



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS (PPGCTA)

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E  
CAPACIDADE DE BIOACUMULAÇÃO DE SELÊNIO EM CÉLULAS DE  
*ENTEROCOCCUS***

**Simone Pieniz  
(Dissertação de Mestrado)**

Orientador: Adriano Brandelli

Porto Alegre (RS) Brasil  
Fevereiro de 2010



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E  
CAPACIDADE DE BIOACUMULAÇÃO DE SELÊNIO EM CÉLULAS DE  
*ENTEROCOCCUS*

Simone Pieniz  
(Nutricionista – Centro universitário Franciscano /UNIFRA/)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Adriano Brandelli

Porto Alegre (RS) Brasil  
Fevereiro de 2010

P614a Pieniz, Simone  
Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e capacidade de bioacumulação de selênio em células de *Enterococcus* / Simone Pieniz. -- Porto Alegre, 2010.

108f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010.

Orientador: Adriano Brandelli

Bibliografia

1. Atividade antimicrobiana. 2. Probióticos. 3. *Capacidade antioxidante*. I. Título. II. Brandelli, Adriano (orient.)

CDU 664:576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

*Essa etapa da minha vida não teria sido finalizada com sucesso, sem o apoio, a confiança, o respeito e o amor de meu grande e eterno amor, Robson. Obrigada por ser meu alicerce, meu refúgio e por acreditar em mim. Obrigada pela certeza de sempre poder contar com o teu amor e com o teu apoio em todos os momentos da minha vida.*

*A você, meu amor sempre  
A você eu dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela graça da vida, por sempre iluminar os meus caminhos e por me dar força para enfrentar a vida com alegria e perseverança.

Ao Prof. Adriano Brandelli pelo apoio incondicional em todos os momentos que foi preciso, pela oportunidade, pela orientação, pela confiança e amizade. Minha eterna gratidão.

Ao PPGCTA pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro e concessão da Bolsa de Estudo.

Ao Departamento de Biologia da Universidade de Auburn de Montgomery, Alabama, Estados Unidos da América, pela disponibilização dos Laboratórios e Equipamentos.

Ao Prof. Benedict C. Okeke pela orientação, hospitalidade, amizade, confiança e principalmente pela ajuda incondicional em todos os momentos necessários.

Aos professores do PPGCTA, em especial a Prof. Erna, Prof. Eduardo e Prof. Plinho, pelos ensinamentos e amizade adquiridos durante este período.

Aos amigos e colegas do Laboratório 218, que considero como parte da minha família, pela ajuda, companheirismo e amizade marcada durante esse período especial de minha vida.

As colegas de Curso, Vanessa, Manuela, Ana, Márcia, Josete e Camila pela amizade e companheirismo.

Ao Sr. Otélio Busanello e família pela ajuda, conselhos, ensinamentos e principalmente pela amizade adquirida durante este período.

Aos meus pais pelo amor e pelo “dom da vida” e a toda minha família: tios, tias, padrinhos, madrinhas e primos, pela força recebida no prosseguimento dos estudos, por acreditarem em mim e no meu potencial.

Ao meu esposo Robson, minha vida, meu amor, meu alicerce, meu eterno companheiro, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por permanecer em minha vida.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTA DE TABELAS - Capítulos II e III.....	10
LISTA DE FIGURAS - Capítulo II.....	11
LISTA DE FIGURAS - Capítulo III.....	12
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. CAPÍTULO I - Revisão Bibliográfica - Bactérias ácido lácticas e seus benefícios como culturas probióticas associadas com o uso de selênio, atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante.....</b>	<b>16</b>
2.1. Bactérias Ácido Lácticas.....	17
2.2. <i>Enterococcus</i> .....	19
2.3. Probióticos.....	21
2.4. Utilização de probióticos como promotores de crescimento.....	26
2.5. Selênio (Se).....	27
2.6. Atividade antimicrobiana exercida pelas bactérias ácido lácticas.....	30
2.7. Atividade Antioxidante.....	33
2.8. Ensaio antioxidantes.....	36
2.8.1. Reação ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	36
2.8.2. Capacidade antioxidante pelo método DPPH.....	37
2.8.3. Capacidade antioxidante pelo método ABTS <sup>++</sup> .....	38
2.9. Considerações finais.....	38
2.10. Referências Bibliográficas.....	39
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. CAPÍTULO II - Artigo I - Antimicrobial and antioxidant activities among enterococci isolated from meat and dairy products.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2. CAPÍTULO III - Artigo II - Evaluation of selenite bioremoval from liquid culture by <i>Enterococcus</i> species.....</b>	<b>81</b>
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>107</b>

## RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL) possuem papel importante em uma ampla variedade de alimentos, incluindo produtos lácteos e cárneos. Neste trabalho foram investigadas as atividades antimicrobiana e antioxidante, do sobrenadante bruto e do extrato intracelular, de 36 BAL isoladas de produtos lácteos e cárneos. Estas bactérias foram identificadas através do seqüenciamento do rRNA da região 16S. A análise através do GenBank BLAST revelou que todos os isolados pertencem ao gênero *Enterococcus*. Três isolados foram identificados como *E. hirae*, um isolado como *Enterococcus* sp., 17 como *E. faecium* e 15 como *E. faecalis*. A atividade antimicrobiana frente ao microrganismo indicador *Listeria monocytogenes* foi observado em 21 isolados, utilizando o sobrenadante bruto, destacando-se com os maiores halos de inibição os isolados IS 196 (10,7 mm) e IS 197 (11,0 mm) e, em 7 isolados, utilizando o extrato intracelular, os maiores halos de inibição foram obtidos com os isolados IS 196 (9,7 mm) e IS 197 (9,3 mm), sendo estes dois isolados identificados como *E. faecium*. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada por três métodos distintos. Os 36 isolados apresentaram atividade antioxidante pela determinação às Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbiturico (TBARS), utilizando tanto o sobrenadante bruto quanto o extrato intracelular. A capacidade antioxidante também foi verificada pelo seqüestro de radicais livres através do método de ABTS<sup>++</sup> (2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico)) e pela captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Nestes dois métodos verificou-se que apenas as amostras do sobrenadante bruto demonstraram capacidade antioxidante. A atividade antioxidante mais elevada foi observada nos isolados IS 196 e IS 197. Foi realizado também o enriquecimento das espécies de *Enterococcus* com selênio (Selenito de Sódio - Se(IV)). Neste estudo, selecionaram-se os isolados que bioacumularam maior concentração de Se(IV) na biomassa, BAL 14 e BAL 18, identificados como *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente. Os isolados tiveram ótimo crescimento à 35°C por 24 h (DO<sub>600</sub> BAL 14=1,4 e BAL 18=1,5), a remoção ótima do selênio foi verificada com o pH inicial de 7,0 e temperatura de 25°C.

