



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ALEXANDRE AMORIM MONTEIRO

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR RAPD - *RANDOM
AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*, DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU**

Londrina
2008

ALEXANDRE AMORIM MONTEIRO

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR RAPD - *RANDOM
AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*, DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Vanerli Beloti

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M775p Monteiro, Alexandre Amorim.
Padronização de metodologia para caracterização molecular por RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*, de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru / Alexandre Amorim Monteiro. – Londrina, 2008.
73f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 2. Leite – Bacteriologia – Teses. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência

ALEXANDRE AMORIM MONTEIRO

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR RAPD - *RANDOM
AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*, DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vanerli Beloti – Orientadora
Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva
Universidade Estadual de Londrina - PR

Prof. Dr. Luis Augusto Nero
Departamento de Veterinária
Universidade Federal de Viçosa - MG

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina – PR

Londrina, 27 de fevereiro de 2008

*“... aquele que começou a boa obra
é fiel e justo para completa-la...”*

Fp. 1.6.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e graça para chegar até aqui. “Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; a ele seja a glória eternamente” (Rm 11.36).

Sou grato aos meus pais, pois em todos estes anos de estudos me incentivaram e deram todo apoio. Agradeço a eles por cada palavra de ânimo, por todo tempo investido, por estarem presentes em cada momento, sendo exemplos de caráter e perseverança, e especialmente por sonharem junto comigo.

Também gostaria de agradecer a minha orientadora, Profa. Dra. Vanerli Beloti, que com otimismo acreditou no meu potencial. Obrigado por cada oportunidade e incentivo, que geraram conhecimento e crescimento.

Ao Prof. Dr. André Luiz, por não apenas abrir as portas de seu laboratório, mas por acreditar e ser um grande incentivador desta pesquisa. Muito obrigado por cada orientação e ajuda que tornaram grande parte deste trabalho possível.

A Profa. Dra. Márcia de Aguiar Ferreira Barros, por cada conselho no início do mestrado e por ser uma grande incentivadora.

A Profa. Irene Popper, pelas oportunidades e portas abertas, pela amizade e por mostrar que vale a pena sempre fazer o melhor.

A todos os colegas de turma de mestrado, em especial a Ronaldo Tamanini, parceiro de laboratório e das desafiadoras viagens a Pernambuco. Um exemplo de dedicação e trabalho, sempre disposto em fazer o melhor. Obrigado por toda ajuda e pelos divertidos churrascos e confraternizações na casa da Gracy (sua noiva).

Ao colega Marcelo T. Matsubara, por toda ajuda nas primeiras etapas experimentais deste projeto.

Quero agradecer a toda equipe do Laboratório de Inspeção Produtos de Origem Animal – LIPOA/UEL, em especial aos residentes Douglas, Ana Paula e Henrique, que com bom humor deixaram a rotina de trabalho bem mais divertida. A todos os colegas e estagiários que colaboraram com esta pesquisa.

Aos meus tios José Penha e Vera, que me receberam com tanto carinho em São Paulo durante parte do mestrado.

Aos meus tios José Julio e Maricene, por toda ajuda nos tempos de dificuldade, no período que estiveram em casa em Londrina. Obrigado pela torcida e por cada palavra de incentivo.

Ao meu irmão Fabrício e sua esposa Tais, pela amizade e por estarem sempre prontos em ajudar.

E por último, mas não menos importante, a minha noiva Demetria, que sempre esteve presente, me dando todo apoio e carinho. Obrigado pela ajuda e paciência nos momentos difíceis, sou muito grato pelo seu amor, que sempre me fortalece.

Muito obrigado a todos.

MONTEIRO, Alexandre Amorim. **Padronização de metodologia para caracterização molecular por rapd - *random amplified polymorphic dna*, de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru.** 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes e, em consequência, apresenta baixa qualidade microbiológica, constituindo um risco à saúde da população quando consumido sem tratamento térmico. Desta forma, vários grupos de microrganismos indesejáveis podem ser detectados no leite cru, gerando alterações nas mais variadas condições. Em resposta a esta situação, diferentes estratégias estão em estudo para melhoria da qualidade. Uma dessas estratégias é a bioconservação, que vem sendo cada vez mais estudada, devido seu enorme potencial de aplicação nos mais variados tipos de alimentos. As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) são microrganismos adequados para o uso como bioconservadores devido a sua reconhecida importância como microrganismos com capacidade antagonista a diversos patógenos presentes no leite. Contudo, no Brasil, os dados sobre a presença de BAL no leite cru são limitados, sendo assim necessário o estudo de metodologias que facilitem a identificação e caracterização destes microrganismos. Entretanto, entre as diferentes espécies de bactérias lácticas ocorre uma grande similaridade em relação às necessidades nutricionais e condições de crescimento, que dificulta o uso de métodos microbiológicos clássicos para identificação de gêneros e espécies. Pesquisas têm focado a aplicação de técnicas de biologia molecular para a rápida detecção e diferenciação deste grupo de bactérias. As BAL têm sua classificação baseada em propriedades fenotípicas, incluindo parâmetros fisiológicos e padrões de fermentação de açúcares. Contudo, a correta classificação e identificação das BAL são deficientes sem o suporte das técnicas genéticas. O objetivo deste trabalho foi a avaliação de um protocolo alternativo para caracterização molecular de BAL com marcadores de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), utilizando-se 265 cepas de Bactérias Ácido Lácticas, com capacidade antagonista a patógenos, isoladas de 27 amostras de leite cru, de propriedades dos municípios de São Bento do Una e Saloá, do Agreste Pernambucano. A técnica foi padronizada com sucesso e apresentou reprodutibilidade, entretanto os resultados obtidos com os dois *primers* utilizados não foram suficientes para uma boa caracterização molecular, sendo necessária a realização de novos RAPDs com diferentes marcadores, para melhor caracterização dos isolados.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas (BAL). Leite. Antagonismo. RAPD. Agreste Pernambucano.

MONTEIRO, Alexandre Amorim. **Standardization of methodology for molecular characterization by rapd - random amplified polymorphic dna of lactic acid bacterias isolated of raw milk.** 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The milk production in Brazil is usually conducted under poor hygienic conditions, resulting in low microbiological quality, therefore constituting a risk for the population when this milk is consumed without thermal treatment. In this form, some groups of microorganisms can be detected in raw milk, and in general, the microbiota that contaminates the milk has high capacity of multiplication, generating alterations in the most varied conditions. In reply to this situation, different strategies are in study for improve of the quality. One of these strategies is the bioconservation, that comes more being each studied at time, had its enormous potential of application in the most varied types of foods. The Lactic Acid Bacteria (LAB) are microorganisms adjusted for the use as bioconservadores due its recognized importance as microorganisms with antagonistic capacity the diverse pathogens present in milk. However in Brazil, the data of presence of BAL in raw milk are limited, being thus necessary the study of methodologies that facilitate to the identification and characterization of these microorganisms. Between the different species of lactic bacteria occur a great similarity in relation to the nutritional needs and conditions of growth, which it makes the use of classic microbiological methods limited for the identification when it comes to the genus level. Scientific works have focused the application of molecular biology techniques for the fast detection and differentiation of the LAB group. The LAB has its classification on phenotypic standards, including physiological parameters and standards of sugar fermentation. However, the correct classification and identification of the LAB group are deficient without the support of the genetic techniques. However, the correct classification and identification of the LAB group are deficient without the support of the genetic techniques. The aim of this work was the standardization of alternative methodology for molecular characterization by RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* , 265 isolates of lactic acid bacteria from 27 samples of raw milk, from properties of the municipalities of São Bento do Una and Saloá from the Agreste of Pernambuco. The standardized technique presented to successfully reproduce, however the results obtained with the two primers used were not enough for a good molecular characterization, therefore it will be necessary to do further RAPDs with different primers, for better characterization of isolates.

Keywords: Lactic acid bacterias (LAB). Milk. Antagonism. RAPD. Agreste of Pernambuco.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- REVISÃO DA LITERATURA

CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO LEITEIRA DO AGRESTE

PERNAMBUCANO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

- Quadro 1** – Classificação dos principais municípios produtores de leite da região Agreste de Pernambuco – 2005 19
- Quadro 2** – Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade nas regiões do Estado de Pernambuco, 2005 19
- Quadro 3** – Classificação dos principais Estados produtores de leite no Brasil – 2006 20

- ARTIGO

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR RAPD - *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*, DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU.

- Tabela 1** – Resultados de antagonismo aos patógenos *Listeria monocytogenes* (LM), *Salmonella enteritidis* (SS), *Escherichia coli* (EC), *Staphylococcus aureus* (SA), de 265 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano..... 46
- Tabela 2** – Características de crescimento em ágar sangue, de 265 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste Pernambucano 54
- Tabela 3** – Resultados da coloração de gram, de 265 culturas isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano 55
- Tabela 4** – Resultados das provas da catalase e acidez, de 265 culturas isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano 55

LISTA DE FIGURAS

- REVISÃO DA LITERATURA

CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO LEITEIRA DO AGRESTE PERNAMBUCANO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

- Figura 1** – Regiões geográficas do Estado de Pernambuco, Brasil. A: Região Metropolitana de Recife, B: Zona da Mata, C: Agreste, D: Sertão, E: São Francisco 17
- Figura 2** – Evolução da produção leiteira nos 04 Estados (BA-Bahia, PE-Pernambuco, CE-Ceará, MA-Maranhão) com maior produção na Região Nordeste do Brasil, entre 2000 e 2004 (Fonte: IBGE, 2006) 18

- ARTIGO

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR RAPD - *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*, DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU

- Figura 1** – Dendrograma formado a partir de 20 características fenotípicas, baseado no método UPGMA, de 265 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano..... 57
- Figura 2** – Foto representativa do gel RAPD-PCR do *primer* 1254, de culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano. Linhas M = marcador molecular 1kb DNA Ladder; linhas de 2 – 44, diferentes padrões de bandas mostrando alto polimorfismo 59
- Figura 3** – Foto representativa do gel RAPD-PCR do *primer* P3, de culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano. Linhas M = marcador molecular 1kb DNA Ladder; linhas de 2 – 44, diferentes padrões de bandas mostrando baixo polimorfismo 59

- Figura 4 –** Dendrograma formado dos resultados do *primer* 1254, baseado no método UPGMA, de 75 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano. Grupo 1(G1); Grupo 2 (G2); Sub-grupo 1A (SG 1A); Sub-grupo (SG 1B); Chave 1A (CH 1a); Chave 1B (CH 1b); Chave (CH 1c). C1-*Streptococcus thermophilus* (NCDO 1968), C2-*Enterococcus faecalis* (ATCC 19843), C3-*Lactobacillus casei* (CRL 705), C4-*Pediococcus pentosaceus* (BIOAGRO), C5-*Leuconostoc lactis* (ATCC 19256) e C6-*Micrococcus luteus* (ATCC 9341) 61
- Figura 5 –** Dendrograma formado dos resultados do *primer* P3, baseado no método UPGMA, de 75 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano. Grupo 2 (G2); Sub-grupo (SG 1B). C1-*Streptococcus thermophilus* (NCDO 1968), C2-*Enterococcus faecalis* (ATCC 19843), C3-*Lactobacillus casei* (CRL 705), C4-*Pediococcus pentosaceus* (BIOAGRO), C5-*Leuconostoc lactis* (ATCC 19256) e C6- *Micrococcus luteus* (ATCC 9341)..... 63
- Figura 6 –** Dendrograma formado dos resultados do *primer* 1254 e P3 juntos, baseado no método UPGMA, de 75 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano. Grupo 1(G1); Grupo 2 (G2); Sub-grupo 1A (SG 1A); Sub-grupo (SG 1B). C1-*Streptococcus thermophilus* (NCDO 1968), C2- *Enterococcus faecalis* (ATCC 19843), C3-*Lactobacillus casei* (CRL 705), C4-*Pediococcus pentosaceus* (BIOAGRO), C5-*Leuconostoc lactis* (ATCC 19256) e C6-*Micrococcus luteus* (ATCC 9341) 65

SUMÁRIO

REVISÃO DA LITERATURA – CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO LEITEIRA DO AGRESTE PERNAMBUCANO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Produção leiteira do Agreste Pernambucano	17
1.2 Qualidade microbiológica do leite.....	21
1.3 Bactérias Ácido Láticas (BAL)	22
1.3.1 Aplicação de BAL em alimentos e segurança alimentar.....	22
1.3.2 Características Bioquímicas	23
1.3.3 Identificação Fenotípica.....	25
1.3.4 Identificação Molecular	26
1.5 RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA.....	27
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVO.....	32
4 REFERÊNCIAS	33

ARTIGO – PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR RAPD - RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA, DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU	38
RESUMO.....	39
ABSTRACT	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Seleção e Preparação das amostras	43
2.2 Avaliação Fenotípica	44
2.2.1 Crescimento em Ágar Sangue	44
2.2.2 Coloração de Gram	45
2.2.3 Prova da Catalase	45
2.2.4 Prova da Acidez	45
2.3 Agrupamento Fenotípico	46

2.4 Avaliação Molecular	46
2.4.1 Extração de DNA.....	47
2.4.2 Quantificação de DNA.....	47
2.4.3 RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA.....	48
2.5 Agrupamento Genético.....	49
3 RESULTADOS	50
3.1 Análises fenotípicas	50
3.2 Análise Molecular	54
4 DISCUSSÃO	62
5 CONCLUSÃO.....	65
6 AGRADECIMENTO.....	66
7 REFERÊNCIAS.....	67
8 APÊNDICE	70
8.1 Perspectivas.....	70
8.1.2 Reação de seqüenciamento do fragmento amplificado.....	71
8.1.3 Bioinformática para a avaliação dos resultados	71
8.1.4 Referências	72
8.3 Protocolo utilizado para extração de DNA.....	73

REVISÃO DA LITERATURA

**CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO LEITEIRA DO AGRESTE
PERNAMBUCANO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.**

RESUMO

CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO LEITEIRA DO AGRESTE PERNAMBUCANO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.

