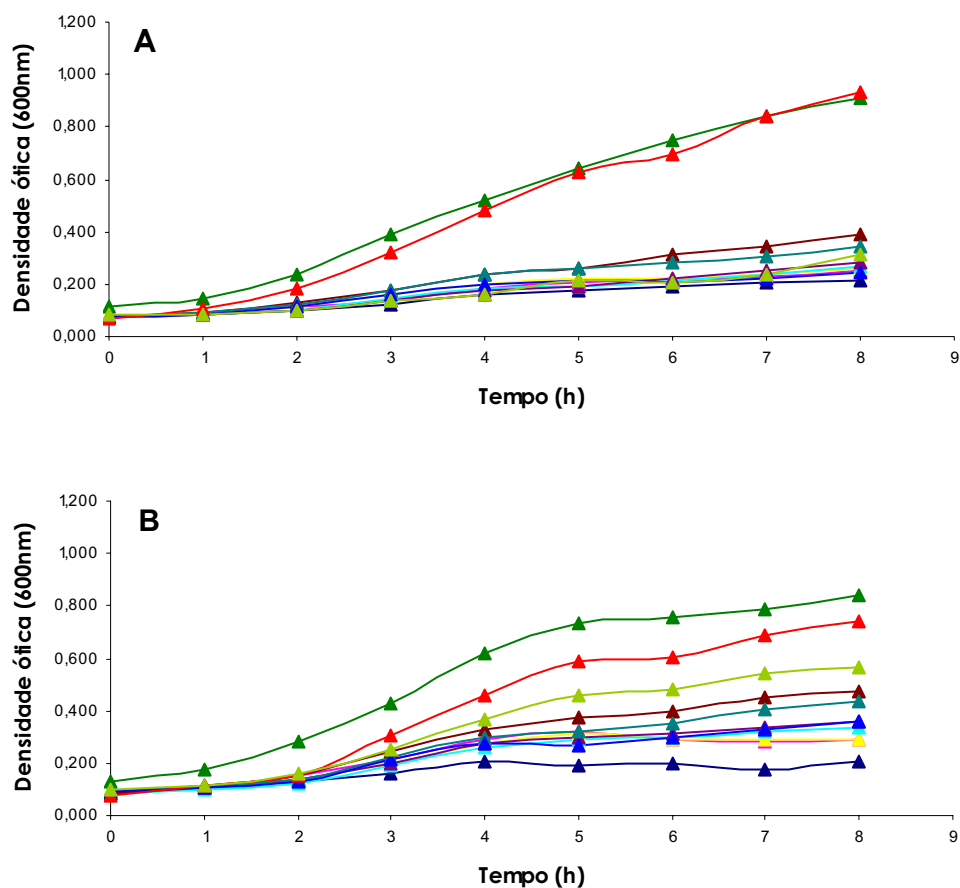


FIGURA 12: Curva de crescimento de **A-** *Lactobacillus casei* supb. *pseudoplantarum* (30b), **B-** *L. casei* supb. *pseudoplantarum* (30c). ▲ - 11fb, ▲ - 17fb, ▲ - 18fa, ▲ - 19fa, ▲ - 22c, ▲ - 30b, ▲ - 30c, ▲ - 41b, ▲ - controle 1 constituído de 150µL de suspensão celular de *Lactobacillus* e ▲ - controle 2 constituído de 75µL de suspensão celular + 75µL de caldo MRS, ▲ - 75 µL de suspensão celular de *Lactobacillus* + 75 µL de caldo MRS pH 3,60.

protéicas com atividade antimicrobiana (bacteriocinas). Provavelmente o composto causador deste efeito não foi bacteriocina, pois pela definição, os microrganismos que produzem bacteriocinas não são inibidos pelas mesmas (DE MARTINIS et al., 2002a). Outra hipótese é que, como as células produzem as bacteriocinas na fase log, mas só são excretadas ao meio extracelular no início da fase estacionária (PAPAGIANI, 2003), as células nesta fase não são sensíveis às mesmas, porém quando as bacteriocinas são colocadas em contato em outras fases, como na lag ou log, as células podem ainda não terem desenvolvido proteínas que lhe conferem imunidade contra esses peptídeos antimicrobianos, sendo conseqüentemente sensibilizadas.

Bactérias lácticas isoladas de malte de cevada por VAUGHAM et al., (2001) mostraram-se capazes de inibir o crescimento de microrganismos contaminantes do processo de cerveja. Os autores identificaram e caracterizaram 11 bacteriocinas isoladas de *Lactobacillus sakei* e *Leuconostoc mesenteroides* presentes no malte de cevada, sendo cada cepa produtora de mais de uma bacteriocina. Os microrganismos indicadores de inibição, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecalis* e *Pediococcus damnosus* foram inibidos pelas respectivas bacteriocinas. Os autores utilizaram a mesma metodologia do presente trabalho, avaliando o crescimento celular por turbidimetria depois de 16 horas de contato entre o sobrenadante ou bacteriocina isolada e a bactéria indicadora.

A atividade antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* BS sobre diferentes espécies de bactérias foi verificada utilizando células ativas e extrato semi-purificado de bacteriocinas. Dentre as cepas testadas *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Pediococcus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes* e *Listeria grayi* mostraram ser sensíveis aos compostos produzidos por *L. plantarum* BS, porém algumas cepas foram inibidas somente pelo extrato semi-purificado de bacteriocinas. Os autores sugeriram que as cepas que só foram inibidas pelo extrato semi-purificado de bacteriocina necessitam de

uma maior concentração desta para sensibilizá-las. Segundo ELEGADO et al., (2004) a atuação das bacteriocinas é dependente da concentração.

NAVARRO et al., (2000) testaram 42 cepas isoladas no processo de produção de vinho do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactococcus* quanto à produção de substâncias inibidoras de crescimento, sendo utilizadas como indicadoras as respectivas 42 cepas e outras 18. Nove cepas de *L. plantarum*, constituintes da microbiota predominante em vinhos tintos da região de Rioja-Espanha, foram selecionadas como produtoras de substâncias antimicrobianas. Os resultados mostraram que as cepas de *L. plantarum* quando avaliadas como indicadoras e produtoras de bacteriocinas simultaneamente não foram inibidas. Dentre as nove cepas de *L. plantarum* testadas, uma se destacou por apresentar atividade antimicrobiana contra 31 cepas indicadoras abrangendo todos os gêneros de bactérias lácticas testados, sendo que entre essas encontram-se algumas contaminantes do processo de fermentação do vinho.