Através da curva de crescimento observou-se que após 8 h de incubação, as culturas BAL 14 e BAL 18 apresentaram a maior produção de biomassa ( $DO_{600}=1,42$  e  $1,41$ ) e bioremoção do Se(IV) ( $14,89$  e  $14,79$  mg L<sup>-1</sup>), respectivamente. Quantidade considerável de selênio foi detectada na biomassa de *E. faecium* ( $0,4599$  mg g<sup>-1</sup> de peso seco) e *E. faecalis* ( $0,4759$  mg g<sup>-1</sup> de peso seco). Estes resultados mostram que estas bactérias podem auxiliar particularmente na redução ou inibição de microrganismos patogênicos, na inibição da oxidação de alimentos e ração animal, bem como reduzir os danos oxidativos provocados pela produção de radicais livres nos organismos vivos. A absorção significativa de Se(IV) pelas espécies de *Enterococcus* observados neste estudo, indicam que estes microrganismos podem ser utilizados para estudos posteriores visando à suplementação alimentar animal, através da utilização da biomassa produzida pelos *Enterococcus* enriquecidos com Se(IV).

**Palavras-chaves:** Bactérias ácido lácticas; *Enterococcus*; Atividade antimicrobiana; Capacidade antioxidante; Probióticos; Selênio.



## ABSTRACT

The lactic acid bacteria (LAB) have an important role in a wide variety of foods, including dairy products, meat and fermented foods. In this study, antimicrobial and antioxidant activities of culture supernatants and intracellular extracts of 36 LAB isolated from meat and dairy products were investigated. These bacterial were identified by 16S rRNA sequencing. GenBank BLAST analysis revealed that all the isolates belong to the genus *Enterococcus*. Three isolates were identified as *E. hirae*, one isolate as *Enterococcus* sp., 17 as *E. faecium* and 15 as *E. faecalis*. Antimicrobial activity against the indicator microorganism *Listeria monocytogenes* was observed for 21 supernatants culture, it is highlighted with the largest inhibition zones the strains IS196 (10.7 mm) and IS197 (11.0 mm), and 7 strains using cell extracts, showed the highest inhibition zones. Strains IS196 (9.7 mm) and IS197 (9.3 mm) were identified as *E. faecium*. Evaluation of antioxidant activity was performed by three different methods. The 36 isolates showed antioxidant activity to determination Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) method with supernatant culture and cell-free extract. Antioxidant capacity was also observed for the scavenger of free radicals by the method of ABTS<sup>•+</sup> (2,2-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) and the capture of the radical DPPH (2,2-diphenyl-1 - picrylhydrazyl). These two methods showed that only supernatant culture samples had antioxidant capacity. The highest antimicrobial and antioxidant activities were observed by *E. faecium*, IS196 and IS197. It also was performed the enrichment of *Enterococcus* species with Selenium (Sodium selenite - Se(IV)). In these study, it was selected the isolates with highest selenium bioaccumulation capacity, LAB 14 and LAB 18, identified as *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively. The isolates had high growth at 35°C for 24 h ( $DO_{600}$  BAL 14=1.4 and BAL 18=1.5), and the Se(IV) removal was maximum at initial pH 7.0 and 25°C. Time course experiment showed that both LAB 14 and LAB 18 had highest biomass production ( $OD_{600}$ =1.42 and 1.41) and Se(IV) bioremoval (14.89 and 14.79 mg L<sup>-1</sup>) respectively after 8 h of incubation. Substantial amount of selenium was detected in biomass of *E. faecium* (0.4599 mg

g<sup>-1</sup> of dry weight and *E. faecalis* (0.4759 mg g<sup>-1</sup> of dry weight). These results showed that these bacteria can particularly help to reduce or inhibit pathogenic microorganisms, in the inhibition of oxidative spoilage in foods and animal feed, as well as, reduce oxidative damage caused by free radical production in living organisms. The significant uptake of Se(IV) by the *Enterococcus* species observed in this study, indicate that they can be used to deliver dietary selenium through feed augmentation with Se(IV)-enriched *Enterococcus* biomass.