O Agreste de Pernambuco é a região intermediária entre a Zona da Mata e o Sertão, e é caracterizado por uma economia diversificada. Dados recentes revelam que nos últimos anos a produção leiteira dessa região cresceu 23%, representando 73% da produção leiteira do Estado de Pernambuco. No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes e, em consequência, apresenta baixa qualidade microbiológica, constituindo um risco à saúde da população quando consumido sem tratamento térmico, situação comum na região Nordeste. Vários grupos de microrganismos podem ser detectados no leite cru e, de forma geral, sua microbiota contaminante tem alta capacidade de multiplicação, gerando alterações nas mais variadas condições. Quando se produz leite com boas práticas de higiene, a contagem de bactérias diminui. No entanto, os patógenos começam a aparecer, devido a uma diminuição da microbiota competidora. Atualmente, as Bactérias Ácido Lácticas (BAL) vêm assumindo grande importância na indústria de alimentos e em saúde pública por serem produtoras de substâncias com conhecido potencial inibitório a microrganismos deteriorantes ou patogênicos. Essa atividade ocorre devido ao crescimento competitivo com outros microrganismos nos alimentos, potencializado pelos efeitos inibitórios de seus metabólitos. O leite cru constitui boa fonte de BAL passíveis de serem utilizadas pela indústria laticinista, especialmente pelo fato de estarem adaptadas às condições do clima e da matéria-prima, sendo ainda necessários maiores estudos sobre suas características individuais e específicas. Entre as diferentes espécies de bactérias lácticas ocorre uma grande similaridade em relação às necessidades nutricionais e condições de crescimento, a qual dificulta o uso de métodos microbiológicos clássicos para identificação destes a nível de gênero. Pesquisas têm focado a aplicação de técnicas de biologia molecular para a rápida detecção e diferenciação das BAL. As BAL têm sua classificação baseada em propriedades fenotípicas, incluindo parâmetros fisiológicos e padrões de fermentação de açúcares. Contudo, a correta classificação e identificação das BAL são deficientes sem o suporte das técnicas genéticas. O conhecimento de quais gêneros e espécies possuem capacidade antagonista a microrganismos patogênicos é de grande interesse, podendo gerar estudos de preservação e segurança baseados na reposição destes microrganismos como agentes protetores.

PALAVRAS-CHAVES: Bactérias Ácido Lácticas (BAL), leite, antagonismo, Agreste Pernambucano.

ABSTRACT

CHARACTERISTICS OF THE MILK PRODUCTION OF THE AGRESTE OF PERNAMBUCO AND THE CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIAS.

The Agreste of Pernambuco is an intermediate region between the Zona da Mata and Sertão, and is characterized by a diversified economy. Recent data's show that in the last years the milk production of this region increased 23%; it represented 73% of the Pernambuco state production. Milk production in Brazil is usually conducted under poor hygienic conditions, resulting in milk with low microbiologic quality, thus constituting a risk for the population when this milk is consumed without thermal treatment, a common situation in the Northeast region. Some groups of microorganisms can be detected in raw milk, and in general, the microbiota that contaminates the milk, has high capacity of multiplication, generating alterations in the most varied conditions. When the milk is produced with good hygienic practical, the bacterial count is reduced. However, the pathogenic microorganisms start to appear, due to the reduction of the native microbiota that contaminates the milk. The Lactic Acid Bacterias (LAB) are assuming great importance in the food industry and in public health because they are producing substances with known inhibitory potential of deteriorating or pathogenic microorganisms. This activity occurs due to the competitive growth with other microorganisms in foods, potentized for the inhibit effect of metabolites produced. Raw milk constitutes good source of LAB to be used for the dairy industry, especially because they are adapted to the climatic conditions and for the raw material, being still necessary greater studies about individual and specific characteristics. Between the different species of lactic bacterias occur a great similarity in relation to the nutritional needs and conditions of growth, which it makes the use of classic microbiological methods limited for the identification when it comes to the genus level. Scientific works have focused the application of molecular biology techniques for the fast detection and differentiation of the LAB group. The LAB has its classification on phenotypic standards, including physiological parameters and standards of sugar fermentation. However, the correct classification and identification of the LAB group are deficient without the support of the genetic techniques. The knowledge of which genus and species possess antagonistic capacity to pathogenic microorganisms is of great interest, being able to generate studies of preservation and security based in the replacement of these microorganisms as protective agents.

KEYWORDS: Lactic Acid Bacterias (LAB), milk, antagonism, RAPD, Agreste of Pernambuco.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção leiteira do Agreste Pernambucano

O Agreste de Pernambuco é a região intermediária entre a Zona da Mata e o Sertão (figura 1) e é caracterizada por uma economia diversificada, com o cultivo de lavouras como milho, feijão e mandioca (entre outras), além da pecuária de leite e de corte.



Figura 1. Regiões geográficas do Estado de Pernambuco, Brasil. A: Região Metropolitana de Recife, B: Zona da Mata, C: Agreste, D: Sertão, E: São Francisco.

Entre 2000 e 2004 a produção leiteira do Estado de Pernambuco apresentou crescimento (figura 2). Dados mostram que em 2004 o Estado produziu 398 milhões de litros de leite, o que representou 14,7% da produção da Região Nordeste e 1,7% da produção Nacional. Dados recentes revelam que nos últimos anos a produção leiteira do Agreste pernambucano cresceu 23%, com uma produção de 393 milhões de litros em 2005, o que representou 74,79 % da produção do Estado (CONAB,

2004; EMBRAPA, 2006; FIGUEIROA, 2006). Em 2006 o Estado de Pernambuco produziu 630 milhões de litros, apresentando um crescimento de 19,7% em relação aos dados de 2005 (Quadros 1 e 2). Pernambuco já ocupa a 10ª posição no “ranking” nacional e é o 2º maior produtor da região Nordeste, ficando atrás da Bahia (CONAB, 2004; IBGE, 2006).

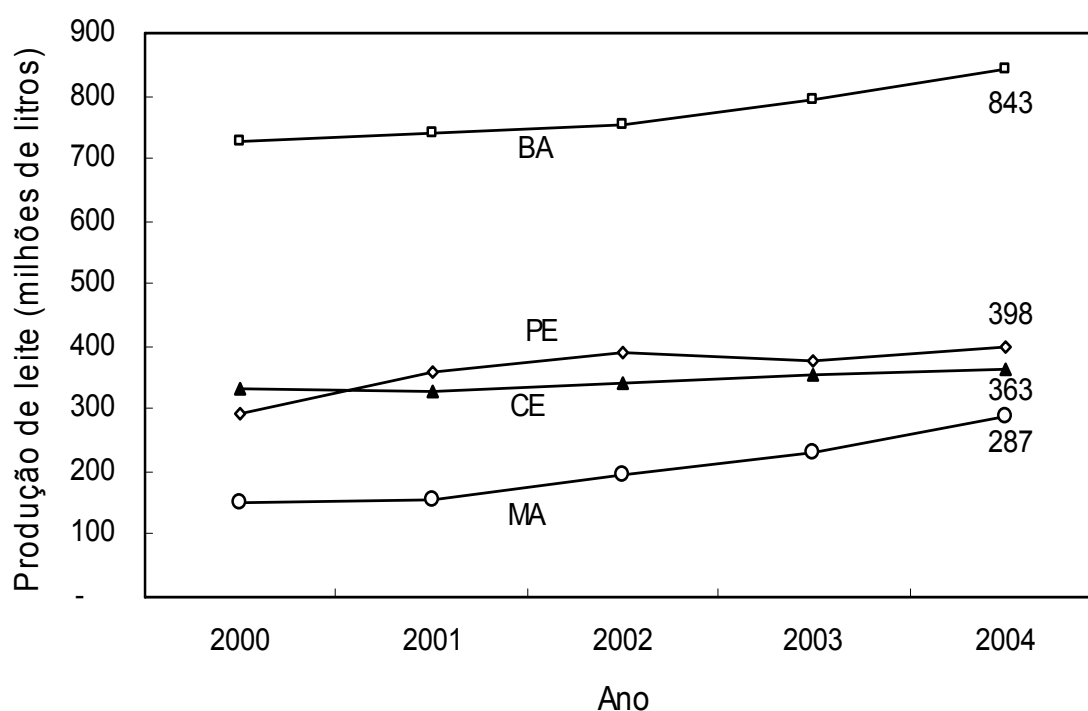


Figura 2. Evolução da produção leiteira nos 04 Estados (BA-Bahia, PE-Pernambuco, CE-Ceará, MA-Maranhão) com maior produção na Região Nordeste do Brasil, entre 2000 e 2004 (Fonte: IBGE, 2006)

Atualmente em Pernambuco, cerca de 14 mil pequenos e médios produtores estão na atividade leiteira, concentrados principalmente na região do Agreste, e geram uma produção diária de 980 mil litros (SPRRA, 2006). O município de São Bento do Una é o maior produtor, seguido por Pedra e Itaíba (Quadros 2 e 3).

Quadro 1: Classificação dos principais Estados produtores de leite no Brasil, 2006.

Estado	Produção de leite (milhões de litros)	%
1. Minas Gerais	7.094,1	27,93
2. Paraná	2.703,6	10,64
3. Rio G. do Sul	2.625,1	10,34
4. Goiás	2.613,6	10,29
5. São Paulo	1.744,0	6,87
6. Santa Catarina	1.709,8	6,73
7. Bahia	905,8	3,57
8. Pará	691,1	2,72
9. Rondônia	637,4	2,51
10. Pernambuco	630,3	2,48
Outros	4.043,4	15,92
Total	25.398,2	100,00

Fonte: IBGE 2008

Quadro 2: Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade nas regiões do Estado de Pernambuco, 2005.

Região	Produção (mil litros)	Percentual do total	Vacas ordenhadas (mil cabeças)	Produtividade (litros/vaca/ano)
1. Agreste	393.778	74,79	240.528	1.637
2. Sertão	84.709	16,09	106.648	794
3. Zona da Mata	22.644	4,30	20.481	1.105
4. São Francisco	19.741	3,75	30.775	641
5. Metrop. de Recife	5.644	1,07	7.883	715
Total	526.516	100,00	406.315	1.295

Fonte: Embrapa 2008

A cadeia produtiva do leite dessa região foi impulsionada pelo Programa Social Leite de Pernambuco. Criado no final do ano 2000, esse programa é resultado da parceria entre o Governo do Estado de Pernambuco e o Governo Federal, através do programa Fome Zero, com o objetivo de fornecer leite a famílias

carentes, especialmente crianças, gestantes e lactantes. O programa distribui diariamente um litro de leite para mais de 80 mil famílias carentes de 147 cidades pernambucanas (SPRRA, 2006).

Quadro 3: Classificação dos principais municípios produtores de leite da região Agreste de Pernambuco, 2005.

Municípios	Produção de leite (mil litros)	Percentual do total
1. São Bento do Una	43.800	11,12
2. Pedra	38.880	9,87
3. Itaíba	37.026	9,40
4. Buíque	32.130	8,16
5. Pesqueira	21.050	5,35
6. Cachoeirinha	17.280	4,90
7. Águas Belas	14.623	3,71
8. Bom Conselho	14.399	3,66
9. Venturosa	12.528	3,18
10. Sanharó	12.045	3,06
11. Garanhuns	10.905	2,77
40. Saloá	1.519	0,39
Total	393.778	100,00

Fonte: Embrapa 2008

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes e, em consequência, apresenta baixa qualidade microbiológica, constituindo um risco à saúde da população quando consumido sem tratamento térmico, situação comum na região Nordeste (MARTINS, ALBUQUERQUE, 1999; CATÃO; CABALLOS, 2001; PADILHA et al., 2001). A baixa qualidade do produto pode ser atribuída a deficiências no manejo e higiene de ordenha, manutenção e desinfecção inadequada dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou inexistente e mão de obra desqualificada (NELSON, 1992). Assim, cuidados higiênicos para evitar a contaminação do leite devem ser tomados desde a ordenha até o produto final

(CATÃO; CABALLOS, 2001; SANTANA et al., 2004), por sistemas de controle da qualidade, como as Boas Práticas de Produção e Fabricação.

Outra característica bastante marcante da produção leiteira no Brasil é o predomínio de pequenas e médias propriedades com características de agricultura familiar, onde geralmente essa atividade é a principal fonte de renda. A falta de informação, assistência e investimentos na produção leiteira geram baixas produtividade e qualidade do produto. Pode-se observar que propriedades com maior produção leiteira frequentemente produzem leite de melhor qualidade, quando comparadas àquelas com menor produção (TKAEZ et al., 2004).

Há diferenças de qualidade no leite produzido nos diversos Estados Brasileiros, que podem ser atribuídas às condições encontradas em cada região, como perfil do produtor, maior acesso à assistência técnica, presença de órgãos extensionistas e programas regionais de controle sanitário de rebanhos e principalmente laticínios com políticas de pagamento por qualidade (NERO, 2005).

1.2. Qualidade microbiológica do leite

O leite cru produzido no Brasil possui baixa qualidade microbiológica, como já foi observado em várias regiões do país (BELMONTE; LAGO, 2004; PONSANO et al., 2004; BUENO et al., 2002; FRANCO et al., 2000; LOURENÇO; SILVA, 2000; BELOTI et al., 1999). Vários grupos de microrganismos podem ser detectados no leite cru e, de forma geral sua microbiota contaminante tem alta capacidade de multiplicação, gerando alterações nas mais variadas condições de temperatura e armazenamento.

A baixa freqüência no isolamento de patógenos em alimentos, principalmente os de origem animal, verificada em alguns países (JAY, 1995; KOZAC et al., 1996; CORDANO; ROCOUT, 2001; FRANCO et al., 2003), pode ser explicada principalmente devido à presença natural de uma microbiota com grande potencial inibitório. Essas pesquisas relatam qualidade microbiológica ruim, mas com baixa incidência de patógenos. Entretanto, quando se verifica uma melhoria da qualidade microbiológica, com conseqüente redução de aeróbios mesófilos, a incidência de patógenos tende a ser maior (JAY, 1995; GAYA et al., 1998; DE BUYSER et al., 2001; GUERRA, MCLAUCHLIN; BERNARDO, 2001; LECLERC et al., 2002).