Um total de 437 isolados caracterizadas como *Lactobacillus* provenientes de 70 amostras de fermento de padarias artesanais e industriais na Itália foram avaliadas quanto à produção de substâncias antimicrobianas contra 4 cepas indicadoras (*Lactobacillus farminis*, *L. sakei*, *L. delbruecki* ssp. *bulgaricus* e *Listeria innocua*) empregando-se a metodologia do ágar "spot test". Das 437 isoladas, 85 apresentaram efeito de inibição sobre alguns dos microrganismos testados, então tiveram seus sobrenadantes tratados com catalase, neutralizados, esterilizados por filtração e posteriormente testados por difusão em ágar. Somente cinco espécies de *Lactobacillus* mantiveram, após estes tratamentos, sua atividade antimicrobiana. Dentre os cinco selecionados, todos inibiram *L. sakei*, enquanto as demais espécies de *Lactobacillus* foram inibidas dependendo da cepa produtora de bacteriocina. Segundo os autores, os compostos antibacterianos produzidos foram inativados por enzimas proteolíticas, indicando serem de natureza protéica, característica das bacteriocinas. A síntese de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos podem regular a interação complexa entre os microrganismos envolvidos no processo de fermentação e a microbiota contaminante dos fermentos (CORSETTI et al., 2004).

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- As células de *Lactobacillus* apresentaram maior efeito de inibição sobre *Escherichia coli* O157:H7 do que *Listeria monocytogenes*.
 - *L. plantarum* (22c) e *L. casei* supb *pseudopiantarum* (30b) na ausência de bicarbonato de sódio exerceram maior efeito de inibição sobre *E. coli* O157:H7.
 - *L. reuteri* (19fa) apresentou o maior efeito de inibição independente da presença de bicarbonato de sódio sobre *L. monocytogenes*.
 - Os sobrenadantes cujos valores de pH foram ajustados para 7,0 não causaram efeito de inibição sobre *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7.
 - Os sobrenadantes "in natura" dos *Lactobacillus* exerceram efeito de inibição sobre *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7.
 - Os sobrenadantes de *Lactobacillus delbruecki* supb. *delbruecki* (17fb), *Lactobacillus reuteri* (19fa) e do pool B exerceram efeito bactericida sobre *Escherichia coli* O157:H7.
 - O pool B apresentou maior efeito de inibição quando comparado ao pool A.
 - *Escherichia coli* O157:H7 é mais sensível aos sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus* quando comparada a *Listeria monocytogenes*.
 - Os sobrenadantes dos *Lactobacillus casei* supb. *pseudopiantarum* (30b e 30c) estimularam os crescimento das demais cepas de *Lactobacillus*.
-

- As cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum* (30b e 30c) se desenvolveram melhor na presença dos sobrenadantes das demais cepas de *Lactobacillus* avaliadas.

Conclui-se ainda que as cepas de *Lactobacillus* que possuem efeito inibitório sobre *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 podem ser utilizadas, por exemplo, na conservação de alimentos onde estas bactérias contaminantes são normalmente encontradas e em aditivos de ração para animais que são reservatórios destas bactérias, como bovinos e aves, porém devem ser testados para estas aplicações.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar o sobrenadante das cepas *Lactobacillus delbrueckii* supb. *delbrueckii* (17fb), *Lactobacillus reuteri* (19fa) e do pool B quanto a presença de substâncias antimicrobianas, de natureza protéica, adicionando enzimas proteolíticas aos sobrenadante com pH natural.
 - Avaliar demais propriedades probióticas das cepas de *Lactobacillus* estudadas.
-

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERBERTH, I.; CERQUETTI, M.; POILANE I et al. Mechanisms of colonization resistance of the digestive tract. **Microbial Ecology in Health and Disease**. v. 11, p. 223-239, 2000.

ARICIA, M.; BILGIN, B.; SADGIC, O.; OZDEMIR, C. Some characteristic of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. **Food Microbiology**. v. 21, p. 19-24, 2004.

AVONTS, L.; UYTVEN, E.V.; DE VUYST, L. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strain in different media. **International Dairy Journal**. v. 14, p. 947-955, 2004.

BARBALHO, T.C.F.; ALMEIDA, P.F; ALMEIDA, R.C.C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp at a poultry processing plant in Brazil and a phages test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**. v. 16, p. 211-216, 2005.

BARBOSA, H.R., TORRES, B.B. **Microbiologia Básica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999, 196p.

BELL, C., KYRIAKIDES, A. **Listeria: A practical approach to the organism and its control in foods**. London: Chapman & Hall, 1998, p. 1-7.

BOLLAG, D.M.; ROZYCKI, M.D.; EDELSTEIN, S.J. **Protein Methods**, 2 ed., New York: Wiley-Liss, 1996, p. 415.

BREDHOLT, S.; NESBAKEN, T.; HOLCK, A. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas- packaged meat. **International Journal of Food Microbiology**. v.53, p. 43-52, 1999.

BRENNER, D.J. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams, 1986, p. 408-422.

BUCHANAN, R.E.; GIBBSONS, N.E. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974.

CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R.C.; High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**. v.70, p.111-121, 1999.

CHAVEERACH, P.; LIPMAN, L.J.A; VAN KNAPEN, F. Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. **International Journal of Food Microbiology**. v.90, p.43-50, 2004.

CHENG, H.Y.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge. **Food Research International**. v. 36, p. 49–56, 2003.

CLEARY, T.G. The Role of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* in Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome. **Seminars Pediatric Infectious Diseases**. v. 15, p. 260-265, 2005.

CORSETTI, A.; SETTANNI, L.; SINDEREN, D.V. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their *in vitro* and *in situ* activity. **Journal of Applied Microbiology**. v. 96, p. 521-534, 2004.

COSTALOS, C.; SKOUTERI, V.; GOUNARIS, A.; SEVASTIADOU, S; TRIANDAFILIDOU, A.; EKONOMIDOU, C.; KONTAXAKI, F.; PETROCHILOU, V. Enteral feeding of premature infants with *Saccharomyces boulardii*. **Early Human Development**. v.74, p.89-96, 2003.