**Keywords:** Lactic Acid Bacteria; *Enterococcus*; Antimicrobial Activity; Antioxidant Capacity; Probiotics; Selenium.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

#### Antimicrobial and antioxidant activities among enterococci isolated from meat and dairy products

**TABLE 1.** Antimicrobial activity of culture supernatants and cell extracts of LAB against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644..... 73

### CAPÍTULO III

#### Evaluation of Se(IV) Sorption by *Enterococcus* species with Antimicrobial and Antioxidant Capacity

**TABLE 1.** Selenium accumulation in biomass by isolates LAB 14 (*E. faecalis*) and LAB 18 (*E. faecium*) growing in medium without selenium (control) and medium amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of sodium selenite (Se-IV)..... 99

**TABLE 2.** Effect of Se(IV) concentration on biomass production (OD<sub>600</sub>) and Se(IV) bioremoval after 24 h in medium with sodium selenite at 35°C ustatic incubation of isolates LAB 14 and LAB 18..... 100

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II – Artigo I

#### Antimicrobial and antioxidant activities among enterococci isolated from meat and dairy products

- FIGURE 1.** Phylogenetic tree showing evolutionary distance between lactic acid bacterial isolates based on 16S rRNA gene sequence (500 pb). The scale represents the evolutionary distance value. The number at each node is the bootstrap from 100 replicates..... 75
- FIGURE 2.** Evaluation of culture supernatants of isolates for antioxidant activity using thiobarbituric reactive substances (TBARS) method. *E. faecium* (Fig. 2A); *E. faecalis* (1-38), *Enterococcus* sp. (A33) and *E. hirae* (A3-A111) (Fig. 2B). Results are means  $\pm$  standard error of the mean..... 76
- FIGURE 3.** Evaluation of cell extracts of isolates for antioxidant activity using thiobarbituric reactive substances (TBARS) method. *E. faecium* (Fig. 2A); *E. faecalis* (1-38), *Enterococcus* sp. (A33) and *E. hirae* (A3-A111) (Fig. 2B). Results are means  $\pm$  standard error of the mean..... 77
- FIGURE 4.** Determination of antioxidant capacity of culture supernatants using the ABTS<sup>•+</sup> method. *E. faecium* (Fig. 2A); *E. faecalis* (1-38), *Enterococcus* sp. (A33) and *E. hirae* (A3-A111) (Fig. 2B). Results are means  $\pm$  standard error of the mean..... 78
- FIGURE 5.** Determination of antioxidant capacity of culture supernatants using the DPPH method. *E. faecium* (Fig. 2A); *E. faecalis* (1-38), *Enterococcus* sp. (A33) and *E. hirae* (A3-A111) (Fig. 2B). Results are means  $\pm$  standard error of the mean..... 79

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO III – Artigo II

#### Evaluation of selenite bioremoval from liquid culture by *Enterococcus* species isolated from cheese

- FIGURA 1.** Se(IV) resistance profile an inhibition percentage of 36 bacterial isolates incubated in a medium containing 10 mg L<sup>-1</sup> of sodium selenite at 35°C for 24 h. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments..... 101
- FIGURA 2.** Se(IV) bioremoval LAB isolates after 24 h incubation in medium with 10 mg L<sup>-1</sup> of selenite at 35°C under static condition. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments..... 102
- FIGURE 3.** Phylogenetic tree showing the evolutionary position of isolates among other members of the family *Lactobacillaceae* with *Paenibacillus borealis* as the outgroup organism. The scale represents the evolutionary distance value. The number at each node in the bootstrap from 100 analyses..... 103
- FIGURA 4.** Effect of pH on biomass production (OD<sub>600</sub>) (A); Se(IV) bioremoval (B); and final pH (C) in TSB amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of selenite and incubated at 35°C for 24 h without shaking. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments..... 104
- FIGURA 5.** Effect of temperature on biomass production (OD<sub>600</sub>) (A); and Se(IV) bioremoval (B), after 24 h static incubation in TSB amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of selenite. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments..... 105
- FIGURA 6.** Time course of biomass production (OD<sub>600</sub>) in cultures during 24 h static incubation at 35°C in TSB amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of selenite. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments..... 106

## 1. INTRODUÇÃO

Bactérias ácido lácticas (BAL) em geral, têm sido empregadas na elaboração de diversos produtos alimentícios para humanos, bem como na elaboração de ração animal. Ainda sem qualquer base científica, as BAL eram usadas para melhorar a conservação e as características organolépticas dos alimentos. Com o passar do tempo, novas pesquisas foram surgindo e dados científicos foram sendo acrescidos quanto ao uso destes microrganismos em alimentos. As BAL desempenham um papel primordial no processo de fermentação de derivados lácteos e cárneos, sendo sua utilização um dos métodos mais antigos de preservação e conservação dos alimentos. Isto se deve à sua capacidade de produzir ácido láctico rapidamente, ocasionando o decréscimo do pH dos alimentos, promovendo desta forma um ambiente desfavorável ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e/ ou patogênicos.

As BAL são consideradas bactérias probióticas definidas como “suplemento microbiano vivo, que melhoram o equilíbrio microbiano do intestino e possuem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro”. Os *Enterococcus* constituem um importante grupo de BAL, estando amplamente difundidos na natureza, sendo a este gênero atribuído também a atividade probiótica. Muitas destas espécies têm aplicações na indústria de alimentos sendo utilizadas como culturas iniciadoras em leites fermentados, queijos e soro de leite. Certas substâncias antimicrobianas são produzidas pelo gênero *Enterococcus*, que auxiliam na manutenção da qualidade, principalmente, dos produtos lácteos processados, suprimindo o crescimento tanto de microrganismos deteriorantes quanto de bactérias potencialmente patogênicas.

A utilização de probióticos também tem sido aplicada em ração animal. Uma vez introduzidos no organismo animal, podem colonizar o novo ambiente, promover um melhor equilíbrio no intestino, produzir enzimas digestivas e vitaminas do complexo B, e ainda estimular a imunidade da mucosa intestinal, protegendo-a contra toxinas pré-formadas por outros organismos.

Juntamente com os probióticos estão sendo utilizados micronutrientes que beneficiam a saúde dos homens e dos animais. Um dos micronutrientes utilizados para a elaboração de suplementos probióticos na nutrição humana e animal é o Selênio (Se). Este micronutriente é essencial a muitos processos fisiológicos podendo ser encontrado no solo, nas plantas, em humanos e nos animais. Este elemento, tanto na sua forma inorgânica (selenito de sódio (Se(IV)) e selenato de sódio (Se(VI)) quanto na sua forma orgânica (Selenometionina (SeMet) e Selenocisteína (SeCis)) têm recebido atenção especial recentemente, com relação ao seu papel na prevenção de várias doenças como doenças do coração, tumores e cânceres.