1.3. Bactérias Ácido Láticas (BAL)

1.3.1. Aplicação de BAL em alimentos e segurança alimentar

A cada dia aumenta a procura por alimentos naturais, que não tenham sido submetidos a nenhum tipo de processamento industrial ou que sejam minimamente processados, e que não sejam adicionados de produtos químicos. Muitos consumidores consideram que esses procedimentos interferem na qualidade nutricional dos alimentos, além de acreditar que os conservadores químicos são perigosos para a saúde, até mais perigosos que os próprios microrganismos que esses produtos pretendem controlar (MURIANA, 1996).

Com isso aumenta também a preocupação dos fabricantes em produzir alimentos que não necessitem desses procedimentos para que sejam saudáveis e para que atendam os parâmetros de qualidade e segurança exigidos pelos consumidores. Uma dessas estratégias é explorar a capacidade dos microrganismos inócuos, naturalmente presentes nos alimentos ou artificialmente adicionados, de

inibir microrganismos que sejam indesejáveis: deteriorantes ou patógenos. Esse processo denomina-se bioconservação, e vem sendo cada vez mais estudado devido seu enorme potencial de aplicação nos mais variados tipos de alimentos (DE MARTINS; ALVES; FRANCO, 2003).

As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) são microrganismos adequados para o uso como bioconservadores devido as suas características antagonistas a patógenos e sua grande tradição de uso em alimentos fermentados (DE MARTINS; ALVES; FRANCO, 2002). Atualmente, as BAL vêm assumindo grande importância na indústria de alimentos e em saúde pública por serem produtoras de substâncias com conhecido potencial inibitório a microrganismos deteriorantes ou patogênicos. Essa atividade ocorre devido ao crescimento competitivo com outros microrganismos nos alimentos, potencializado pelos efeitos inibitórios de seus metabólitos (STILES, 1994; ADAMS; MITCHELL, 2002; CARR; CHILL; MAIDA, 2002; DE MARTINS; ALVES; FRANCO, 2003).

1.3.2. Características Bioquímicas

Os principais metabólitos desse grupo são os ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, estes geram no alimento uma acidez que usualmente não é favorável à multiplicação e sobrevivência de bactérias Gram-positivas e negativas, além de fungos e leveduras (ROSS; MORGAN; HILL, 2002).

As BAL produzem ainda uma série de outras substâncias com potencial antimicrobiano amplamente descrito, como o peróxido de hidrogênio, o diacetil e as bacteriocinas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; DE MARTINS; ALVES; FRANCO, 2003). As bacteriocinas, em especial, são proteínas biologicamente ativas e

caracterizadas por possuírem atividade contra um grupo específico de microrganismos sensíveis (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As BAL são microrganismos associados a vários habitat, principalmente àqueles que são ricos em nutrientes, como os substratos de alimentos e plantas. São bactérias de maior representação dos probióticos, tanto em alimentos como no mercado farmacêutico (HOZAPEL; SCHILLINGER, 2002).

Uma parcela significativa da microbiota do leite cru provavelmente é constituída por bactérias ácido lácticas, que possuem um grande potencial inibitório em relação à patógenos (NERO, 2005). Em amostras de leite cru, já foi verificada uma microbiota natural com grande potencial antagonista em relação aos patógenos, composta essencialmente por microrganismos pertencentes ao grupo das BAL. As BAL são aplicadas em produtos cárneos como culturas iniciadoras, tendo como finalidade reduzir o pH no início da fermentação a fim de melhorar as propriedades sensoriais, reduzir o tempo de maturação e reduzir a adição de nitratos e nitritos (BALDUÍNO; OLIVEIRA; HAULY, 1999). Essas aplicações mostram a importância das BAL no controle de microrganismos indesejáveis em alimentos. O leite cru constitui boa fonte de BAL passíveis de serem utilizadas pela indústria de alimentos, especialmente pelo fato de estarem adaptadas às condições do clima e da matéria-prima, sendo ainda necessários maiores estudos sobre suas características individuais e específicas (ALEXANDRE et al., 2002)

As BAL podem ainda melhorar o aroma e textura de alimento e inibir o desenvolvimento de bactérias indesejadas. Contudo, nem todas as BAL são aproveitadas. Parte delas são envolvidas com a deterioração dos alimentos e podem até ser patogênicas. Portanto, é necessário estabelecer um sistema de classificação

detalhada para BAL e desenvolver um confiável e rápido método de classificação (SCHLEIFER et al., 1995).

1.3.3. Identificação Fenotípica

As Bactérias Ácido Láticas (BAL) compreendem um amplo grupo de microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos. Geralmente são catalase negativos. Ocorrem na forma de cocos, cocobacilos e bacilos. Fermentam a lactose, que pode ser degradada a ácido láctico (homofermentativos) ou a ácido láctico e mais alguns produtos, como acetato, etanol, dióxido de carbono, formato ou succinato (heterofermentativos) (SCHLEIFER et al., 1995).

Os gêneros mais importantes das BAL são *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Espécies desses gêneros podem ser encontradas no trato gastro-intestinal (TGI) de homens e animais e também em alimentos fermentados. Cepas usadas como probióticos geralmente pertencem à espécie e gênero *Lactobacillus* e *Enterococcus* (SCHEIFER, et al., 1995). Essas BAL são semelhantes química e organicamente e fermentam carboidratos, tendo ácido láctico como produto final. Algumas de suas características fisiológicas são de interesse para suas funções probióticas, uma pré-condição é a de sobreviver no TGI. Isto é baseado na sua temperatura de crescimento e a resistência a baixo pH e/ou a bile (FULLER et al., 1989). Essas habilidades são, entretanto, características de uma minoria das espécies de BAL.

Entre as diferentes espécies de bactérias ácido lácticas ocorre uma grande similaridade em relação às necessidades nutricionais e condições de crescimento, o que dificulta o uso de métodos microbiológicos clássicos para identificação destes em nível de gênero. Pesquisas têm focado a aplicação de técnicas de biologia molecular para a rápida detecção e diferenciação das BAL (DUBERNET; DESMASURES; GUÉGUEN, 2002). Tradicionalmente, as BAL têm sua classificação baseada em propriedades fenotípicas, incluindo parâmetros fisiológicos e padrões de fermentação de açúcares. Contudo, a correta classificação e identificação das BAL são deficientes sem o suporte das técnicas genéticas.

1.3.4. Identificação Molecular

Sofisticados métodos genéticos baseados em biologia molecular estão sendo utilizados para melhor identificação e classificação de bactérias. Técnicas moleculares são ferramentas que auxiliam na classificação taxonômica e na avaliação de bactérias envolvidas na fabricação de alimentos, através da análise da diversidade de moléculas de DNA, RNA e/ou proteínas (ROSSETTI; GIRAFFA, 2005).

No entanto, os objetivos das análises microbiológicas baseadas em ferramentas de biologia molecular, para controle da qualidade de alimentos, monitoramentos e a taxonomia de microrganismos de interesse, são dependentes da sensibilidade das técnicas utilizadas. O uso dessas ferramentas permite a diferenciação de isolados em gênero, espécie e até subespécies. Geralmente mais de um método é necessário para se obter tanto a identificação como a classificação de isolados desconhecidos.

1.5. RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

O desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase, PCR - Polymerase Chain Reaction (MULLIS; FALOONA, 1987), possibilitou o surgimento de novos marcadores moleculares. Dentre estes, destaca-se os marcadores RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA (WILLIAMS et al., 1990) , que é um método sensível, rápido, relativamente simples e que revela vários locos dispersos pelo genoma sem exigir conhecimento prévio da informação genética de seqüências-alvo, como no caso dos marcadores microssatélites, que também são derivados da PCR. Essa técnica não requer sistema especial para a revelação do polimorfismo, tal como a hibridização por sondas (WILLIAMS; RAFALSKI; TINGEY, 1993; LOPES et al., 2002).

O polimorfismo dos marcadores RAPD é revelado pela amplificação de locos cromossômicos usando-se iniciadores (*primers*) compostos de seqüências curtas e aleatórias de oligonucleotídeos. Na reação de amplificação, estes *primers* quando submetidos a condições apropriadas de temperatura, se hibridizam com seqüências genômicas que lhes são complementares. Para que ocorra amplificação, há necessidade que existam no genoma dois sítios complementares ao primer, localizados em direções opostas e distantes entre si, no máximo, 3.000 pb. Como a seqüência de cada iniciador é determinada de modo aleatório, este pode encontrar várias regiões complementares à sua seqüência e, por isso, revelar vários locos característicos para um determinado genoma. Os fragmentos amplificados, por sua vez, são separados em um gel de poliacrilaminada ou agarose, e visualizados após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo (EtBr) sob luz UV (LOPES et al., 2002).

O polimorfismo detectado por marcadores RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos (inserções ou deleções) entre os dois sítios, ou no próprio sítio de hibridização dos dois *primers*. Diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) podem ser suficientes para inibir a amplificação. Em diferentes espécies, dados experimentais evidenciam que locos RAPD estão dispersos no genoma. As seqüências internas dos segmentos amplificados abrangem desde cópia única até altamente repetitivas (WILLIAMS; RAFALSKI; TINGEY, 1993).

A baixa reprodutibilidade dos marcadores RAPD é uma questão bastante discutida. Na verdade, a técnica requer certa experiência com procedimentos moleculares, cuidado com o preparo das reações, e rigor na leitura e análise dos fragmentos visualizados no gel. A quantidade e qualidade do DNA, a concentração de íons magnésio e da enzima DNA polimerase são alguns dos aspectos que devem ser considerados nos ensaios de RAPD. Deve-se dar preferência a protocolos de extração de DNA que sejam simples e rápidos, como os que usam tampão CTAB ou SDS (CRESTE; TULMANN NETO; FIGUEIRA, 2001). Porém, é importante que o DNA não esteja contaminado pela presença de RNA, proteínas, polissacarídeos e compostos fenólicos, pois estas substâncias podem diminuir ou até inibir a atividade da DNA polimerase, proporcionando falsos polimorfismos.

A quantificação do DNA genômico pode ser feita por comparação da intensidade de fluorescência de amostras de concentração conhecida de DNA visualizada em gel de agarose corado com EtBr. Outra alternativa é a espectrofotometria ou fluorimetria. Embora a leitura nestes aparelhos seja mais rápida e prática, moléculas degradadas de DNA também são quantificadas por espectrofotometria. Portanto, a quantificação baseada em gel é mais recomendável.

Atualmente, há fluorímetros que realizam leituras de ótima qualidade, não incorporando nucleotídeos livres e moléculas de fita simples à leitura (FERREIRA; GATTAPAGLIA, 1996).

Em geral, DNA em excesso na reação de PCR resulta na falha completa da reação, ou em perfis eletroforéticos com arraste. Por outro lado, a baixa concentração leva a padrões de amplificação com baixa ou nenhuma reprodutibilidade. Em organismos eucarióticos, as concentrações usuais variam de 5 a 30 ng de DNA por reação. Em organismos procarióticos, há relatos da utilização de concentrações que variam de 5 a 200 ng de DNA. Contudo, 1 ng de DNA tem sido utilizado para insetos de pequeno porte com bons resultados no que diz respeito à reprodutibilidade (LOPES et al., 2002).

A quantidade de íons magnésio influencia diretamente na reprodutibilidade dos experimentos de RAPD, pois interfere na atividade da DNA polimerase, e conseqüentemente, na intensidade das bandas visualizadas no gel. Geralmente, a concentração final de $MgCl_2$ varia entre 1,5 a 4,0 mM. A quantidade ótima de DNA polimerase é de 1 a 2 unidades internacionais por reação de volume final de 10 até 30 μ l. Concentrações acima de 2U podem resultar em amplificação não-específica (CRESTE; TULMANN NETO; FIGUEIRA, 2001).

Os *primers* usados nos experimentos de RAPD são compostos de 10 bases de seqüências arbitrárias, com no mínimo de 50% de conteúdo GC. Podem ser sintetizados no próprio laboratório ou, mais comumente, adquiridos comercialmente. Para maximizar o número de locos polimórficos amplificados por primer, recomenda-se testar, inicialmente, um grande número de iniciadores e uma pequena amostra do conjunto total de indivíduos. Os oligonucleotídeos mais informativos são então

selecionados visando proceder às análises do material genético (indivíduos, populações, acessos, isolados), reduzindo-se o tempo e custo destas análises (KLEIN et al., 1998).

Entre as técnicas baseadas em PCR, tem se reconhecido o uso do método RAPD-PCR, como uma técnica que pode ser rápida e eficiente para a diferenciação intra e inter-específica da maioria das espécies de bactérias associadas aos alimentos. Um grande número de estudos tem relatado o sucesso no uso da RAPD-PCR para a diferenciação de cepas de BAL, principalmente em pesquisas que trabalham com gêneros e espécies conhecidas (KLEIN et al., 1998; GIRAFFA et al., 2004; LOMBARDI et al., 2004; BARUZZI et al., 2006).

2. JUSTIFICATIVA

As BAL têm reconhecida importância como microrganismos com capacidade antagonista a diversos patógenos presente no leite. Contudo no Brasil, os dados sobre a presença de Bactérias Ácido Láticas no leite cru são limitados, sendo assim necessário o estudo de metodologias que facilitem a identificação e caracterização destes microrganismos, principalmente daqueles que apresentam capacidade antagonista.

Um grande número de estudos tem relatado o sucesso no uso da RAPD-PCR para a diferenciação de cepas de BAL, principalmente em pesquisas que trabalham com gêneros e espécies conhecidas (GIRAFFA et al., 2004; LOMBARDI et al., 2004; BARUZZI et al., 2006). Contudo, a utilização desta metodologia na identificação de cepas selvagens carece de maiores estudos.