DAESCHEL, M.A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. **Food Technology**, p.164-167, 1989.

DATTA, A.R.; BENJAMIN, M.M. Cell density dependent acid sensitivity in stationary phase cultures of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 181, p. 289-295, 1999.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 29, p. 114-119, 2002a.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.E.; FRANCO, B.D.G.M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Review International**. v.18, p.191-208, 2002b.

DE MARTINIS, E.C.P.; FREITAS, F.Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control**. v. 14, p. 197-200, 2003.

DENG, Y., BEUCHAT, L., Influence of temperature and pH on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry foods and growth in reconstitutes infant rice cereal. **International Journal of Food Microbiology**. v. 45, p. 13-184, 1998.

DIEZ-GONZALEZ, F., RUSSELL, J.B. The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. **Microbiology**. v. 143, 1175-1180, 1997.

DONOHUE, D.C.; SALMINEM, S.; MARTEAU. P. Safety of probiotic of bacteria. In: SAMINEM, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic Acid Bacteria – Microbiology and Functional Aspects**. New York: Marcel Dekker, 1998, p 369-383.

DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**. v.12, p. 289-301, 1991.

EARNSHAW, R.G. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: WOOD, B.J.B., **The lactic acid bacteria – The lactic acid bacteria in health and disease**. v 1. London: Chapman & Hall, 1992, p. 211-232.

EKLUND, T. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 54, p. 383-389, 1983.

ELEGADO, F.B.; GUERRA, M.A.R.V.; MACAYAN, R.A.; MENDOZA, H.A.; LIRAZAN, M.B. Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprint by RAPD-PCR. **International Journal of Food Microbiology**. v. 95, p. 11-18, 2004.

FERNÁNDEZ, M.F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotics properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, p. 449-455, 2003.

FERREIRA, C.L.F. Grupo de Bactérias Lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.F, **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003, p. 7-34.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: What are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice & Research**. v.17, p.711-724, 2003.

FULLER, R. The effect of Probiotics on the gut micro-ecology farm animals. In: WOOD, B.J.B. **The lactic acid bacteria – The lactic acid bacteria in health and disease**. v. 1. London: Chapman & Hal, 1992a, p. 171-192.

FULLER, R. ed. History and development of probiotics. **Probiotics: The scientific basis**. London: Chapman & Hall, 1992b, p. 1-8.

GAGNON, M.; KHEADR, E.E.; BLAY, G.L.; FLISS, I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology**. v.92, p. 69-78, 2004.

GARRO, M.S.; VALDEZ, G.F.; GIORI, G.S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. **Food Microbiology**. v. 21, p. 511-518, 2004.

GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N.E. Effect of Ascorbic Acid in Comparison to Citric and Lactic Acid on *Listeria monocytogenes* Inhibition at Refrigeration Temperatures. **Lebensm - Wiss Technology**. v. 29, p. 278-285, 1996.

GILL, H.S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research**. v.17, p.755-773, 2003.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X.; Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biociencia Alimantar**. v. 64, p. 12-22, 1999.

GOPAL, P.K.; PRASAD, J.; SMART, J.; GILL, H.S. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against enterotoxigenic *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 67, p. 207-216, 2001.

GRIFFIN, P.M.; RIES, A.^a; GREENE, K.D. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: A multicenter surveillance project. Dairy, **Food and Environment Sanitary**. v. 13, p. 598, 1993.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* 0157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associates hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Review**. v. 13, p. 60-98, 1991.

GUARNER, F.; SCHAAFSMA, G.J., Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**. v. 39, 237-238, 1998.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M.L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A.M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**. v. 21, p.217-225, 2004.

HAVENAAR, R.; HUIS IN VELD, J.H.J. Probiotics: A General View. In: WOOD, B.J.B. **The lactic acid bacteria – The lactic acid bacteria in health and disease**. v.1. London: Chapman & Hall, 1992, p. 151-170.

HEIKKILA, M.P.; SARIS, P.E.J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**. v. 95, p. 471-478, 2003.

HERREROS, M.A.; SANDOVAL, H.; GONZÁLEZ, L.; CASTRO, J.M.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). **Food Microbiology**. v. 22, p. 455-459, 2005.

HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.95, p.615-620, 2000.

IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I.; RAMOS, I.I.; SOUZA, M.A.C.; CRUZ, A.S.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M; GUTH. B.E.C. Serotypes and virulence strains markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)

isolated from dairy product in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**. v. 105, p. 29-36, 2005.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, E.; SALMINEM, S. Lactic Acid Bacteria and Immune Modulation. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic Bacteria – Microbiology and Functional Aspects**. Marcel Dekker: New York. p. 225-68, 1998.

ISOULARI, E.; SALMINEM, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice & Research**. v.18, p.299-313, 2004.

JERPESEN, L. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. **FEMS Yeast Research**. v.3, p.191-200, 2003.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; ALI, M.A.; JALALUDIN, S. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. **Letters in Applied Microbiology**. v.23, p. 67-71, 1996.

KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe**. v.3, p.15-190, 1997.

KALCHAYAND, N.; HANLIN, M.B.; RAY, B. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin ACh and nisin. **Letters in Applied Microbiology**. v. 15, p. 239-243, 1992.

KLANDER, O.; WEISS, N. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore : Williams, 1986, p. 1208-1234.

KLAENHAMER, T.R. Microbiological considerations in selection and preparation of *Lactobacillus* strains for use as dietary adjuncts. **Journal of Dairy Science**. v.65, p. 1339-1349, 1982.

KOURKOUTAS, Y.; XOLIAS, V.; KALLIS, V.; BEZIRTZOGLU, E.; KANELLAKI, M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 411–416, 2005.

KOUTSOUMANIS, K.P.; SOFOS, J.N. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 321–326, 2004.

KUDVA, T.I., HATFIELD, P.G., HOVDE, C.J., *Escherichia coli* O157:H7 in microbiota flora of sheep. **Journal of Clinical Microbiology**. v.34, p. 431-433, 1996.