A atividade antimicrobiana das BAL tem sido estudada pelo seu potencial em inibir microrganismos patogênicos, como a *Listeria monocytogenes*. Esta bactéria tornou-se um importante patógeno nas doenças transmitidas por alimentos, principalmente em derivados lácteos, podendo levar a doença chamada de listeriose. A gravidade desta doença depende das condições imunológicas do hospedeiro e do tipo de infecção. Deste modo, a atividade antimicrobiana expressa pelas espécies BAL possuem importância significativa não só para os humanos e animais, como também, para a indústria de alimentos e ração animal, podendo prevenir ou inibir o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes ou patogênicos.

Outro fator importante relacionado às BAL refere-se à atividade antioxidante. Esta atividade está sendo investigada pela contribuição que pode proporcionar na inibição da oxidação dos alimentos, bem como pela prevenção ou inibição dos danos oxidativos provocados aos organismos vivos pela produção de radicais livres.

Baseado neste contexto, objetivou-se identificar geneticamente as BAL em estudo, através do seqüenciamento do rRNA da região 16S, avaliar a atividade antimicrobiana destes microrganismos frente ao microrganismo indicador, *L. monocytogenes*, bem como, avaliar a atividade antioxidante através da inibição da peroxidação lipídica pela determinação dos níveis das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), habilidade em seqüestrar os radicais livres

presentes nos extratos celulares pelo método do ABTS<sup>•+</sup> (2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico)), e a capacidade em capturar os radicais livres através do método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Avaliou-se ainda, a capacidade das BAL em bioacumular selênio na biomassa, adicionado na forma de selenito de sódio (Se(IV)).



## **CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica**

### **BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS E SEUS BENEFÍCIOS COMO CULTURAS PROBIÓTICAS ASSOCIADAS COM O USO DE SELÊNIO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

## 2. CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica

### 2. 1. Bactérias Ácido Lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuídos nos alimentos, produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo: toxinas, enzimas bacteriolíticas, subprodutos de via metabólica (ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio) e bacteriocinas, que são proteínas ou complexos de proteínas com atividade antibiótica, produzidas por determinadas linhagens de BAL que se caracterizam por apresentarem um espectro de ação restrito aos microrganismos Gram-positivos (DE VRESE et al., 2001; ISOLAURI et al., 2001; JACKSON et al., 2002; HILDE et al., 2003; KHEDID et al., 2009).

São microrganismos anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos que apresentam melhor desenvolvimento em meios com baixas tensões de oxigênio. Apresentam-se sob a forma de cocos ou bacilos, não esporulados, não redutores de nitrato a nitrito, gelatinase negativos e incapazes de utilizar o lactato. São bactérias consideradas quimiorganotróficas, basicamente sacarolíticas, atuando preferencialmente sobre carboidratos. Classificam-se como mesófilas ou termófilas, com temperaturas ótimas de crescimento variando de 30 à 37°C e 45 à 50°C, respectivamente. São produtoras de ácido láctico como produto do metabolismo primário e, ineficientes quanto à produção de energia, necessitando de grande quantidade de açúcar, vitaminas do complexo B e alguns aminoácidos, em determinadas espécies, para obtenção de energia suficiente para a biossíntese e reprodução (CARR et al., 2002; DE MARTINIS et al., 2002; FERREIRA, 2003).

Esse grupo de microrganismos não possui catalase, com exceção de algumas espécies de *Pediococcus*, que produzem pseudocatalase. Algumas bactérias na presença de sangue ou de hematina também podem produzir catalase ou citocromos, formando uma cadeia de transporte de elétrons ativa e, desta forma, promovendo a respiração. As BAL reagem positivamente às

colorações de Gram, azul de metileno e rezarsurina, e são usualmente imóveis e obrigatoriamente fermentadoras (BARBOSA et al., 2001; FERREIRA, 2003).

O isolamento e a identificação de microrganismos a partir de fontes naturais tem sido uma ferramenta amplamente utilizada para a obtenção de linhagens úteis e geneticamente estáveis (ADNAN & TAN, 2007). As BAL são importantes na conservação de alimentos devido à sua capacidade de interferir na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas, por meio de vários mecanismos, tais como, a produção de substâncias antagonistas (ADAMS & NICOLAIDES, 1997). Isto explica a ampla utilização das BAL em produtos alimentícios, sendo suas propriedades utilizadas na produção de queijos, iogurtes, leites fermentados, bebidas, salsichas e outros produtos cárneos. Com o desenvolvimento dos produtos probióticos, as BAL têm sido fonte de várias pesquisas devido aos vários possíveis benefícios à saúde que advêm de seu consumo (FEORD, 2002).

A principal função das BAL nos alimentos é a acidificação dos produtos alimentares em um pH próximo à 4, que impede o desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos, principalmente, ácidos lácticos. Isso permite que o período de conservação dos produtos fermentados seja muito maior que a dos produtos onde a matéria-prima não seja fermentada (BROMBERG et al., 2006). Outras funções atribuídas a estes microrganismos nos alimentos são: o aumento de vida de prateleira de alimentos perecíveis, a conservação das propriedades nutricionais, o aumento da biodisponibilidade de nutrientes, o incremento no sabor dos alimentos quando comparados à matéria prima original e, também, a capacidade de conferir maior segurança alimentar para o produto. A fabricação de alimentos e bebidas fermentadas na indústria segue alguns processos controlados de fermentação, utilizando microrganismos iniciadores selecionados, garantindo uniformidade e qualidade ao produto final (GUEDES NETO, 2004).