O conhecimento de quais gêneros e espécies possuem capacidade antagonista a microrganismos patogênicos é de grande interesse, podendo gerar estudos de preservação e segurança baseados na reposição ou introdução destes microrganismos como agentes protetores, como ocorre em outros tipos de alimentos (BALDUÍNO; OLIVEIRA; HAULY, 1999; HOZAPEL; SCHILLINGER, 2002; DE MARTINS; ALVES; FRANCO, 2002).

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi a avaliação de protocolo alternativo para caracterização molecular de BAL com marcadores de RAPD, utilizando-se 265 cepas de Bactérias Ácido Lácticas, com capacidade antagonista, isoladas de 27 amostras de leite cru, de propriedades dos municípios de São Bento do Una e Saloá, do Agreste Pernambucano.

4. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.; MITCHELL, R. Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v.79, n. 1-2, p.75-83, nov. 2002.
- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, SANTOS, W. M. L. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.4, p.424-428, ago. 2002.
- BARUZZI, F.; MATARANTE, A.; CAPUTO, L.; MOREA M. Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. **Meat Science**, [S.l.], v.2, n.2, p.261-269, fev. 2006.
- BELMONTE, E. A.; LAGO, N. C. M. R. Pesquisa de microrganismos indicadores em leite pasteurizado integral comercializado nas cidades de Ribeirão Preto e Sertãozinho, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: [s.n.], 2004. CDROM
- BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; SOUZA, J. A.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; BALARIN, O.; CURIKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procopio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. **Semina - Ciências Agrárias**, Londrina, v.20, n.1, p.12-15, jan./mar. 1999.
- BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; MANSUR, J. R. G.; NEVES, R. B.S. Parameters of microbiological quality of raw milk and water in dairy farms in Goiás state - Brazil. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2, 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: [s.n.], 2002. CDROM
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, [S.l.], v.28, n.4, p.281-370, dec. 2002.
- CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E.Coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.3, p.281-287, set./dez. 2001.
- CONAB - CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura Regional Pernambuco. 2004**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/sureg/PE/conjuntura01.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2006.
- CORDANO, A. M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v.70, n. 1-2, p.175-178, out. 2001.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.V.O. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, [S.l.], v.19, n. 4, 299-306, dez. 2001.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v.67, n. 1-2, p.1-17, jul. 2001.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, [S.l.], v.18, n. 2-3, p.191-208, jan. 2002.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, [S.l.], n.29, p.114-119, nov./dez. 2003.

DUBERNET S.; DESMASURES N.; GUÉGUEN M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. **FEMS Microbiology Letters**, [S.l.], v.214, n.2, p.271-275, set. 2002.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Agropecuária**. Disponível em <<http://www.cnpqg.embrapa.br>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1996.

FIGUEIROA, J. G. **O sinal verde para a reestruturação da agroindústria do leite no Agreste**. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigos.php?id=240>>. Acesso em: 18 fev. 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; GELLI, D. Foodborne diseases in Southern South América. In: MILIOTIS, M.; BIER, J. **International Handbook of Foodborne Pathogens**, 1th ed., New York: CRC, 2003. p.733-743.

FRANCO, R.M. et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.14, n.68/69, p.70-77, 2000.

FULLER, R. A Review. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, [S.l.], n. 66, p.365-378, 1989.

GAYA, P.; SANCHEZ, J.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. **Food Microbiology**, [S.l.], v.15, n. 5, p.551- 555, 1998.

GIRAFFA G.; ANDRIGHETTO, C.; ANTONELLO, C.; GATTI, M.; LAZZI, C.; MARCAZZAN, G.; LOMBARDI, A.; NEVIANI, E. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* strains of dairy origin **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v.91, n.2, p.129-139, mar. 2004.

GUERRA, M. M.; MCLAUCHLIN, J.; BERNARDO, F. A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microbiology**, [S.l.], v.18, n.4, p.423-429, ago. 2001.

HOZAPEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introducion to pre- and probiotics. **Food research international**, [S.l.], v.35, n.2-3, p.109-116, 2002.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação de dados automática: SIDRA**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2006.

JAY, J. M. Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods OR, why did human listeriosis and hemorrhagic colitis become foodborne diseases? **Dairy, Food Environmental Sanitation**, [S.l.], v.15, p.674-677, 1995.

JAY, J. M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. New York: Springer, 2005.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bactéria. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 41, n.2, p.103-125, maio 1998.

KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in food: Incidence in dairy products. **Food Control**, [S.l.], v,7, p.215-221, 1996.

LECLERC, V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; BUYSER, M-L.; GNANOUBESSE, N.; LAHELLEC, C. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. **Livestock and Production Science**, [S.l.], v.76, p.195-202, 2002.

LOMBARDI, A.; GATTI, M.; RIZZOTTI, L.; TORRIANI, S.; ANDRIGHETTO C.; GIRAFFA, G. Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses **International Dairy Journal**, [S.l.], v.14, n.11, p.967-976, nov. 2004.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. O.; CAMARGO L.E. A.; FUNGARO M.H.P. Marcadores Moleculares Dominantes , (RAPD e ALFP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, [S.l.], n. 29, 2002. Disponível em: < <http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acesso em: 11 nov. 2007.

LOURENÇO, L. F. H.; SILVA, M. S. S. Análises físico-química e microbiológica como indicadores da qualidade do leite cru comercializado no município de Castanhal/Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. **Anais...**, Fortaleza: [s.n], 2000. p.52-53.

MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. Qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Fortaleza. Bactérias multiresistentes a antibióticos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.59, p.39-42, jan./fev. 1999.

MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods of Enzymology**, [S.l.], n.55, p.335-350, 1987.

MURIANA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria spp.* in food. **Journal of Food Protection**, [S.l.], n.59: 54-63, 1996.

NELSON, J. H. An overview of good manufacturing practice-1. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, v.276, p.10-11, 1992.

NERO, L.A. ***Listeria monocitogenes e Salmonella spp.* Em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras do Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.** 2005. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F.; LEAL, T. C. A.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.34, n.2, p.167-171, mar./abr. 2001.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; POLÔNIO, A. L. C.; HONAGA, M. Y. Adequação do leite produzido na região de Araçatuba aos padrões preconizados pela IN51 - MARA. Parte 2: leite individual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: [s.n.], 2004. CDROM

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v.79, p.3-16, 2002.

ROSSETTI, L.; GIRAFFA, G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v.63, p.135-144, nov. 2005

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA, M. A.; MORAES, L. B.; PEREIRA, M. S.; GUSMÃO, V. V. Milk contamination in different points of the dairy process. II - Psychrotrophs and proteolytic microorganisms. **Semina-Ciências Agrárias**, Londrina, v.25, n.4, p.349-358, 2004.

SCHLEIFER, K.H.; EHEMANN, M.; BEIMFOHR, C.; BROCKMANN, E.; LUDWIG, W.; AMANN, R. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. **Dairy Journal**, [S.l.], n.5, p.1081-1094, 1995.

SPRRA. SECRETARIA DE PRODUÇÃO RURAL E REFORMA AGRÁRIA. **Programa leite de Pernambuco.** Disponível em: <http://www.producaorural.pe.gov.br/leite/o_programa.htm>. Acesso em: 11 mar. 2006.

STILES, M. E. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v.77, p.2718-2724, 1994.

TORRES, B. B.; OLIVEIRA, DÉBORA R.; TOMOTANI, E. J.; ABDULKADER F.R.M.; SANTOS, F.S.; BRITO, G.C.; TAMBOR, J. H. M.; GEORG, R.C.; MONTOR W. R.; NEVES, L. C. M. **DNA – Técnicas e Aplicações**. São Paulo, 2002. Disponível em:<<http://www.iq.usp.br/disciplinas/dbq/dnata/apostila/>>. Acesso em: 08 ago. 2007.

TKAEZ, M.; PEDRASSANI, D.; FEDALTO, L. M.; THIEM, E. M. B. Níveis microbiológicos e físico-químicos do leite in natura de produtores do estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: [s.n.], 2004. CDROM

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], n.18, p.6531- 6535, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods of Enzymology**, [S.l.], n. 218, p.704-740, 1993.

- ARTIGO

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
POR RAPD - *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*, DE BACTÉRIAS
ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU.**

RESUMO

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR RAPD - *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*, DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU.

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes e, em consequência, apresenta baixa qualidade microbiológica, constituindo um risco à saúde da população quando consumido sem tratamento térmico. Desta forma, vários grupos de microrganismos indesejáveis podem ser detectados no leite cru, gerando alterações nas mais variadas condições. Em resposta a esta situação, diferentes estratégias estão em estudo para melhoria da qualidade. Uma dessas estratégias é a bioconservação, que vem sendo cada vez mais estudada, devido seu enorme potencial de aplicação nos mais variados tipos de alimentos. As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) são microrganismos adequados para o uso como bioconservadores devido a sua reconhecida importância como microrganismos com capacidade antagonista a diversos patógenos presentes no leite. Contudo, no Brasil, os dados sobre a presença de BAL no leite cru são limitados, sendo assim necessário o estudo de metodologias que facilitem a identificação e caracterização destes microrganismos. Entretanto, entre as diferentes espécies de bactérias lácticas ocorre uma grande similaridade em relação às necessidades nutricionais e condições de crescimento, que dificulta o uso de métodos microbiológicos clássicos para identificação de gêneros e espécies. Pesquisas têm focado a aplicação de técnicas de biologia molecular para a rápida detecção e diferenciação deste grupo de bactérias. As BAL têm sua classificação baseada em propriedades fenotípicas, incluindo parâmetros fisiológicos e padrões de fermentação de açúcares. Contudo, a correta classificação e identificação das BAL são deficientes sem o suporte das técnicas genéticas. O objetivo deste trabalho foi a avaliação de um protocolo alternativo para caracterização molecular de BAL com marcadores de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), utilizando-se 265 cepas de Bactérias Ácido Lácticas, com capacidade antagonista a patógenos, isoladas de 27 amostras de leite cru, de propriedades dos municípios de São Bento do Una e Saloá, do Agreste Pernambucano. A técnica foi padronizada com sucesso e apresentou reprodutibilidade, entretanto os resultados obtidos com os dois *primers* utilizados não foram suficientes para uma boa caracterização molecular, sendo necessária a realização de novos RAPDs com diferentes marcadores, para melhor caracterização dos isolados.

PALAVRAS-CHAVES: Bactérias Ácido Lácticas (BAL), leite, antagonismo, RAPD, Agreste Pernambucano.

ABSTRACT

STANDARDIZATION OF METHODOLOGY FOR MOLECULAR CHARACTERIZATION BY RAPD - *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA* OF LACTIC ACID BACTERIAS ISOLATED OF RAW MILK

The milk production in Brazil is usually conducted under poor hygienic conditions, resulting in low microbiological quality, therefore constituting a risk for the population when this milk is consumed without thermal treatment. In this form, some groups of microorganisms can be detected in raw milk, and in general, the microbiota that contaminates the milk has high capacity of multiplication, generating alterations in the most varied conditions. In reply to this situation, different strategies are in study for improve of the quality. One of these strategies is the bioconservation, that comes more being each studied at time, had its enormous potential of application in the most varied types of foods. The Lactic Acid Bacteria (LAB) are microorganisms adjusted for the use as bioconservadores due its recognized importance as microorganisms with antagonistic capacity the diverse pathogens present in milk. However in Brazil, the data of presence of BAL in raw milk are limited, being thus necessary the study of methodologies that facilitate to the identification and characterization of these microorganisms. Between the different species of lactic bacteria occur a great similarity in relation to the nutritional needs and conditions of growth, which it makes the use of classic microbiological methods limited for the identification when it comes to the genus level. Scientific works have focused the application of molecular biology techniques for the fast detection and differentiation of the LAB group. The LAB has its classification on phenotypic standards, including physiological parameters and standards of sugar fermentation. However, the correct classification and identification of the LAB group are deficient without the support of the genetic techniques. However, the correct classification and identification of the LAB group are deficient without the support of the genetic techniques. The aim of this work was the standardization of alternative methodology for molecular characterization by RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* , 265 isolates of lactic acid bacteria from 27 samples of raw milk, from properties of the municipalities of São Bento do Una and Saloá from the Agreste of Pernambuco. The standardized technique presented to successfully reproduce, however the results obtained with the two primers used were not enough for a good molecular characterization, therefore it will be necessary to do further RAPDs with different primers, for better characterization of isolates.

KEY WORDS: Lactic Acid Bacterias (LAB), milk, antagonism, RAPD, Agreste of Pernambuco.

1. INTRODUÇÃO

As Bactérias Ácido Láticas (BAL) compreendem um amplo grupo de microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos. Geralmente são catalase negativos. Ocorrem na forma de cocos, cocobacilos e bacilos. Fermentam a lactose, que pode ser degradada a ácido lático (homofermentativos) ou a ácido lático e mais alguns produtos, como acetato, etanol, dióxido de carbono, formato ou succinato (heterofermentativos) (SCHLEIFER et al., 1995). Os gêneros mais importantes das BAL são *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Atualmente, as BAL vêm assumindo grande importância na indústria de alimentos e em saúde pública por serem produtoras de substâncias com conhecido potencial inibitório a microrganismos deteriorantes ou patogênicos. Essa atividade ocorre devido ao crescimento competitivo com outros microrganismos nos alimentos, potencializado pelos efeitos inibitórios de seus metabólitos (STILES, 1994; ADAMS; MITCHELL, 2002; CARR; CHILL; MAIDA, 2002; DE MARTINS; ALVES; FRANCO, 2003).