KUNTZ, T.B.; KUNTZ, S.T.; Enterohemorrhagic *E. coli* Infection. **Fourth Prize Paper**. v.6, p. 192-196.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; GUZMÁN-MENDÉZ, B. E.; LÓPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus casei*, and the yeast *Saccharmyces cerevisiae* as growth promoters Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**. v.216, p.193-201, 2003.

LASH, B.W.; GOURAMA, H.; MYSLIWIEC, T.H. Microscale assay for screening of inhibitory activity of *Lactobacillus*. **BioTechniques**. v. 33, p. 1224-1228, 2002.

LASH, B.W.; MYSLIWIEC, T.H.; GOURAMA, H.; MYSLIWIEC, T.H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). **Food Microbiology**. v. 22, p. 199-204, 2005.

LEMA, M.; WILLIAMS, L., RAO, D.R. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. **Small Ruminant Research**. v.39, p. 31-39, 2001.

LEE, K. Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 1559-1564, 2005.

LIN, Y.; Chou, C. Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. **Food Microbiology**. v.21,p.605-610, 2004.

LINK-AMSTER, H.; ROCHAT, F.;SAUDAN, K.Y.;MIGNOT, O.; AESCHLIMANN, J.M. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. **Immunology and Medical Microbiology**. v.10, p.55-64, 1994.

LIOR, H.C. E. coli and verotoxigenic E. coli. **Dairy, Food and Environment Sanitary**. 13(10):592, 1993.

LOPES, M.F.S.; LEITÃO, A. L.; J.J. Figueiredo MARQUES, J.J.F.; CARRONDO, M.J.T.; CRESPO, M.T.B. Processing of extracellular lipase of *Lactobacillus plantarum*: involvement of a metalloprotease. **FEMS Microbiology Letters**. v. 00, p. 483-487, 1999.

MAC FADDIN, J.F. **Pruebas bioquímicas para la indentificación de bacterias de importancia clínica**. Buenos Aires: Panamericana, 1980, 301p.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics, infection and immunity. **Current Opinion in Infectious Disease**. v.15, p.501-506, 2002.

MADDEN, J. M. E. coli 0157:H7: The U.S. Food and Drug Administration perspective. **Dairy, Food and Environment Sanitary**. v. 13, p. 59, 1993.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 9 ed, Prentice-Hall, 2000, p. 51-53.

MAIA, O.B.; DUARTE, R.; SILVA, A.M.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R. Evaluation of the components of a commercial probiotic in a gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium. **Veterinary Microbiology**. v. 79, p. 183-189, 2001.

MARTEAU, P.; SEKSIK, P.; JIAN, R. Probiotics and health: new facts and ideas. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 486-489, 2002.

MARTINEZ, R.C.R.; DE MARTINIS, E.C.P. Antilisterial activity of a crude preparation of *Lactobacillus sakei* 1 bacteriocin and its lack of influence on *Listeria monocytogenes* haemolytic activity. **Food Control**. v. 16, p. 429-433, 2005.

MCLAUCHILIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 92, p. 15-33, 2004.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different foods products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**. v.21, p. 213-216, 2004.

MENG, J., DOYLE, M.P., ZHAO, T., ZHAO, S. Detection and control of *Escherichia coli* 0157:H7 in foods. **Trends in Food Science Technology**. v.5, p. 179-185, 1994.

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Current Pharmaceutical Design**. v.9, p.175-191, 2003.

MESSI, P.; BONDI, M.; SABIA, C.; BATTINI, R.; MANICARDI, G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **International Journal of Food Microbiology**. v. 64, p. 193-198, 2001.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nut Ver.**, v.50, p. 438-446, 1992.

MOTTET, C.; MICHETTI, P. Probiotics: wanted dead or alive. **Digestive and Liver Disease**. v. 37, p. 3-6, 2005.

MURPHY, R.Y.; BEARD, B.L.; MARTIN, E.M.; KEENER, A.E.; OSAILI, T. Predicting process of lethality of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ground, formulated, and formed beef/turkey links cooked in an air impingement oven. **Food Microbiology**. v.21, p.493-499, 2004.

NAVARRO, L.; ZARAZAGA, M.; SÁENZ, J.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Bacteriocin production of by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. **Journal of Applied Microbiology**. v.88, p.44-51, 2000.

NES, I.F.; JOHNSBORG, O. Exploration of antimicrobial potencial in LAB by genomics. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 15, 100-104, 2004.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; PENNA, J.F.; VIEIRA, L.Q.; RODRIGUES, A.C.P.; NEUMANN, E.; SILVA, A.M.; LIMA FILHO, J.V.M.; BAMBIRRA, E.A.; ARANTES, R.M.E.; MACHADO, D.C.C. Probióticos: Experiências com animais gnotobióticos. In: FERREIRA, C.L.F, **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003, p. 123-133.

OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic bacteria *Lactobacillus* strains due to production of latic acid. **International Journal of Food Microbiology**. v. 68, p. 135-140, 2001.

OKUTAMI, A.; OKADA, Y.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. **International Journal of Food Microbiology**. v.93, p.131-140, 2004.

OSTLIE, H.M.; TREIMO, J.; NARVHUS, J.A. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. **International Dairy Journal**. v.15, p. 989-997, 2005.

OUWEHAND, A. C. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic Bacteria – Microbiology and Functional Aspects**. Marcel Dekker: New York, 1998, p. 139-159.

PADHYE, N. V., DOYLE, M.P. Escherichia coli O157:H7: Epidemiology, Pathogenesis, and Methods for Detection in Food. **Journal Food Protection**. v.55, p. 555-565, 1992.

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

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2 ed. MAKRON Books, v. 1, 2003, p. 190-205.

PEREIRA, C.A.S, LUCHESE, R.H., VALADÃO, R.C. Potencial probiótico de linhagens de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*. **Alimentaria**. p. 54-59, 2004.

PHAN-THANH, L.; MAHOUIN, F.; ALIGE, F. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 55 , p. 121-126, 2002.

PLEASANTS, A.B.; SOBOLEVA, T.K.; DYKES, G.A.; JONES, R.J.; FILIPPOV, A.E. Modelling of the growth of populations of *Listeria monocytogenes* and bacteriocin-producing strain in pure and mixed cultures. **Food Microbiology**. Vv. 18, p. 605-615, 2001.

RICE, E. Drinking water associated with waterborne disease: hemorrhagic colitis. **Dairy, Food and Environment Sanitary**. v. 13, p. 603, 1993.