As BAL constituem um importante grupo de microrganismos empregados nas indústrias e algumas delas podem ser adicionadas em alimentos com diferentes finalidades: aumentar a segurança (inativação de patógenos); estender a vida de prateleira através da inibição de microrganismos que causem mudanças

indesejáveis nas características sensoriais; modificar as características da matéria-prima para obter novas características sensoriais (culturas *starters* ou iniciadoras) e trazer benefícios para a saúde (probióticos) (LÜCKE, 2000). Do mesmo modo, Cintas et al. (1998); Työppönen et al. (2003) relatam que a utilização destas bactérias como culturas *starters* em processos de fermentação e seu uso, ou a adição de seus metabólitos antibacterianos, tem aumentado consideravelmente como forma de bioproteção em alimentos frescos ou aumentando a vida útil do alimento, com garantia de segurança alimentar.

As BAL adicionadas aos alimentos com a finalidade de inibir patógenos ou prolongar a vida de prateleira dos alimentos são denominadas culturas protetoras (BUDDE et al., 2003; LÜCKE, 2000). Estas bactérias podem interferir com a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de vários mecanismos: competição por nutrientes e oxigênio, competição por sítios de ligação e produção de substâncias antagonísticas, especialmente através de peptídeos antimicrobianos (HUGAS, 1998).

Os principais gêneros de BAL Gram-positivos são *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (MOGENSEN et al., 2003). Dentre os gêneros de BAL citados acima, destacamos neste trabalho, em especial, os *Enterococcus*.

## **2.2. *Enterococcus***

Os *Enterococcus* apresentam-se na forma de cocos Gram-positivos que geralmente se dispõem em pares e cadeias curtas. São anaeróbios facultativos e a temperatura ótima de crescimento é 35°C, embora a maioria dos microrganismos se desenvolvam entre 20 e 45°C. Apresentam crescimento rápido, podem ser cultivados na presença de altas concentrações de sal (NaCl a 6,5%), toleram sais biliares à 40% e podem hidrolisar a esculina (um açúcar complexo, fluorescente sob luz ultravioleta (UV)). Estas propriedades básicas podem ser utilizadas para distinguir *Enterococcus* de outros cocos Gram-positivos, catalase

negativos. Testes fenotípicos selecionados como, por exemplo, reações de fermentação, hidrólise da pirrolidoni-beta-naftilamida, motilidade e produção de pigmento, são necessários para diferenciar as espécies de *Enterococcus* (MURRAY et al., 1998; FACKLAM, et al., 1999).

Bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* apresentam um papel importante na produção de vários alimentos fermentados (FRANZ et al., 2003). Estudos sobre a microbiota de vários queijos tradicionais de países do Mediterrâneo indicam que os *Enterococcus* sp. estão relacionados com a maturação desses queijos, provavelmente através da proteólise, lipólise e quebra do citrato, contribuindo para o sabor característicos (MORENO et al., 2006). Estas bactérias podem também estar presentes em outros tipos de alimentos fermentados, como lingüiças e azeitonas (HUGAS et al., 2003).

Atualmente algumas bactérias do gênero *Enterococcus* estão sendo usadas como probióticos em alguns países (FRANZ et al., 2003), tais como o *E. faecium* e o *E. faecalis*. No Brasil, a ANVISA (2002) já inclui o *E. faecium* na lista dos microrganismos probióticos. Na União Européia, desde fevereiro de 2004, 10 preparações contendo 9 linhagens diferentes de *E. faecium*, estão autorizadas como aditivos em alimentos (MORENO et al., 2006).

O *E. faecium* é uma bactéria não patogênica, com um tempo de geração de 19 minutos, diferente do *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium* que é de aproximadamente 60 minutos. Com reprodução três vezes mais rápida, seu efeito na remoção de floras patogênicas nos intestinos, é mais efetivo. É mais resistente ao ácido do estômago, sendo menos inibido quando veiculado por suplemento oral, com conseqüente colonização mais rápida nas paredes intestinais. Os efeitos do *E. faecium* na flora intestinal são freqüentemente visíveis nos primeiros dias após sua ingestão, o que não é observado com outros produtos contendo *Lactobacillus* sp. (REDONDO, 2008).

Vários estudos têm sido realizados utilizando-se *E. faecium*. Rossi et al. (1994) realizaram um estudo com um “iogurte” de soja fermentado por *Enterococcus faecium* CLR 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* 416, no qual demonstraram capacidade de redução do colesterol total e de aumento no

colesterol HDL - lipoproteína de alta densidade, em coelhos hipercolesterolêmicos. Rossi et al. (2000), também observaram efeitos semelhantes em ratos hipercolesterolêmicos e em humanos normocolesterolêmicos e, concluíram que os efeitos observados são, em grande parte, decorrentes da presença dos microrganismos viáveis no produto. Do mesmo modo, Kinouchi et al. (2006) demonstraram recentemente uma atividade anticarcinogênica em fêmeas de camundongos com câncer de mama biologicamente induzido, ao receber uma dieta contendo um produto a base de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp. *jugurti* 416. Os animais que consumiram este produto apresentaram um volume menor do tumor comparado aos demais grupos. Ainda com relação à atividade anticarcinogênica do *E. faecium*, Sivieri et al. (2007) observaram uma redução de 40% na incidência de tumores de cólon em ratos quimicamente induzidos e que ingeriram uma suspensão oral desse microrganismo em uma concentração diária de  $10^8$  UFC/mL.

Além destes dados, outros estudos a respeito do isolamento e caracterização de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus* spp., chamadas enterocinas, têm sido realizados. As enterocinas têm sido isoladas a partir de linhagens de diferentes fontes, incluindo alimentos (queijo, carne, peixe e vegetais), animais e humanos. Estas podem ser ativas contra patógenos de origem alimentar, tais como *Listeria* spp. e *Clostridium* spp. (FARIAS et al., 1994; MENDONZA et al., 1999). Já foi comprovada a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram negativas como *Escherichia coli* (TOMITA et al., 1997) e *Vibrio cholerae* (SIMONETTA et al., 1997). Além disso, Wachsmann et al. (1999) registraram atividade antiviral da enterocina CRL35.