Uma parcela significativa da microbiota do leite cru provavelmente é constituída por bactérias ácido láticas, que possuem um enorme potencial inibitório em relação a patógenos (NERO, 2005). Sendo assim, o leite cru constitui boa fonte de BAL passíveis de serem utilizadas pela indústria laticinista, especialmente pelo fato de estarem adaptadas às condições do clima e da matéria-prima, sendo ainda

necessários maiores estudos sobre suas características individuais e específicas (ALEXANDRE et al., 2002)

Entre as diferentes espécies de bactérias lácticas ocorre uma grande similaridade em relação às necessidades nutricionais e condições de crescimento, a qual dificulta o uso de métodos microbiológicos clássicos para identificação destes a nível de gênero e espécie (DUBERNET; DESMASURES; GUÉGUEN, 2002). Pesquisas têm focado a aplicação de técnicas de biologia molecular para a rápida detecção e diferenciação das BAL (ROSSETTI; GIRAFFA, 2005). Entre as técnicas baseadas em PCR, tem se reconhecido o uso do método RAPD-PCR, como uma técnica que pode ser rápida e eficiente para a diferenciação intra e inter-específica da maioria das espécies de bactérias associadas aos alimentos (BARUZZI et al., 2006).

Um grande número de estudos tem relatado o sucesso no uso da RAPD-PCR para a diferenciação de cepas de BAL, principalmente em pesquisas que trabalham com gêneros e espécies conhecidas (GIRAFFA et al., 2004; LOMBARDI et al., 2004; BARUZZI et al., 2006). Contudo, a utilização desta metodologia na identificação de cepas selvagens carece de maiores estudos.

O objetivo deste trabalho foi a avaliação de um protocolo alternativo para caracterização molecular de BAL com marcadores de RAPD, utilizando-se 265 cepas de Bactérias Ácido Lácticas, com capacidade antagonista, isoladas de 27 amostras de leite cru, de propriedades dos municípios de São Bento do Una e Saloá, do Agreste Pernambucano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção e Preparação das amostras

Foram usadas 265 culturas de BAL, previamente isoladas, que apresentaram antagonismo positivo, pela técnica de *spot-on-the-lawn*, a pelo menos um dos patogênicos, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Das 265 culturas estudadas, 238 (89,81%) apresentaram resultado positivo para antagonismo a *Listeria monocytogenes*, sendo este o patógeno mais sensível na reação de antagonismo. O antagonismo foi menor para *Staphylococcus aureus*, 33 (12,45%). Apenas 9 (3,40%) das culturas apresentaram antagonismo para os quatro patógenos (Tabela 1).

Todos os 265 isolados avaliados foram obtidos de 27 amostras de leite cru, sendo que 20 (74,07%) eram de propriedades do município de São Bento do Una, e 7 (25,93%) do município de Saloá, ambas localizadas no Agreste pernambucano. Sendo assim, dos 265 isolados avaliados, 237 (89,43%) eram oriundos das amostras do município de São Bento do Una e 28 (10,57%) do município de Saloá. O antagonismo aos patógenos foi considerado na análise fenotípica.

Os isolados estavam estocados em 1 ml de caldo MRS (De Man, Rogosa Sharp, OXOID®) com 30% de glicerol, e mantidos em temperatura de -18 °C, em microtubo de 1,5 ml e foram recuperados em 5 ml de caldo MRS, por 72 horas a temperatura de 30°C, para posteriormente serem estriados em placas contendo ágar sangue 5% utilizando método de esgotamento. As placas foram incubadas à 30°C por 24 horas e verificou-se o crescimento e a pureza das culturas. Os testes de

caracterização fenotípica, foram realizados a partir das culturas que cresceram neste meio.

Tabela 1. Resultados de antagonismo aos patógenos *Listeria monocytogenes* (LM), *Salmonella enteritidis* (SE), *Escherichia coli* (EC), *Staphylococcus aureus* (SA), de 265 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano.

Patógenos	LM	SE	EC	SA	Nº isolados BAL	Frequência (%)
Antagonismo	+	+	-	-	96	36,23
	+	-	-	-	73	27,55
	+	+	+	-	32	12,08
	+	+	-	+	12	4,53
	-	+	+	-	12	4,53
	+	-	+	-	10	3,77
	+	+	+	+	9	3,40
	-	+	-	-	8	3,02
	+	-	-	+	5	1,89
	-	+	+	+	5	1,89
	-	-	+	+	1	0,38
	-	-	+	-	1	0,38
	+	-	+	+	1	0,38
	-	+	-	+	0	0,00
	-	-	-	+	0	0,00
Total	238	174	71	33	265	100,00
(%)	89,81	65,66	26,79	12,45		

2.2. Avaliação Fenotípica

2.2.1. Crescimento em Ágar Sangue.

Para o preparo de ágar sangue, utilizou-se ágar PCA (agar plate count, OXOID®) com 5% de sangue de carneiro. Na placa de ágar sangue verificou-se as

características de crescimento das culturas visualizando, tamanho (pequena/ grande), forma (lisa/ rugosa), cor (coloração da cultura), presença de hemólise (total/ parcial) e consistência (seca/ mucóide), sendo essa ultima verificada com a alça de platina estéril.

2.2.2. Coloração de Gram

As culturas foram fixadas em lâminas, e submetidas à coloração de Gram (KONEMAN, 1993). Foram observadas a coloração, morfologia (cocos, cocobacilos ou bacilos) tamanho e a disposição das células, se eram simples (isoladas), diplóides (em pares), tétrede (agrupamentos de 4 células), e se apresentavam formação em cadeia (disposição linear) curtas ou longas ou cachos. As lâminas foram avaliadas em microscópio ótico, com objetiva de 100X e óleo de imersão.

2.2.3. Prova da Catalase

Cada cultura foi colocada sobre uma lâmina e então algumas gotas de peróxido de hidrogênio a 3% eram aplicadas. Uma efervescência rápida indica a ação da catalase sobre o peróxido, liberando oxigênio, sendo a prova positiva (KONEMAN, 1993).

2.2.4. Prova da Acidez

Culturas isoladas no ágar sangue foram passadas para ao ágar Púrpura de Bromocresol e encubadas a 30°C por 24 horas. O ágar Púrpura de Bromocresol com lactose foi preparado de acordo com Mac Faddin (1980), e foi usado para verificar a produção de ácido láctico que, acidifica o meio tornando-o amarelo. As culturas que produziram ácido láctico apresentaram um halo amarelo a sua volta.

2.3. Agrupamento Fenotípico

Estas provas foram utilizadas para realizar o agrupamento por características fenotípicas, facilitando assim a parte de identificação molecular. Para cada ponto avaliado foi registrada a presença ou ausência das características avaliadas. As características consideradas foram aquelas em que se encontrou pelo menos um resultado positivo.

Com os resultados foi montada uma matriz binária, utilizando Microsoft Office Excel 2003. Aos resultados positivos foi atribuído o valor 1 e aos negativos 0. A similaridade foi determinada por coeficiente simples de semelhança, e o agrupamento para correlação foi calculado por método da média aritmética não ponderada para agrupamento aos pares (UPGMA - Unweighed pair group arithmetic average), de acordo com Sneath & Sokal (1973), utilizando-se o software NTSYSpc v.2.1, Exeter Software® - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (ROHLF, 2004), sendo obtido o dendrograma.

2.4. Avaliação Molecular

Foram escolhidas 75 culturas, de acordo com cada agrupamento fenotípico, para padronização das análises por RAPD-PCR. Foram utilizadas seis cepas padrão para esta avaliação: *Streptococcus thermophilus* (NCDO 1968), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19843), *Lactobacillus casei* (CRL 705), *Pediococcus pentosaceus* (BIOAGRO), *Leuconostoc lactis* (ATCC 19256) e *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), sendo esse último não pertencente ao grupo das BAL.

2.4.1. Extração de DNA

A técnica foi realizada segundo Nomura (2006) com algumas adaptações. Após crescimento em caldo MRS, 2 ml de cada amostra foram colocados em microtubo de 2 ml. As células foram coletadas por centrifugação (14000 rpm, 10 min, 4 °C) e congeladas a -18 °C. Aos pellets congelados foram adicionados 780 µl de tampão TENP 1% PVP (TRIS 0,1M; EDTA 0,5M; NaCl 0,05M; PVP - polivinilpirrolidone 1%), 50 µl lisozima (20 µg.ml⁻¹), 50 µl proteinase K (10 µl.ml⁻¹), 100 µl RNase (1 mg.ml⁻¹), 10 µl SDS (dodecil sulfato de sódio) e 10 µl CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Depois a mistura foi incubada por 30 min a 37°C, e mais 30 min a 65°C. Para purificação foram utilizados Fenol Equilibrado (pH 8), Clorofane (solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico; 25:24:1) e Clorofil (solução de clorofórmio e álcool isoamílico; 24:1). O DNA em solução foi precipitado pela adição de 2 vezes o volume de Etanol Absoluto e mantido em freezer por pelo menos 1 h, e após centrifugação (14000 rpm, 10 min, 4°C), foi feita a purificação com solução de álcool 70%. O material foi ressuspendido em tampão TE (TRIS-NaCl 5 mM; EDTA 1mM) ao volume final de 50 µl, e congeladas até sua utilização.

2.4.2. Quantificação de DNA

Cada amostra de DNA obtida foi diluída 100 vezes em tampão TE (2 µl de solução de DNA para 396 µl de TE), tendo sua concentração e pureza determinadas através da leitura de absorbância em 260 nm (UV - Concentração do DNA em mg.ml⁻¹ = Absx100x50 µg.ml⁻¹) e em 280 nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro. A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) foi indicativa do grau de pureza do DNA obtido, que é ideal entre 1,8 a 1,9.

A eletroforese para verificação da qualidade do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1,5%. A esse gel foi aplicado 5 µl de cada amostra, adicionada de 3 µl de corante azul de bromofenol (0,25% de azul de bromofenol + 60% de sacarose). Após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo, sendo visualizado e fotografado sob luz ultravioleta (UV).

2.4.3. RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

A técnica de RAPD-PCR foi realizada com dois *primers* arbitrários e reagentes da Invitrogen™. Os *primers* usados foram o 1254 (5'- CCGCAGCCAA – 3') (TORRIANI et al 1999) e P3 (5'-CTGCTGGGAC-3') (MANGIN et al. 1999).

As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 50 µl, com a mistura de PCR contendo 50 ng de DNA, 1,5 µl de *primer* (50 pmol.µl⁻¹), 2,5 µl de MgCl₂ (1 mM), 1 µl de dNTP (0,5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 0,3 µl de Taq polimerase (5U.µl⁻¹) 5 µl de tampão para PCR (10x PCR buffer) e o água de injeção para completar o volume final. As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 2400, programado para 94°C, 15 segundos, 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 2 minuto a a 36°C e 2 minutos a 68°C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese, utilizando-se géis de agarose a 1,5%. A corrida foi realizada a 90 V, por 3 horas, em tampão TAE 1X (0,04 M Trisacetato + 1 mM EDTA). Foram aplicados 10 µL da solução de amplificação com 3 µL de tampão de carregamento (0,25% de azul de bromofenol + 60% de sacarose) por canaleta do gel. O marcador 1 Kb DNA Ladder (1 µg.µl⁻¹ Invitrogen™) foi utilizado como padrão para cálculo do peso molecular. Após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo, sendo visualizado e fotografado

sob luz ultravioleta (UV) para análise mais detalhada. Somente foram consideradas as bandas monomórficas e polimórficas que se apresentarem de forma consistente e reprodutível nos géis de agarose. O peso molecular das bandas visualizadas foi calculado através do programa LabImage 1D 2006 Professional (v.3.3.3, Kapelan[®]).

2.5. Agrupamento Genético

Os resultados do RAPD-PCR foram utilizados para realizar o agrupamento molecular. Para cada amostra avaliada foi registrada a presença ou ausência das bandas no gel de agarose. Com os resultados do cálculo dos pesos moleculares das bandas visualizadas, foi montada uma matriz binária, utilizando Microsoft Office Excel 2003, as bandas presentes foram atribuído o valor 1 e as ausentes 0. A similaridade foi determinada por coeficiente simples de semelhança, e o agrupamento para correlação foi calculado por método da média aritmética não ponderada para agrupamento aos pares (UPGMA - Unweighed pair group arithmetic average), de acordo com Sneath & Sokal (1973), utilizando-se o software NTSYSpc v.2.1, Exeter Software[®] - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (ROHLF, 2004).

3. RESULTADOS

3.1. Análises fenotípicas

No crescimento em ágar sangue verificou-se que todas as culturas apresentaram tamanho considerado pequeno (< 5 mm). Ocorreu o predomínio da forma lisa em 258 (97,36%) das culturas. No aspecto cor foram identificadas três cores (branco, cinza e amarelo), sendo que as culturas de coloração branca foram as mais freqüente em 234 (88,30%). Na verificação da consistência, 224 (84,53%) eram de consistência seca. Na avaliação da hemólise, não ocorreu hemólise total em nenhuma das culturas e 22 (8,30%) apresentaram hemólise parcial (Tabela 2).

Tabela 2. Características de crescimento em ágar sangue, de 265 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano.

Aspectos	Variáveis	Nº culturas	Frequência (%)
<i>Tamanho</i>	Pequeno	265	100,00
	Grande	0	0,00
<i>Forma</i>	Lisa	258	97,36
	Rugosa	7	2,64
<i>Cor</i>	Branca	234	88,30
	Cinza	19	7,17
	Amarela	12	4,53
<i>Consistência</i>	Seca	224	84,53
	Mucóide	41	15,47
<i>Hemólise</i>	Parcial	22	8,30
	Total	0	0,00

Na Coloração de Gram todas as culturas foram Gram positivas. Com relação à morfologia ocorreu o predomínio de cocos em 220 (83,02%), não sendo observado nenhum bacilo. Em 212 (80,00%) das culturas foi visualizada a disposição de células na forma téttrade que são agrupamentos de 4 células (Tabela 3).

Para a prova da catalase 256 (96,60%) das culturas foram negativas. Na prova da acidez 253 (95,47%) foram positivas (Tabela 4).

Tabela 3. Aspectos morfocolorimétricos, de 265 culturas isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano.

Aspectos	Variáveis	Nº culturas	Frequência (%)
<i>Gram</i>	Positivo	265	100,00
	Negativo	0	0,00
<i>Morfologia</i>	Cocos	220	83,02
	Cocobacilos	45	16,98
	Bacilos	0	0,00
<i>Conformação</i>	Simplex	265	100,00
	Diplóide	249	93,96
	Téttrade	212	80,00
	Cadeia Curta	58	21,89
	Cadeia Longa	3	1,13

Tabela 4. Resultados das provas da catalase e acidez, de 265 culturas isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano.