RILEY, L. W., REMIS, R. S., HELGERSON, S.D., MCGEE, H.B., WELLS, J.G., DAVIS, B.R., HERBERT, R.J., OLCOTT, E.S., JOHNSON, L.M., HARGRETT, N.T., BLAKE, P.A., COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**. v.308, p.681-685, 1983.

ROBINSON, T.P.; OCIO, M.J.; KALOTI, A.; MACKEY, B.M. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**. v.44, p. 83-92, 2005.

RODRIGUES, A.C.P., CARA, D.C., FRETEZ, S.H., CUNHA, F.Q., VIEIRA, E.C., NICOLI, J.R. AND VIEIRA, L.Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**. v. 89. p. 404-414, 2000.

ROEN, S. L. Probiotic reduces *E. coli* in live cattle. **Western Livestock Journal**, 2002.

ROSSALAND, E.; LANGSRUD, T.; GRANUM. P.E.; SORHAUG, T. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**. v.98. p. 193-200, 2005.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; FERES, F.A.; TOLEDO, R.S. Utilização de probióticos e prebióticos em aves. Em FERREIRA, C.L.F, **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003, p. 181-202.

RUSSEL, J. B. Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, p. 255-259, 1991.

SAMELIS, J.; BEDIE, G.K.; SOFOS, J.N.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; SMITH. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **Lebensm Wiss Technology**. v. 38, p. 21-28, 2005

SAXELIN, M.; TYNKKYNNEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VOS, W.M. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Current opinion in Biotechnology**. v.16, p. 1-8, 2005.

SEELIGER & JONES. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams, p. 1235-1245, 1986.

SERVIN, A.L.; COCONIER, M. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research**. v.17, p.741-754, 2003.

SHU, Q.; GILL, H.S. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.34, p.59-64, 2002.

STECCHINI, M.L.; TORRE, M.D.; VENIR, E. Growth of *Listeria monocytogenes* as influenced by viscosity and water activity. **International Journal of Food Microbiology**. v. 96, p. 181– 187, 2004.

STEFANOVA, M.E.; DAVIES, C.; NICHOLAS, R.A.; GUTHEIL, W.G. pH, inhibitor, and substrate specificity studies on *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5. **Biochimica et Biophysica Acta**. v, 1597, p. 292-300, 2002.

SUNG, H.W.; CHEN, C.N.; LIANG, H.F.; HONG, M.H. A natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for biological-tissue fixation. **Biomaterial**. v. 24, p. 1335-1347, 2003.

TAMPLIN, M.L.; PAOLI, G.; MARMER, B.S.; PHILIPS, J. Models of the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in raw sterile ground beef stored at 5 to 46°C. **International Journal of Food Microbiology**. v. 100, p. 335-344, 2005.

TARR, P.I. E. coli O157:H7 outbreak in the Western United States. **Dairy, Food and Environment Sanitary**, v. 13, p. 592, 1993.

TIMMERMAN, H.M., KONING, C.J.M., MULDER, L., ROMBOOTS, F.M., BEYNEN, A.C. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics – A comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**. v96, p. 219-233, 2004.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36, p. 318-326, 2005.

TOURÉ, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; MORONI, O.; FLISS, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p. 1058-1069, 2003.

TYOPPONEM, S.; MARKKUKA, A.; PETAJA, E.; SUIHKO, M.L.; MATTILA-SANDHOLM, T. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starters cultures. **Food Control**. v. 14, p. 181-185, 2003.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition-Archiv fur Tierernahrung**. v. 40, p. 543-567, 1990.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. Foodborne Pathogens. **An Illustrated text**. London: Mosby Year Book, 1991, p. 577.

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

WAARD, R.; GARSSSEN, J.; BOKKEN, G.C.A.M; VOS, J.G. Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain Shirota against gastrointestinal *Listeria monocytogenes* infection in rats. **International Journal of Food Microbiology**. v. 73, p. 93-100, 2002.

WALLS, I.; BUCHANAN, R.L.; Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. **Food Control**. v. 16, p. 795-799, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Perfil da fermentação de açúcares por espécies de *Lactobacillus*

Açúcares	<i>L. plantarum</i> 11fb	<i>L. plantarum</i> 22c	<i>L. plantarum</i> 41b	<i>L. delbruecki</i> supb. <i>delbruecki</i> 17fb	<i>L. reuteri</i> 18fa	<i>L. reuteri</i> 19fa	<i>L. casei</i> supb. <i>pseudopantarum</i> 30b	<i>L. casei</i> supb. <i>pseudopantarum</i> 30c	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> O157:H7
Arabinose	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
Celobiose	+	+	+	+	-	-	+	+	x	-
Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	x	x
Galactose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	x
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	-	+	+	+	+	x	x
Manitol	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	x	x
Melezitose	-	-	-	+	-	+	-	+	-	x
Melibiose	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Rafinose	-	-	-	-	+	+	-	-	x	-
Ramnose	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Salicina	+	+	-	-	-	-	+	+	x	-
Sorbitol	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Trealose	+	+	+	+	-	-	+	+	x	x
Xilose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+

+ : Fermenta, - : Não Fermenta, x: Não Realizado

APÊNDICE B: Testes de coloração de GRAM e catalase para as cepas de microorganismos avaliadas no presente trabalho

Cepas	GRAM	CATALASE
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 11fb	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 22c	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 41b	+	-
<i>Lactobacillus delbruecki</i> supb <i>delbruecki</i> - 17fb	+	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 18fa	+	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 19fa	+	-
<i>Lactobacillus casei</i> supb <i>pseudopantarum</i> - 30b	+	-
<i>Lactobacillus casei</i> supb <i>pseudopantarum</i> - 30c	+	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	+

APÊNDICE C: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Listeria monocytogenes* em caldo BHI

Tempo (horas)	<i>Listeria monocytogenes</i> (densidade ótica – 600nm)
0	0,019
1	0,021
2	0,022
3	0,097
4	0,296
5	0,446
6	0,539
7	0,654

APÊNDICE D: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 em caldo BHI

Tempo (horas)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (densidade ótica – 600nm)
0	0,021
1	0,012
2	0,009
3	0,120
4	0,305
5	0,645
6	0,823
7	0,906