### **2.3. Probióticos**

Os efeitos benéficos dos leites fermentados tiveram sua base científica no começo do século XX, com o microbiologista russo Eli Metchnikoff, cientista do Instituto Pasteur que ganhou o prêmio Nobel em 1908. Ele propôs uma teoria sobre o prolongamento da vida, baseado no consumo diário de leites fermentados

pelos povos dos Bálcãs, associado a sua grande longevidade e boa saúde física com o elevado consumo deste tipo de alimento. Afirmou pela primeira vez que a dependência dos microrganismos intestinais, com respeito aos alimentos, se faz possível adotando medidas para modificar a flora do nosso organismo e substituir os microrganismos nocivos por microrganismos úteis (METCHNIKOFF, 1907). O pediatra Henry Tissier observou que as crianças com diarreia teriam em suas fezes um número escasso de bifidobactérias, ao contrário das crianças saudáveis, sugeriu então, que este tipo de bactéria poderia ser administrada em pacientes com diarreia para restaurar a flora intestinal (TISSIER, 1906). Ele acreditava que a atividade metabólica das BAL inibiria as bactérias intestinais do mesmo modo que inibem a putrefação dos alimentos. Suas publicações "The prolongation of life" e "The bacillus of long life" podem ser consideradas o nascimento dos alimentos probióticos (THAMER & PENNA, 2005).

O termo probiótico foi utilizado pela primeira vez, no ano de 1965 por Lilly & Stillwell, para descrever em um princípio aquelas substâncias secretadas por um microrganismo que estimula o crescimento de outros microrganismos (LILLY & STILLWELL, 1965), no entanto, posteriormente, estes microrganismos foram incluídos em produtos dietéticos que contribuem no balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989).

Inúmeras definições do termo "probiótico" foram usadas ao longo dos anos, mas segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations - World Health Organization (FAO - WHO) e a Associação Científica Internacional para Probióticos e Prébióticos (REID et al., 2003) exemplifica melhor o termo probiótico conhecido atualmente: "Microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro". Esta definição corrobora também com os autores Shah (2001), Puupponen-Pimiä et al. (2002), Sanders (2003) e Saad (2006).

Os alimentos probióticos são aqueles que carregam ou são produzidos por bactérias probióticas originadas do trato gastrintestinal humano quando o produto se destina ao consumo humano ou do trato intestinal de uma determinada espécie animal quando se destina à alimentação animal. Esses alimentos fazem parte do

mercado de alimentos funcionais e estão disponíveis em vários formatos, principalmente como, formulações para animais, produtos farmacêuticos, produtos de confeitaria e produtos lácteos fermentados ou não (FERREIRA, 2003).

Os probióticos são classificados pelo Food and Drug Administration (FDA) como microrganismos GRAS (Generally Regarded as Safe), ou seja, microrganismos seguros cuja essência de seu uso refere-se ao equilíbrio da microflora intestinal através da adição de microrganismos benéficos. As características essenciais para um microrganismo ser considerado probiótico são: ser habitante normal do trato gastrintestinal do hospedeiro; sobreviver, crescer e se fixar ao epitélio intestinal; enfrentar condições adversas, como a produção de sais biliares, sucos gástrico, pancreático e entérico; colonizar o intestino e ter capacidade antagônica às bactérias prejudiciais. Deve ser atóxico e não-patogênico para seu hospedeiro, sendo cultivável em escala industrial, tendo alta viabilidade e estabilidade no produto comercial e apresentar efeito benéfico comprovado para o hospedeiro (GOLDIN, 1998; FRANCO et al., 2006).

Hugas & Monfort (1997) consideram ainda como probióticos, as linhagens de microrganismos que possuem a capacidade de resistir a condições ácidas, à ação da bile, lisozima e colonizar o trato intestinal humano, ao menos temporariamente, mediante a adesão às células intestinais. Além dessas características, somam-se outras condições complementares necessárias às culturas probióticas como: rápido crescimento; permanência no intestino por um período aceitável; resistência aos antibióticos, normalmente presentes nos alimentos, porém, sensibilidade àqueles usados em tratamentos contra bactérias ácido lácticas (penicilinas e aminoglicosídeos); e ausência de propriedades patogênicas, tóxicas, alérgicas, mutagênicas ou carcinogênicas.

Pelicano et al. (2002); Saad (2006) mencionam três possíveis mecanismos de atuação que são atribuídos aos probióticos. Primeiro, a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. Segundo, a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. Terceiro, o estímulo da imunidade do



hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos, imunológicos e antimicrobianos.

Muitos benefícios para a saúde têm sido relacionados ao consumo de organismos probióticos (VANDERHOOF & YOUNG, 1998; SHAH, 2000). Em geral, dependendo da linhagem empregada e do efeito benéfico desejado, o consumo de bactérias probióticas entre  $10^8$  e  $10^{11}$  UFC/dia é recomendável (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000). A maioria dos microrganismos probióticos pertence ao grupo das BAL, incluindo os gêneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* e *Streptococcus*; espécies não ácido-láticas, tais como, *Bacillus cereus* e *Propionibacterium freudenreichii*; e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* (HOLZAPFEL et al., 2001). Porém, faz-se necessário conhecer a segurança que os probióticos oferecem ao serem ingeridos. Desta forma, existe a legislação da União Européia (UE) que regula a comercialização e o uso dos probióticos, suplementos dietéticos e alimentos funcionais. No Brasil, o uso de probióticos foi regulamentado pela Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002, que aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde, incluindo o *E. faecium* (ANVISA, 2002; LÓPEZ-BREA & DOMINGO, 2007).