Aspectos	Variáveis	Nº culturas	Frequência (%)
<i>Prova da Catalase</i>	Positivo	9	3,40
	Negativo	256	96,60
<i>Prova da Acidez</i>	Positivo	253	95,47
	Negativo	12	4,53

Para o agrupamento utilizando os resultados das características fenotípicas, foram consideradas 21 variáveis fenotípicas do total de 26 avaliadas inicialmente, dentro dos 11 aspectos estudados. Ao avaliar o crescimento em ágar sangue, verificou-se que nenhuma das culturas apresentou tamanho grande, sendo o aspecto tamanho descartado.

As características descartadas foram com relação à Coloração de Gram, pois todas as culturas foram gram positivas, nenhum apresentou a forma de bacilo. Em relação à reação de hemólise, não ocorreu hemólise total em nenhuma das culturas, sendo considerados apenas os resultados para hemólise parcial. Essas características foram descartadas por não servirem como diferencial.

A análise dos resultados das características fenotípicas resultou em um dendrograma UPGMA demonstrado na figura 1. No dendrograma é possível visualizar 2 grupos com similaridade de 66%. O Grupo 1 apresentou 251 (94,71%) dos isolados, o Grupo 2 foi formado por 14 (5,29%) dos isolados, sendo que o Grupo 1 apresentou uma grande variedade de sub-grupos em diferentes níveis de similaridade. Os dois grupos quando avaliados a partir do nível de similaridade de 75% começam a apresentar ramificações. Nesse nível, é possível visualizar 6 sub-grupos e um isolado, formados dentro do Grupo 1, e a formação de 3 sub-grupos no Grupo 2.

Ao avaliar a distribuição das culturas, em relação aos municípios de origem, verificou-se que o Grupo 1 apresentou 223 (94,10%) do total dos isolados de São Bento do Una, e os 28 (100%) dos de Salóá. No Grupo 2 foram agrupados os outros 14 (5,90%) dos isolados de São Bento do Una.

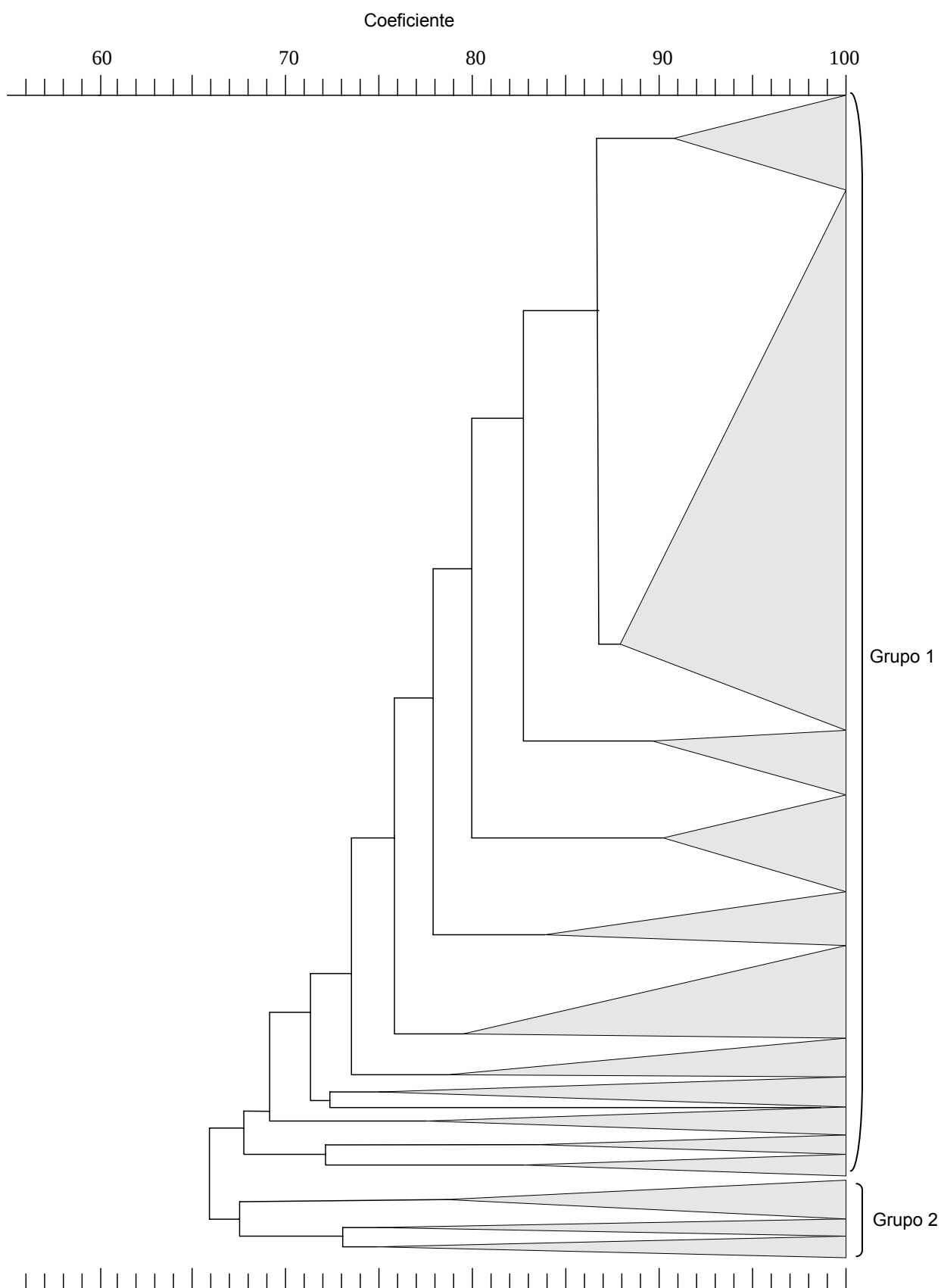


Figura 1. Dendrograma formado a partir de 20 características fenotípicas, baseado no método UPGMA, de 265 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano.

3.2. Análise Molecular

Foram escolhidas 75 culturas para as análises por RAPD-PCR, segundo os agrupamentos formados na análise fenotípica, sendo 64 (85,35%) representantes do município de São Bento do Una, e 11 (14,65%) do município de Saloá.

A metodologia de extração de DNA utilizada se mostrou eficiente, pois foram obtidos extratos finais com concentração média de DNA de 28,66 mg/mL, nas leituras do espectrofotômetro. O grau de pureza esteve na média de 1,35 para razão A_{260}/A_{280} , e em nenhum dos géis foi detectado a presença de impurezas.

A amplificação de DNA, de todas as culturas, para os dois *primers*, teve boa reprodutibilidade. Devido ao grande número de culturas e a limitação de 20 amostras por reação, os padrões das bandas foram obtidos em reações diferentes e dias diferentes, mas sob o mesmo protocolo. Não foram observadas diferenças, pois os produtos das reações correram em condições idênticas de eletroforese, para cada *primer* utilizado.

As reações com o *primer* 1254 geraram amplificações com bandas distintas, variando o peso molecular na faixa de 325 bp até 4,3 Kb (figura 2). Ocorreram 51 padrões de distribuição de bandas, com variações de 5 a 14 bandas visualizadas. Para o *primer* P3 a variação de peso molecular das bandas foi de 340 bp até 5,8 Kb, com 56 padrões de distribuição de bandas, com diferença de 2 a 7 bandas (figura 3). O *primer* 1254 apresentou maior polimorfismo, comparado com o *primer* P3 (figuras 2 e 3).

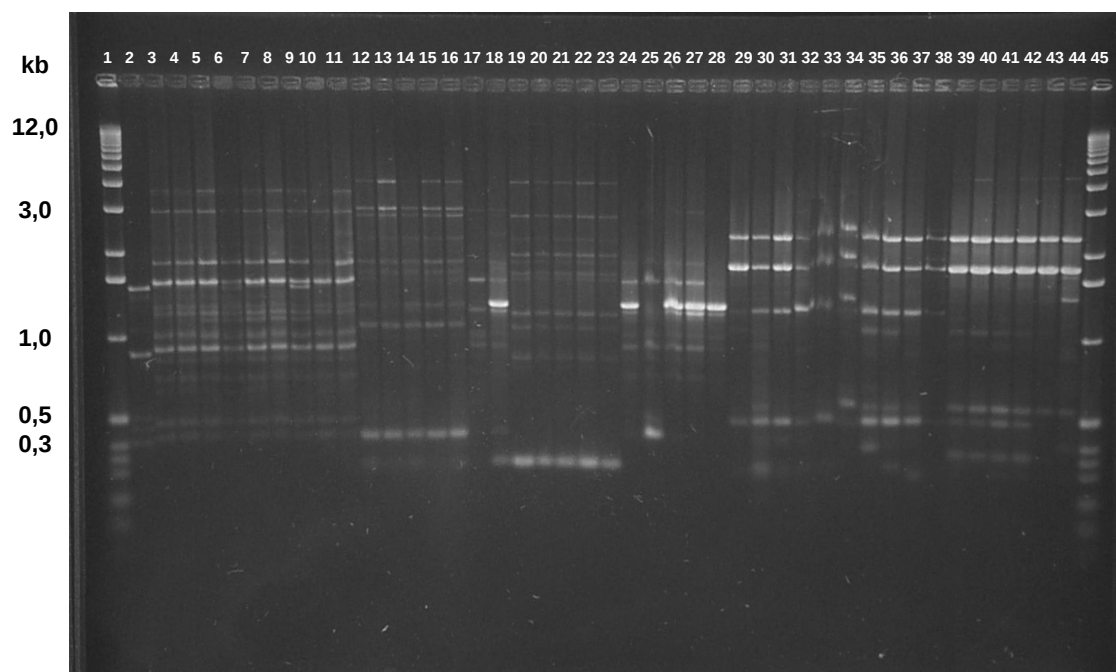


Figura 2. Foto representativa do gel RAPD-PCR do *primer* 1254, de culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano. Linhas M = marcador molecular 1kb DNA Ladder; linhas de 2 – 44, diferentes padrões de bandas mostrando alto polimorfismo.

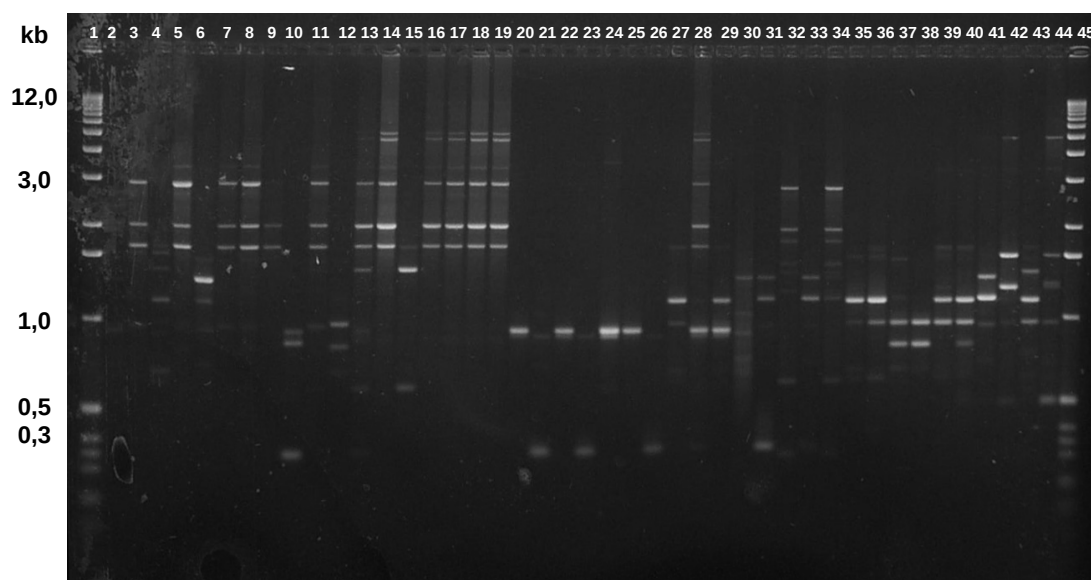


Figura 3. Foto representativa do gel RAPD-PCR do *primer* P3, de culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano. Linhas M = marcador molecular 1kb DNA Ladder; linhas de 2 – 44, diferentes padrões de bandas mostrando baixo polimorfismo.

A análise numérica dos padrões RAPD-PCR obtidos para o *primer* 1254 foram reunidos em um dendrograma UPGMA apresentado na figura 4. Foram obtidos 2 grupos com similaridade de 80%. O Grupo 1 apresentou 66 (88,00%) dos isolados, o Grupo 2 foi formado por 9 (12,00%) dos isolados, sendo que no nível de 83% de similaridade o primeiro grupo apresentou 2 sub-grupos distintos. A partir desse nível de similaridade, o sub-grupo 1A apresentou uma grande variedade de ramificações menores, formando 3 chaves, com 56 (84,85%) dos isolados do Grupo 1, bem diferente do sub-grupo 1B, que se manteve uniforme com 10 (15,15%) dos isolados desse grupo. Ao nível de similaridade de 88%, as chaves formadas no sub-grupo 1A ficaram divididas da seguinte maneira: chave 1a com 17(30,35%), chave 1b com 35 (62,50%) e a chave 1c com 4 (7, 15%), dos isolados agrupados neste sub-grupo.

No Grupo 1 verificou-se que dos 11 isolados representantes do município de Saloá, 10 (90,90%) se encontram no sub-grupo 1A, sendo 7 (70,00%) da chave 1a, e 3 (30,00%) da chave 1b. O sub-grupo 1B, foi formado apenas de isolados de São Bento do Una. No Grupo 2, dos 9 isolados apenas 1 (11,11%) era representante do município de Saloá.