APÊNDICE E: Diâmetro (mm) dos halos de inibição causada pelas cepas de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7

Cepas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 *	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 11fb	11,5	15
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 22c	-	13
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 41b	12,5	19
<i>Lactobacillus delbruecki</i> supb <i>delbruecki</i> - 17fb	15,5	23
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 18fa	13	11
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 19fa	-	13
<i>Lactobacillus casei</i> supb <i>pseudopantarum</i> - 30b	14	14
<i>Lactobacillus casei</i> supb <i>pseudopantarum</i> - 30c	15	21
Pool A	19	19

*Meio MRS adicionado de bicarbonato de sódio, - ausência de crescimento dos *Lactobacillus*

APÊNDICE F: Diâmetro (mm) dos halos de inibição causada pelas cepas de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes*

Cepas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 *	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 11fb	8,5	10,5
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 22c	-	10,5
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 41b	8	11
<i>Lactobacillus delbruecki</i> supb <i>delbruecki</i> - 17fb	11	13
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 18fa	6	9
<i>Lactobacillus reuteri</i> - 19fa	-	13
<i>Lactobacillus casei</i> supb <i>pseudopantarum</i> - 30b	11	13,5
<i>Lactobacillus casei</i> supb <i>pseudopantarum</i> - 30c	9,5	11
Pool A	11,5	13

*Meio MRS adicionado de bicarbonato de sódio, - ausência de crescimento dos *Lactobacillus*

APÊNDICE G: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *L. monocytogenes* na presença dos sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus* a pH 7,0

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)											
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b	pool A	pool B	controle 1	controle 2
0	0,057	0,055	0,066	0,057	0,061	0,061	0,053	0,054	0,058	0,102	0,033	0,074
1	0,115	0,102	0,107	0,101	0,108	0,112	0,098	0,102	0,105	0,423	0,077	0,184
2	0,316	0,278	0,287	0,255	0,294	0,275	0,272	0,284	0,295	0,894	0,241	0,432
3	0,470	0,420	0,398	0,341	0,410	0,423	0,443	0,413	0,362	0,967	0,440	0,516
4	0,529	0,484	0,449	0,374	0,440	0,417	0,492	0,454	0,391	0,959	0,465	0,486
5	0,537	0,476	0,479	0,391	0,474	0,489	0,501	0,496	0,416	0,974	0,576	0,668
6	0,574	0,515	0,515	0,433	0,498	0,518	0,587	0,492	0,463	0,982	0,662	0,781
7	0,659	0,560	0,577	0,484	0,553	0,584	0,661	0,530	0,519	0,975	0,742	0,889

APÊNDICE H: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *L. monocytogenes* na presença dos sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus* a pH natural.

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)											
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b	pool A	pool B	controle	controle 2
0	0,020	0,023	0,031	0,026	0,029	0,027	0,027	0,035	0,119	0,030	0,033	0,074
1	0,016	0,017	0,022	0,024	0,022	0,020	0,018	0,025	0,123	0,020	0,077	0,184
2	0,019	0,024	0,027	0,032	0,032	0,026	0,021	0,031	0,168	0,026	0,241	0,432
3	0,016	0,022	0,023	0,029	0,029	0,020	0,021	0,029	0,138	0,021	0,440	0,516
4	0,021	0,022	0,025	0,028	0,031	0,020	0,018	0,031	0,151	0,020	0,465	0,486
5	0,029	0,032	0,021	0,016	0,025	0,015	0,017	0,031	0,147	0,019	0,576	0,668
6	0,026	0,028	0,025	0,021	0,023	0,015	0,021	0,031	0,153	0,021	0,662	0,781
7	0,031	0,032	0,028	0,022	0,039	0,021	0,024	0,031	0,122	0,030	0,742	0,889

APÊNDICE I: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 na presença dos sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus* a pH 7,0

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)											
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b	pool A	pool B	controle 1	controle 2
0	0,022	0,017	0,019	0,015	0,015	0,020	0,011	0,013	0,019	0,008	-0,003	0,012
1	0,010	0,005	0,005	0,001	-0,002	0,006	0,009	0,001	0,000	0,020	-0,021	0,034
2	0,109	0,106	0,091	0,096	0,099	0,105	0,102	0,097	0,103	0,076	0,052	0,229
3	0,272	0,257	0,215	0,220	0,225	0,227	0,260	0,230	0,247	0,172	0,164	0,533
4	0,562	0,480	0,396	0,444	0,452	0,423	0,560	0,462	0,494	0,443	0,372	0,888
5	0,750	0,625	0,555	0,554	0,589	0,618	0,729	0,589	0,610	0,753	0,532	0,947
6	0,819	0,664	0,652	0,612	0,642	0,669	0,791	0,637	0,684	0,859	0,716	0,991
7	0,817	0,667	0,681	0,661	0,661	0,683	0,776	0,642	0,686	0,896	0,773	1,002

APÊNDICE J: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 na presença dos sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus* a pH 7,0

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)											
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b	pool A	pool B	controle 1	controle 2
0	-0,021	-0,010	-0,014	-0,022	-0,017	-0,027	-0,027	-0,017	0,015	-0,018	-0,003	0,012
1	-0,043	0,016	-0,037	-0,037	-0,041	-0,039	-0,036	-0,042	0,012	-0,039	-0,021	0,034
2	-0,001	0,000	0,001	-0,006	0,000	-0,004	0,002	-0,002	0,028	0,003	0,052	0,229
3	0,001	0,001	0,002	0,012	0,013	-0,006	0,008	-0,004	0,011	0,010	0,164	0,533
4	0,006	0,010	0,007	0,008	0,013	0,005	0,013	0,005	0,021	0,004	0,372	0,888
5	0,004	0,010	0,004	0,008	0,010	0,004	0,015	0,007	0,018	0,004	0,532	0,947
6	0,011	0,014	0,013	0,015	0,016	0,007	0,008	0,012	0,017	0,008	0,716	0,991
7	0,006	0,011	0,012	0,010	0,011	0,006	0,002	0,004	0,020	-0,001	0,773	1,002

APÊNDICE K: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *L. monocytogenes* em meios MRS e BHI em diferentes valores de pH.