As BAL habitantes naturais do trato gastrintestinal agem efetivamente como probiótico, aderindo-se ao epitélio intestinal e colonizando o trato gastrintestinal. Outras bactérias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyos* e *Bifidobacterium bifidum* são utilizados combinados, isolados, ou às vezes, associados às leveduras, enzimas e outros agentes, com a finalidade de auxiliar as BAL na sua colonização (FRANCO et al., 2006). Segundo Pupin (2002), o consumo de produtos contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, tem a potencialidade de melhorar os movimentos peristálticos do intestino, aumentando a absorção de nutrientes, prevenindo ou controlando infecções intestinais, bloqueando os receptores dos patógenos, inativando os efeitos das enterotoxinas e favorecendo o desenvolvimento de microrganismos resistentes a patógenos. Além disso, tem a

capacidade de melhorar a digestão da lactose em pessoas consideradas como lactose-intolerantes, metabolizar alguns tipos de fármacos, reduzem o nível de colesterol e o risco de câncer de cólon. Saarela et al. (2000), menciona em seu trabalho que as propriedades anticarcinogênicas de certas bactérias podem ser explicadas pela ligação e degradação de pró-carcinogênicos, produção de compostos antimutagênicos, modulação de enzimas pró-carcinogênicas no intestino e supressão de tumores pelo mecanismo de resposta imune.

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. Embora ainda não comprovados, outros efeitos atribuídos a essas culturas são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular. É sugerida também, a diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos e antitumorais, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (KAUR et al., 2002; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002; TUOHY et al., 2003; SAAD, 2006).

Para Franco et al. (2006), os probióticos atuam como moduladores do ecossistema digestivo, desempenhando funções benéficas aos animais e ao homem, tais como: proteção ecológica (inibindo patógenos); imunomodulação (atuam como antígenos, potencializando resposta imunológica no hospedeiro) e contribuição físico-nutricional (regula a fisiologia digestiva, fornece vitaminas e fontes energéticas).

## 2.4. Utilização de probióticos como promotores de crescimento

Atualmente, pesquisas com probióticos têm sido impulsionadas em animais por dois motivos complementares. De um lado, a demanda crescente por métodos mais conservacionistas para o tratamento e a prevenção de infecções, buscando obter maior conscientização da população leiga. Por outro, a preocupação da comunidade científica com o surgimento de linhagens de microrganismos resistentes e com o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos. Por este motivo, uma área que tem se mostrado bastante promissora é a da utilização de probióticos como promotores de crescimento e de sanidade de animais de produção, em substituição às doses subterapêuticas de antibióticos, comumente utilizadas em rações de animais criados intensivamente, como aves e suínos (GUERRA et al., 2007). O uso indiscriminado dos antibióticos na alimentação animal desde o princípio da década de 50 pode ter resultado no desenvolvimento de populações bacterianas resistentes, determinando desequilíbrio na simbiose entre o microbiota desejável e o animal (FULLER, 1992). Desta forma, torna-se evidente a necessidade de estudos de produtos alternativos que possam substituir os antibióticos na alimentação animal, sem causar perdas de produtividade e qualidade dos produtos finais. Os prováveis substitutos promotores de crescimento devem manter as ações benéficas dos antibióticos e eliminar as indesejáveis, como a resistência bacteriana.

Uma alternativa seria a substituição dos antibióticos por culturas probióticas. O uso de probiótico como promotor de crescimento pode resultar em maior ganho de peso, melhor índice de conversão alimentar, maior rendimento de carcaça e melhor palatabilidade da carne (BERTECHINI & HOSSAIN, 1993; ENGLAND et al., 1996; JIN et al., 1998).

A eficácia do probiótico é estritamente dependente da quantidade e das características das linhagens do microrganismo utilizado na elaboração do aditivo alimentar. Para um microrganismo ser considerado eficaz como probiótico deve atender alguns requisitos como, por exemplo, sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal (ação da bile e dos sucos gástricos, pancreáticos e

entéricos); não ser tóxico e/ou patogênico; ter capacidade antagonista às bactérias intestinais indesejáveis; ser altamente viável e estável durante a estocagem, além de, comprovadamente ser benéfico ao hospedeiro (JIN et al., 1997).

Preparações de bactérias vivas de gênero *Ruminobacter*, *Lactobacillus*, *Succinovibrio*, *Bacillus*, *Streptococcus* e outros, chamadas de probióticos, são comumente adicionadas como suplementação dietética para manter e esterilizar uma população de organismos benéficos do trato gastrintestinal, melhorando desta forma o crescimento e a eficiência na utilização de alimentos de bovinos (ÁVILA et al., 2000).

Abe et al. (1995) estudaram os efeitos da administração de um probiótico contendo *Bifidobacterium thermophilum*, *Enterococcus Faecium* e *Lactobacillus acidophilus* no ganho de peso de leitões e bezerros recém-nascidos. A frequência de diarreia em leitões e bezerros foi menor nos grupos tratados com o probiótico. A média de ganho de peso dos bezerros, após 90 dias de experimento, foi 40% maior no grupo tratado com o probiótico quando comparado ao grupo de controle.

Portanto, o papel do probiótico como biorregulador microbiano é manter o equilíbrio da microbiota intestinal, tendo como principal função impedir a colonização intestinal por bactérias patogênicas e o aumento do ganho de peso animal (ABE et al., 1995).

Além da utilização de probióticos como promotores de crescimento, estão sendo utilizados micronutrientes que agregam benefícios a saúde do hospedeiro, como por exemplo, o selênio.

## 2.5. Selênio

O selênio (Se) é considerado um micronutriente importante em muitos processos bioquímicos e fisiológicos e, portanto, possui fundamental importância para a saúde dos seres humanos e dos animais, cuja principal fonte é a dieta (HILL et al., 2003). Este micronutriente pertence ao grupo 16 da tabela periódica localizado entre o enxofre e o telúrio, podendo ser encontrado em quatro estados de valência que são 0, II, IV e VI (PAPP et al., 2007).