Ao analisar os agrupamentos do *primer* 1254 sobre o aspecto do antagonismo, verificou-se que do sub-grupo 1B, 6 (66,66%) dos isolados apresentavam antagonismo a *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, 2 (22,22%) apresentavam antagonismo apenas a *Listeria monocytogenes*, e 1 (11,11%) dos isolados apresentava antagonismo aos quatro patógenos.

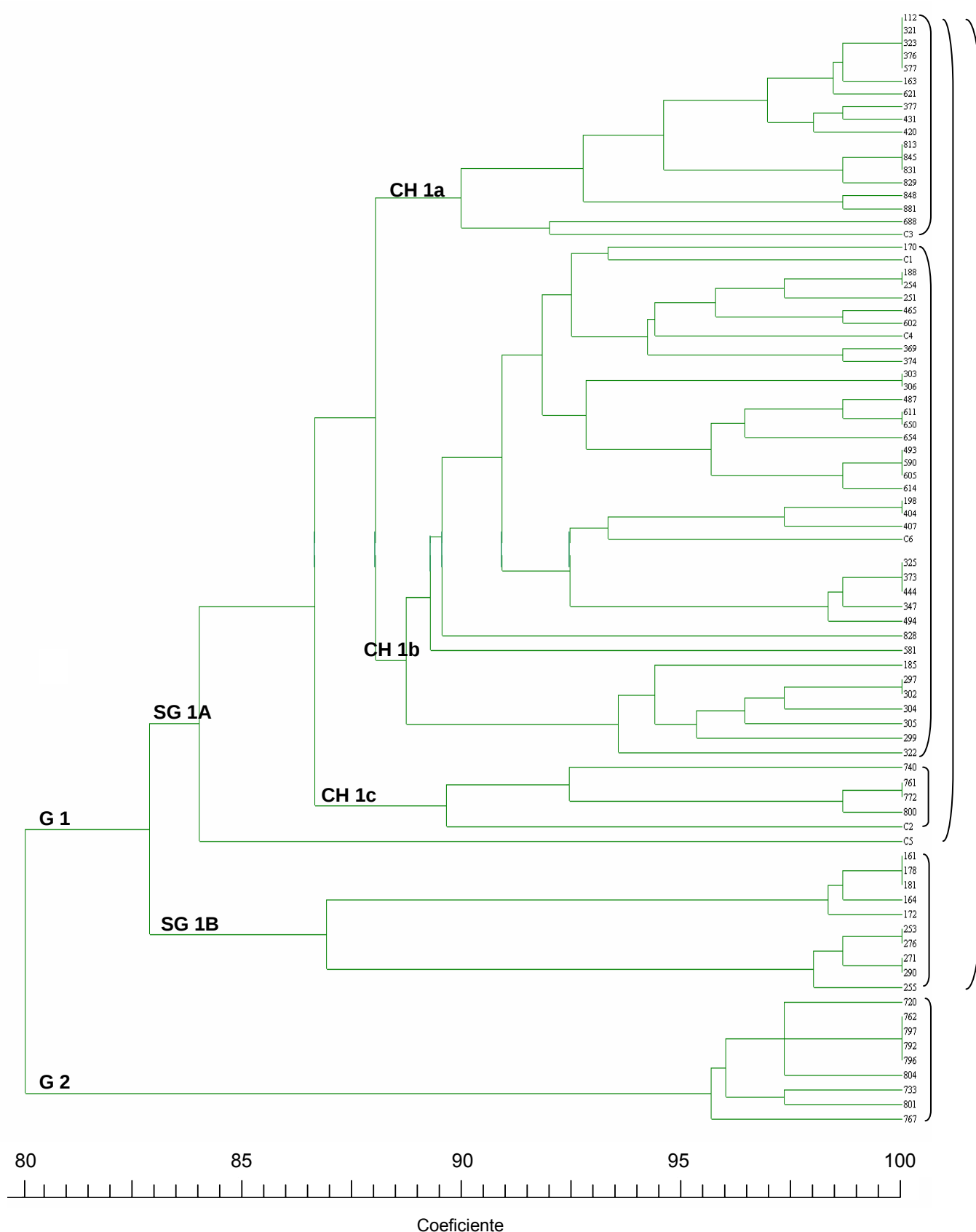


Figura 4. Dendrograma formado dos resultados do *primer* 1254, baseado no método UPGMA, de 75 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano. Grupo 1(G1); Grupo 2 (G2); Sub-grupo 1A (SG 1A); Sub-grupo (SG 1B); Chave 1A (CH 1a); Chave 1B (CH 1b); Chave (CH 1c). C1-*Streptococcus thermophilus* (NCDO 1968), C2-*Enterococcus faecalis* (ATCC 19843), C3-*Lactobacillus casei* (CRL 705), C4-*Pediococcus pentosaceus* (BIOAGRO), C5-*Leuconostoc lactis* (ATCC 19256) e C6- *Micrococcus luteus* (ATCC 9341).

O Grupo 2 apresentou 4 (40,00%) isolados com antagonismo a *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, 3 (30,00%) isolados com antagonismo a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*, 3 (30,00%) com antagonismo a *Listeria monocytogenes*, e 1 (10,00%) com antagonismo a *Salmonella enteritidis*.

A distribuição dos seis controles dentro dos agrupamentos formados pelo *primer* 1254, ficou dentro do Grupo 1, e separada da seguinte maneira: o *Lactobacillus casei* (CRL 705) ficou dentro da chave 1a; o *Streptococcus thermophilus* (NCDO 1968), o *Pediococcus pentosaceus* (BIOAGRO), e o *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) ficaram dentro da chave 1b, o *Enterococcus faecalis* (ATCC 19843), ficou na chave 1c, e o *Leuconostoc lactis* (ATCC 19256) ficou isolado dentro do sub-grupo 1A. A esse mesmo nível de similaridade o sub-grupo 1B e Grupo 2 ficaram sem correlação com os controles, que somente são separados a 95% de similaridade.

Para os resultados do RADP-PCR do *primer* P3 foi montado o dendrograma UPGMA apresentado na figura 5. Os resultados para este *primer* não foram satisfatórios para distinção de grupos. Ao nível de 83% de similaridade, se tem apenas a formação de um grupo e a presença de um isolado separado (figura 5). Contudo, o sub-grupo 1B e o Grupo 2, agrupados no *primer* 1254, se mantiveram agrupado em chaves distintas, pelo dendrograma do *primer* P3 ao nível de 95% de similaridade, sendo adicionado de mais alguns isolados.

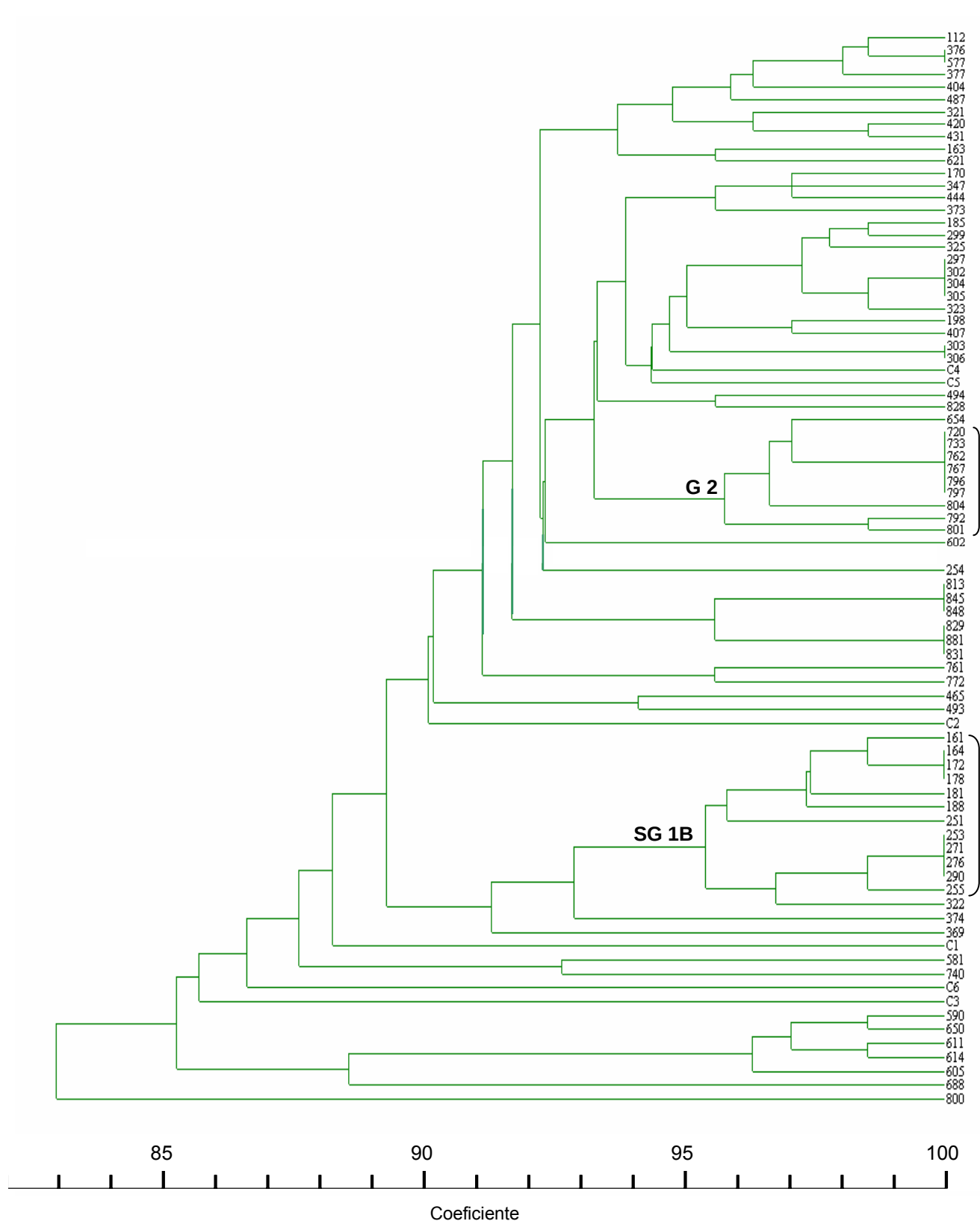


Figura 5. Dendrograma formado dos resultados do *primer* P3, baseado no método UPGMA, de 75 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano. Grupo 2 (G2); Sub-grupo (SG 1B). C1-*Streptococcus thermophilus* (NCDO 1968), C2-*Enterococcus faecalis* (ATCC 19843), C3-*Lactobacillus casei* (CRL 705), C4-*Pediococcus pentosaceus* (BIOAGRO), C5-*Leuconostoc lactis* (ATCC 19256) e C6- *Micrococcus luteus* (ATCC 9341).

Ao analisar os resultados dos RAPD-PCR dos dois *primers* juntos, foi formado um dendrograma UPGMA (figura 6), que teve o formato semelhante ao dendrograma formado pelos resultados do *primer* 1254, mas com a separação dos grupos e sub-grupos em níveis maiores de similaridade, e um maior número de separações dentro do Grupo 1. Os Grupos 1 e 2 foram separados a 85% de similaridade e os sub-grupos 1A e 1B foram diferenciados a partir de 87%.

Não foi observada correlação dos agrupamentos genéticos com nenhuma das características fenotípicas nem com os locais de origem dos isolados. A distribuição dos controles entre os grupos formados não foi efetiva. Esta análise não é conclusiva, sendo necessário a realização de novos RAPDs com diferentes marcadores, para melhor caracterização molecular. Os níveis de similaridade utilizados para a separação dos grupos deverão sofrer alterações após a incorporação de novos marcadores RAPD.

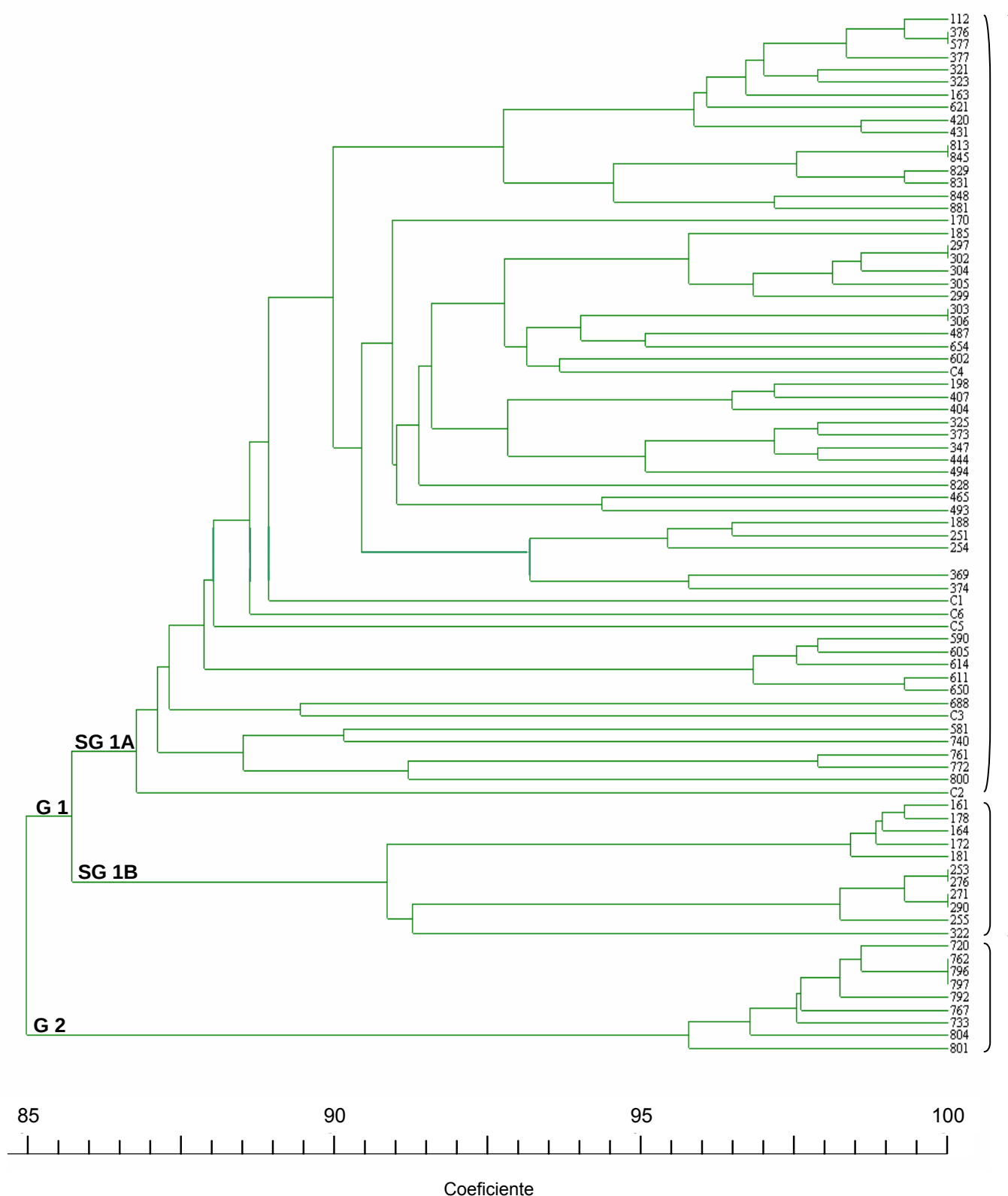


Figura 6. Dendrograma formado dos resultados do *primer* 1254 e P3 juntos, baseado no método UPGMA, de 75 culturas de BAL isoladas de amostras de leite cru, de propriedades do Agreste pernambucano. Grupo 1(G1); Grupo 2 (G2); Sub-grupo 1A (SG 1A); Sub-grupo (SG 1B). C1-*Streptococcus thermophilus* (NCDO 1968), C2-*Enterococcus faecalis* (ATCC 19843), C3-*Lactobacillus casei* (CRL 705), C4-*Pediococcus pentosaceus* (BIOAGRO), C5-*Leuconostoc lactis* (ATCC 19256) e C6- *Micrococcus luteus* (ATCC 9341).