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)					
	MRS pH 3,61	MRS pH 4,17	MRS pH 6,33	BHI pH 3,66	BHI pH 4,15	BHI pH 7,38
0	0,045	0,037	0,010	0,021	0,005	0,001
1	0,043	0,026	-0,004	-0,013	-0,002	0,005
2	0,041	0,013	0,006	-0,006	0,000	0,020
3	0,037	0,039	0,029	-0,006	0,005	0,093
4	0,034	0,022	0,128	0,006	0,000	0,369
5	0,018	0,012	0,364	0,007	0,009	0,793
6	0,033	0,014	0,604	-0,010	0,006	0,856
7	0,029	0,008	0,680	0,012	0,009	0,860

APÊNDICE L: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *E. coli* O157:H7 em meios MRS e BHI em diferentes valores de pH.

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)					
	MRS pH 3,61	MRS pH 4,17	MRS pH 6,33	BHI pH3,66	BHI pH 4,15	BHI pH 7,38
0	0,076	0,117	0,083	0,121	0,094	0,111
1	0,069	0,113	0,093	0,102	0,090	0,279
2	0,068	0,101	0,100	0,101	0,095	0,622
3	0,074	0,110	0,090	0,105	0,099	0,937
4	0,073	0,102	0,113	0,094	0,088	0,924
5	0,087	0,102	0,113	0,093	0,104	0,987
6	0,085	0,100	0,178	0,097	0,121	1,022
7	0,063	0,103	0,212	0,090	0,120	1,015

APÊNDICE M: Concentração de glicose, ácido acético, etanol e ácido láctico no meio MRS e nos sobrenadantes resultantes do cultivo das cepas de *Lactobacillus* a 37°C por 18 horas.

<i>Lactobacillus</i>	Concentração (g/L)			
	D-glicose	Ácido Acético	Etanol	Ácido Láctico
11fb	3,34	4,43	nd	15,0
17fb	2,19	4,14	nd	17,6
18fa	0,44	4,96	nd	16,12
19fa	3,61	4,34	nd	17,79
22c	0,90	4,21	nd	18,39
30b	5,35	2,05	nd	8,56
30c	5,95	2,71	nd	16,72
41b	2,77	3,75	nd	18,36
<i>pool A</i>	2,01	2,81	nd	19,14
<i>pool B</i>	5,16	2,77	nd	12,43
meio MRS	15,14	2,03	nd	nd

APÊNDICE N: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Lactobacillus plantarum* (11fb) quando em contato com sobrenadantes das suspensões de células *Lactobacillus*

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)										
	Sobrenadantes dos <i>Lactobacillus</i>								controle 1	controle 2	controle 3
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b			
0	0,068	0,071	0,068	0,069	0,068	0,068	0,068	0,069	0,096	0,069	0,074
1	0,069	0,071	0,068	0,068	0,069	0,070	0,069	0,068	0,102	0,085	0,075
2	0,075	0,074	0,073	0,073	0,072	0,080	0,080	0,072	0,147	0,135	0,091
3	0,083	0,079	0,076	0,079	0,077	0,093	0,089	0,076	0,242	0,226	0,121
4	0,093	0,084	0,082	0,086	0,083	0,112	0,107	0,081	0,448	0,329	0,163
5	0,094	0,087	0,085	0,089	0,099	0,128	0,123	0,085	0,643	0,506	0,205
6	0,098	0,094	0,093	0,096	0,105	0,151	0,139	0,088	0,727	0,665	0,274
7	0,107	0,103	0,100	0,104	0,110	0,172	0,158	0,094	0,871	0,891	0,338
8	0,114	0,103	0,104	0,110	0,114	0,195	0,176	0,098	0,949	1,036	0,442

APÊNDICE O: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Lactobacillus plantarum* (22c) quando em contato com sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus*

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)										
	Sobrenadantes dos <i>Lactobacillus</i>								controle 1	controle 2	controle 3
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b			
0	0,085	0,086	0,088	0,086	0,084	0,084	0,086	0,085	0,124	0,071	0,099
1	0,093	0,092	0,092	0,090	0,091	0,097	0,094	0,092	0,157	0,113	0,105
2	0,109	0,105	0,103	0,102	0,098	0,113	0,106	0,102	0,247	0,192	0,120
3	0,115	0,119	0,108	0,113	0,108	0,138	0,120	0,112	0,460	0,375	0,159
4	0,118	0,169	0,112	0,122	0,116	0,185	0,142	0,119	0,728	0,608	0,273
5	0,120	0,134	0,114	0,124	0,115	0,262	0,181	0,121	0,919	0,835	0,468
6	0,121	0,135	0,116	0,125	0,119	0,314	0,217	0,123	0,953	0,901	0,623
7	0,121	0,136	0,117	0,126	0,121	0,412	0,282	0,125	0,962	0,990	0,700
8	0,121	0,137	0,121	0,128	0,123	0,445	0,331	0,126	1,042	1,082	0,826

APÊNDICE P: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Lactobacillus plantarum* (41b) quando em contato com sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus*

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)										
	Sobrenadantes dos <i>Lactobacillus</i>								controle 1	controle 2	controle 3
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b			
0	0,095	0,096	0,094	0,101	0,096	0,097	0,096	0,100	0,147	0,080	0,109
1	0,104	0,103	0,101	0,107	0,102	0,112	0,110	0,105	0,176	0,120	0,121
2	0,126	0,119	0,115	0,119	0,116	0,133	0,130	0,114	0,260	0,192	0,152
3	0,145	0,145	0,133	0,139	0,138	0,177	0,158	0,134	0,458	0,397	0,250
4	0,149	0,162	0,136	0,156	0,155	0,240	0,191	0,148	0,715	0,627	0,424
5	0,150	0,169	0,134	0,162	0,159	0,247	0,200	0,155	0,799	0,811	0,548
6	0,149	0,174	0,134	0,164	0,160	0,311	0,224	0,157	0,883	0,891	0,802
7	0,150	0,176	0,133	0,165	0,162	0,319	0,236	0,159	0,965	0,994	0,942
8	0,149	0,176	0,135	0,167	0,161	0,330	0,251	0,161	1,040	1,107	1,031

APÊNDICE Q: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Lactobacillus plantarum* (17fb) quando em contato com sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus*