4. DISCUSSÃO

Com relação aos resultados da avaliação fenotípica, se verificou que os aspectos e metodologias utilizados, são passíveis de uma avaliação subjetiva, que pode sofrer varias interferências tanto por parte do pesquisador como por variações das técnicas. É importante destacar que as características avaliadas nessas metodologias não são exclusivas de um determinado gênero de BAL, não sendo assim determinante em estudos de identificação mais abrangentes. Contudo, essas técnicas podem ser utilizadas como ferramentas de triagem, na diferenciação das BAL em relação a outros grupos de microrganismos, ou quando se está pesquisando um único gênero específico de BAL, que possa ter sua distinção feita por alguma dessas características.

Com relação à saúde pública, as BAL são potencialmente importantes no controle de microrganismos indesejáveis em alimentos, pois podem interferir com a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de vários mecanismos: competição por oxigênio, competição por sítios de ligação e produção de substâncias antagonistas. (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2003). Os resultados da avaliação da distribuição do antagonismo fortalecem a possibilidade da utilização desse grupo de microrganismo como bioconservante, principalmente contra os patógenos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, já que esses patógenos foram os mais sensíveis ao antagonismo. A ação antagonista, de diferentes gêneros de BAL aos variados patógenos e microrganismos indicadores em alimentos é descrita em diversos estudos (DABÉS et al., 2001; ALEXANDRE et al., 2002; MACIEL et al., 2003; RODRIGUEZ et al., 2005; MUFANDAEDZA et al.,

2006). Isso demonstra que a ação antagonista não é exclusiva de um determinado gênero.

Um grande número de estudos tem relatado o sucesso no uso da RAPD-PCR para a diferenciação de cepas de BAL, principalmente em pesquisas que trabalham com gêneros e espécies conhecidas (GIRAFFA et al., 2004; LOMBARDI et al., 2004; BARUZZI et al., 2006). Contudo, suas limitações precisam ser bem administradas e controladas, sendo necessário, certa experiência com procedimentos moleculares, cuidado com o preparo das reações, e rigor na leitura e análise dos fragmentos visualizados no gel (WILLIAMS; RAFALSKI; TINGEY, 1993; LOPES et al., 2002).

A eficiência dos marcadores RAPD, na análise de BAL, é melhor observada em pesquisas que trabalham com gêneros e espécies conhecidas, onde nos agrupamentos é possível visualizar a diferenciação entre espécies e subespécies (GIRAFFA et al., 2004; LOMBARDI, 2004; BARUZZI et al., 2006). Para a obtenção de bons resultados na técnica de RAPD, quando se trabalha com culturas desconhecidas, é importante o uso de diferentes *primers*, para a seleção dos melhores (KLEIN et al., 1998). O uso dos *primers* 1254 e P3 apresentam bons resultados em diferentes trabalhos (MANGIN et al., 1999; ROMALDE et al., 1999; TORRIANI et al., 1999; NOMURA et al., 2006). Entretanto, neste trabalho o *primer* 1254 apresentou melhores resultados em relação ao P3. O uso do *primer* P3 apresentou baixo polimorfismo, o que dificultou a caracterização e separação de grupos. Os resultados do *primer* 1254 podem ser mais bem aproveitados após o uso de outros *primers* que apresente resultados similares ou melhores.

O RAPD-PCR é um método molecular conveniente para a identificação de gêneros e espécies de BAL, por ser eficiente na diferenciação genética, além de

apresentar baixo consumo de tempo e material, quando comparado com outras metodologias. Contudo, a construção de uma base de dados consistente para a caracterização a nível de gênero e/ou espécie, é dificultada sem a utilização de *primers* que apresentem bons resultados. Uma variedade de diferentes *primers* deve ser testada, a partir da metodologia de extração e amplificação padronizada, para que se possa indicar um conjunto de *primers* que, quando utilizados numa mesma análise molecular, permita a separação com similaridade suficiente para identificação de gêneros e espécies de BAL.

5. CONCLUSÃO

A metodologia padronizada para extração de DNA, foi eficiente e permitiu níveis de pureza suficiente para a realização da análise com marcadores RAPD. A amplificação de DNA, de todas as culturas, para os dois *primers*, teve boa reprodutibilidade dando credibilidade para a caracterização molecular de BAL com marcadores de RAPD.

Os resultados obtidos com os dois *primers* utilizados não foram suficientes para uma boa caracterização molecular, sendo necessário a realização de novos RAPDs com diferentes marcadores, para que se obtenha agrupamentos mais específicos e melhor caracterizados, e assim, obter um melhor aproveitamento na análise de seqüenciamento genético.

6. AGRADECIMENTO

A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/ MDS). Esta pesquisa faz parte do Projeto "Produção de leite com qualidade e segurança a partir da implantação de boas práticas na produção leiteira na região de Recife, Pernambuco", financiado por este órgão.

7. REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, SANTOS, W. M. L. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.4, p.424-428, ago. 2002.
- DABÉS, A.C., SANTOS, W.L.M. AND PEREIRA, E.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.53, n.1, p.136-140, fev. 2001.
- DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, [S.l.], n.29, p.114-119, nov./dez. 2003.
- DUBERNET S.; DESMASURES N.; GUÉGUEN M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. **FEMS Microbiology Letters**, [S.l.], v.214, n.2, p.271-275, set. 2002.
- GIRAFFA G.; ANDRIGHETTO, C.; ANTONELLO, C.; GATTI, M.; LAZZI, C.; MARCAZZAN, G.; LOMBARDI, A.; NEVIANI, E. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v.91, n.2, p.129-139, mar. 2004.
- JAY, J. M; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. New York: Springer, 2005.
- KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 41, n.2, p.103-125, maio 1998.
- LOMBARDI, A.; GATTI, M.; RIZZOTTI, L.; TORRIANI, S.; ANDRIGHETTO C.; GIRAFFA, G. Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses **International Dairy Journal**, [S.l.], v.14, n.11, p.967-976, nov. 2004.
- LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. O.; CAMARGO L.E. A.; FUNGARO M.H.P. Marcadores Moleculares Dominantes , (RAPD e ALFP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, [S.l.], n. 29, 2002. Disponível em: < //http: //www.biotecnologia.com.br/. Acesso em: 11 nov. 2007.
- MAC FADDIN, J.F.; **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**, Buenos Aires:Panamericana, 1980.

- MACIEL, J. F.; TEIXEIRA, M. A.; MORAES, C. A. de; GOMIDE, L. A. de M. Antibacterial activity of lactic cultures isolated of italian salami. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, n.1, p.121-122, nov. 2003.
- MANGIN, I.; CORROLER, D.; REINHARDT, A.; GUENGUEN, M. Genetic diversity among dairy lactococcal strains investigated by polymerase chain reaction with three arbitrary primers. **Journal of Applied Microbiology**. [S.l.], n.86, p.514-520, 1999.
- MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. Qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Fortaleza. Bactérias multiresistentes a antibióticos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.59, p.39-42, jan./fev. 1999.
- MUFANDAEDZA, J.; VILJOEN, B.C.; FERESU, S.B., GADAGA, T.H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.108, p.147-152, abr. 2006
- NERO, L.A. ***Listeria monocitogenes e Salmonella spp. Em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras do Brasil: ocorrência e fatores que interferem na detecção.*** 2005. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; NARITA, T.; KIMOTO-NIRA, H.; OKAMOTO, T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. **Journal of Applied Microbiology**, [S.l.], n.101, p.396-405, 2006.
- RODRIGUEZ, E.; CALZADA, J.; ARQUES, J. L.; RODRIGUEZ, J. M.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocitogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, p.51-57, jan. 2005.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system.** Version 2. Exeter Publishing. NewYork: Applied Biostatistics, 2004.
- ROMALDE J.L; MAGARIÑOS B.; VILLAR C.; BARJA, J.L.; TORANZO A.E. Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA . **FEMS Microbiology Letters**. [S.l.], v.179, n.2, p.297-304, out. 1999.
- SCHLEIFER, K.H.; EHEMANN, M.; BEIMFOHR, C.; BROCKMANN, E.; LUDWING, W.; AMANN, R. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. **Dairy Journal**, n.5, p.1081-1094, 1995.
- SNEATH, PETER H.A.; SOKAL, ROBERT R. **Numerical taxonomy.** The principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman, 1973.
- TORRIANI, S.; ZAPPAROLI, G.; DELLAGLIO, F. Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *L. delbrueckii subsp. Lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], n.10, v.65, p. 4351–4356, out., 1999.

WILLIAMS, J.G.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods of Enzymology**, [S.l.], n. 218, p.704-740, 1993.

8. APÊNDICE

8.1. *Perspectivas*

A análise do seqüenciamento de DNA será realiza em etapa posterior, após a definição dos agrupamentos, através de análises com outros marcadores RAPD-PCR, utilizando pelo menos um representante de cada sub-grupo formado.

O seqüenciamento permitirá à identificação efetiva dos microrganismos avaliados podendo ser feita a correlação com os grupos formados na análise por RAPD – PCR.

8.1.1. Seqüenciamento de DNA

Serão selecionados isolados de acordo com o número de agrupamentos formados na RAPD-PCR, para o seqüenciamento. A amplificação das seqüências 16S rDNA dos isolados utilizará os *primers* Y1 (5'TGG CTC AGA ACG AAC GCT GGC GGC) e Y3 (5'CTA GAC CCC ACT TAC GCA TTG TTC CAT) (YOUNG et al., 1991). A mistura de reação em ambas análises conterá 5 ng de DNA dos isolados, 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTPs, 3,0 mM de MgCl₂, 1,0 U de Taq DNA polimerase em 20mM de Tris HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl. O volume da reação será de 50 µL. A reação de amplificação seguirá com uma etapa de desnaturação inicial (94°C, 3 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C, 30 segundos), anelamento (60 °C, 30 segundos) e extensão (72 °C, 1 min), e uma extensão final (72°C) por 5 min. Após amplificação, 5 µl de cada reação de PCR será avaliado por eletroforese em gel de agarose (1% p/v) em tampão TAE 1X e corado com brometo de etídeo para visualização sob luz ultravioleta. As amostras que apresentarem

banda no tamanho esperado (1603 pb) serão tratadas para reação de seqüenciamento.

8.1.2. Reação de seqüenciamento do fragmento amplificado

Os fragmentos da subunidade 16S amplificados pela reação de PCR serão precipitados segundo (NICOLETTI; CONDORELLI, 1993) modificado. Os fragmentos serão precipitados com 1 mM de NaCl e 11% de PEG (polietilenoglicol 8.000) por 24 horas a 4 °C. Em seguida as amostras serão centrifugadas (12.000 G por 40 minutos) e lavados com 150 uL de etanol 70%, seguidos de nova centrifugação (12.000 G por 10 minutos). Os fragmentos serão então eluídos em 15 ul de água milli Q esterilizada. Deste material, serão utilizados 2 ul nas reações de seqüenciamento, utilizando *primers* internos ao fragmento amplificado visando cobrir toda a extensão destes fragmentos. A reação de seqüenciamento será feita utilizando o “kit” comercial DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) em um sequenciador automático MegaBace 1000.

8.1.3. Bioinformática para a avaliação dos resultados

Programas de informática dirigidos para o tratamento de resultados de análises biológicas, ou ferramentas de bioinformática, serão utilizados na maioria das etapas do projeto proposto. O pacote de programas Phred/Phrap/Consed irá permitir avaliar a qualidade dos resultados de seqüenciamento e obter montagens dos fragmentos amplificados, principalmente dos genes maiores, aumentando a confiabilidade das análises filogenéticas realizadas pelo programa Philip, baseado em algoritmos heurísticos, e MrBayes baseados em algoritmos bayesianos.

8.1.4. Referências

NICOLETTI, V. G.; CONDORELLI, D. F. Optimized PEG method for rapid plasmid DNA purification: high yield from “Midi-Prep.” **BioTechniques**, [S.l.], v.14, p.532–536, 1993.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 73, p. 2271-2277, 1991.

8.3. Protocolo utilizado para extração de DNA