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)										
	Sobrenadantes dos <i>Lactobacillus</i>								controle 1	controle 2	controle 3
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b			
0	0,083	0,082	0,082	0,084	0,082	0,082	0,083	0,083	0,135	0,078	0,092
1	0,090	0,096	0,097	0,099	0,097	0,103	0,107	0,098	0,167	0,121	0,103
2	0,101	0,119	0,116	0,116	0,113	0,133	0,126	0,112	0,263	0,200	0,121
3	0,110	0,137	0,133	0,134	0,132	0,179	0,158	0,126	0,445	0,353	0,164
4	0,115	0,150	0,138	0,146	0,143	0,249	0,201	0,138	0,701	0,555	0,302
5	0,122	0,158	0,144	0,153	0,150	0,297	0,229	0,143	0,887	0,791	0,459
6	0,126	0,167	0,150	0,160	0,152	0,336	0,272	0,148	0,900	0,822	0,569
7	0,132	0,171	0,156	0,163	0,154	0,462	0,366	0,153	0,956	0,959	0,696
8	0,135	0,173	0,161	0,164	0,156	0,465	0,401	0,154	1,022	1,061	0,827

APÊNDICE R: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Lactobacillus plantarum* (18fa) quando em contato com sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus*

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)										
	Sobrenadantes dos <i>Lactobacillus</i>								controle 1	controle 2	controle 3
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b			
0	0,077	0,078	0,075	0,079	0,077	0,075	0,075	0,077	0,105	0,065	0,076
1	0,079	0,079	0,076	0,080	0,078	0,078	0,079	0,079	0,119	0,093	0,071
2	0,087	0,088	0,084	0,090	0,087	0,095	0,097	0,088	0,188	0,162	0,082
3	0,098	0,098	0,092	0,101	0,097	0,117	0,121	0,098	0,319	0,268	0,117
4	0,108	0,109	0,101	0,111	0,106	0,142	0,136	0,106	0,474	0,397	0,174
5	0,116	0,114	0,108	0,118	0,113	0,163	0,160	0,110	0,683	0,586	0,258
6	0,120	0,119	0,113	0,123	0,116	0,180	0,174	0,113	0,710	0,638	0,358
7	0,129	0,123	0,120	0,129	0,125	0,203	0,195	0,118	0,812	0,822	0,443
8	0,136	0,126	0,128	0,135	0,130	0,229	0,216	0,123	0,899	0,958	0,547

APÊNDICE S: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Lactobacillus plantarum* (19fa) quando em contato com sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus*

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)										
	Sobrenadantes dos <i>Lactobacillus</i>								controle 1	controle 2	controle 3
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b			
0	0,096	0,096	0,095	0,097	0,097	0,095	0,095	0,096	0,146	0,083	0,106
1	0,100	0,105	0,103	0,105	0,102	0,109	0,109	0,106	0,178	0,125	0,112
2	0,123	0,123	0,122	0,121	0,116	0,136	0,135	0,121	0,279	0,212	0,131
3	0,138	0,145	0,138	0,139	0,132	0,184	0,169	0,136	0,499	0,385	0,174
4	0,146	0,160	0,148	0,155	0,146	0,284	0,236	0,150	0,742	0,617	0,276
5	0,151	0,174	0,157	0,164	0,153	0,372	0,314	0,155	0,933	0,867	0,459
6	0,154	0,183	0,158	0,173	0,160	0,433	0,361	0,164	0,931	0,888	0,545
7	0,157	0,184	0,165	0,177	0,162	0,508	0,454	0,168	0,965	0,975	0,643
8	0,157	0,185	0,167	0,179	0,163	0,534	0,498	0,168	1,046	1,083	0,794

APÊNDICE T: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Lactobacillus plantarum* (30b) quando em contato com sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus*

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)										
	Sobrenadantes dos <i>Lactobacillus</i>							controle 1	controle 2	controle 3	
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b			
0	0,075	0,075	0,076	0,076	0,076	0,078	0,077	0,076	0,112	0,068	0,082
1	0,084	0,083	0,085	0,084	0,082	0,095	0,090	0,088	0,149	0,106	0,083
2	0,103	0,112	0,116	0,103	0,103	0,129	0,122	0,117	0,237	0,183	0,100
3	0,126	0,141	0,158	0,143	0,136	0,178	0,176	0,159	0,387	0,319	0,134
4	0,157	0,181	0,198	0,180	0,176	0,236	0,240	0,200	0,520	0,480	0,164
5	0,178	0,204	0,219	0,192	0,191	0,261	0,260	0,216	0,641	0,627	0,216
6	0,193	0,224	0,225	0,212	0,219	0,312	0,286	0,204	0,747	0,697	0,206
7	0,203	0,231	0,234	0,237	0,251	0,344	0,309	0,221	0,843	0,843	0,234
8	0,212	0,249	0,257	0,264	0,282	0,392	0,346	0,248	0,907	0,933	0,315

APÊNDICE U: Valores de densidade ótica referentes ao crescimento de *Lactobacillus plantarum* (30b) quando em contato com sobrenadantes das suspensões de células de *Lactobacillus*

Tempo (horas)	Densidade ótica (600nm)										
	Sobrenadantes dos <i>Lactobacillus</i>							controle 1	controle 2	controle 3	
	11fb	17fb	18fa	19fa	22c	30b	30c	41b			
0	0,085	0,088	0,087	0,087	0,087	0,087	0,089	0,089	0,134	0,077	0,099
1	0,110	0,110	0,105	0,101	0,105	0,111	0,112	0,110	0,174	0,113	0,112
2	0,132	0,154	0,134	0,125	0,135	0,153	0,140	0,132	0,279	0,153	0,160
3	0,162	0,214	0,198	0,192	0,200	0,243	0,223	0,217	0,428	0,304	0,250
4	0,209	0,289	0,275	0,259	0,274	0,332	0,298	0,272	0,616	0,455	0,367
5	0,190	0,317	0,312	0,290	0,298	0,375	0,322	0,268	0,735	0,589	0,458
6	0,198	0,289	0,293	0,297	0,312	0,397	0,353	0,301	0,757	0,600	0,480
7	0,178	0,279	0,290	0,321	0,338	0,449	0,407	0,328	0,790	0,689	0,542
8	0,206	0,287	0,290	0,340	0,357	0,472	0,437	0,361	0,838	0,745	0,568