O selênio possui três níveis de atividade biológica: 1) pequenas concentrações são requeridas para o crescimento e desenvolvimento normais; 2) concentrações moderadas podem ser estocadas para manutenção das funções homeostáticas; e 3) concentrações elevadas que podem resultar em efeitos tóxicos (HAMILTON, 2004). Do mesmo modo, Ganther (1999), relata que o selênio pode ser tanto um elemento essencial, quanto tóxico, dependendo da concentração utilizada. Tanto os sinais de deficiência quanto os efeitos tóxicos do excesso de selênio incluem: redução do crescimento, letargia, diminuição das funções hepáticas, diminuição do peso do fígado, diminuição na performance reprodutiva, catarata, diminuição dos níveis de hemoglobina e aumento na incidência de câncer.

No corpo humano, o selênio está presente em quase todas as células, sendo mais abundante nos rins, fígado, baço, pâncreas e testículos (NYMAN et al., 2004). Sabe-se que nos tecidos o selênio está presente em duas formas: selenometionina (SeMet) e selenocisteína (SeCis). A SeMet não pode ser sintetizada no organismo e deve ser fornecida pela dieta. Esta forma pode substituir a metionina em uma variedade de proteínas. A SeMet é considerada como uma forma de depósito de selênio no corpo humano. Quando o suporte de selênio da dieta é interrompido, este compartimento é movimentado e repõe o selênio no organismo. O selênio constituinte das proteínas, denominadas selenoproteínas, algumas das quais têm funções enzimáticas importantes, está na forma de SeCis sendo a forma biológica ativa do selênio. A SeCis é um composto análogo da cisteína contendo selênio, considerada o 21º aminoácido codificado do DNA. São exemplos de selenoproteínas que contêm SeCis: a glutathione peroxidase, a iodotironina deiodinase, a selenoproteína P, a selenoproteína W e a tiorredoxina redutase (BURTIS & ASHWOOD, 2001; HILL et al., 2003).

Considerado um micronutriente importante para a saúde humana e animal, o selênio tem sido alvo de várias pesquisas. Dados epidemiológicos mostraram que este micronutriente pode interagir com as vitaminas A e E na prevenção do desenvolvimento de tumores e na terapia da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Merian (1991) relata em seu

trabalho que dos 39 estudos publicados a partir de 1949, 34 demonstraram que o selênio foi capaz de diminuir o crescimento de tumores. Os possíveis mecanismos para o selênio atuar como medida de proteção contra a ocorrência de tumores seria a diminuição da concentração dos radicais livres e hidroperóxidos nos tecidos via ação da glutathione peroxidase, mecanismo este dependente de selênio.

Além da proteção contra o câncer, o selênio pode proteger o coração, principalmente, por reduzir o risco de formação de coágulos, diminuindo desta forma o risco de acidente vascular cerebral (AVC). Quando este micronutriente é administrado juntamente com a vitamina E, na sua forma inorgânica pode ter efeito protetor para o estresse oxidativo, ou seja, exercer atividade antioxidante e, na sua forma orgânica parece apresentar também alguns benefícios antiinflamatórios (TAKASSAGO et al., 1997).

Por outro lado, a importância do selênio na alimentação animal e nos seus processos fisiológicos tem sido relatada na literatura. Lacetera et al. (1996) verificaram aumentos significativos na produção de leite, em vacas suplementadas com 5 mg de selenito de sódio (Se(IV) para cada 100 Kg<sup>-1</sup> de peso vivo. De acordo com estudo realizado por Kim et al. (1997), o selenito e selenato de sódio podem ser reduzidos a selênio elementar (Se<sup>0</sup>) pelos microrganismos ruminais como um meio de destoxificação. Os microrganismos podem também incorporar selênio na proteína microbiana. Desse modo, este micronutriente na ração animal, presente na forma inorgânica, pode ser absorvido no intestino delgado na forma orgânica.

Muitos processos têm sido estudados visando à produção de biomassa microbiana de alto valor protéico a partir de uma fonte de carbono orgânica e nitrogênio inorgânico. Essa biomassa pode ser usada em gêneros alimentícios para humanos ou em ração animal, para substituir fontes protéicas tradicionais de plantas e animais (BOZE et al., 1995). Os *Enterococcus* têm sido utilizados em diversas pesquisas visando à produção da biomassa bacteriana. A biomassa produzida por este tipo de bactéria tem sido utilizada como fonte de micronutrientes, em especial de selênio. Em comparação com as plantas, como

fonte de selênio, a biomassa bacteriana apresenta maior teor de proteína, conseqüentemente, mais selênio pode ser incorporado, devido à substituição do enxofre participante na formação da proteína (DE LEON & BAYON, 2002).

## **2.6. Atividade antimicrobiana exercida pelas Bactérias Ácido Lácticas (BAL)**

A atividade antimicrobiana das BAL têm sido relatada por diversos autores (ALEXANDRE et al., 2002; O'SULLIVAN et al., 2002; FRIEDMAN et al., 2003; KATHARIOU, 2004; MADIGAN et al., 2004; GUEDES NETO et al., 2005; MAKINO et al., 2005; PINTADO et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2005). Estas bactérias possuem um grande potencial de uso como bioconservadores por serem considerados microrganismos seguros para o consumo (ANVISA, 2002). Durante o armazenamento, preservam os alimentos, bem como as características sensoriais e são também capazes de inibir microrganismos indesejáveis, tais como *Listeria monocytogenes*.

A *Listeria* spp. é um microrganismo que se encontra amplamente disseminado na natureza e tem sido isolado do solo, de fezes humanas e de animais. Todas as espécies de *Listeria* são encontradas na natureza e podem, eventualmente, contaminar os alimentos, porém somente a *L. monocytogenes* tornou-se um importante patógeno nas doenças transmitidas pelos alimentos (SCHWAB & EDELWEISS, 2003).

A *L. monocytogenes* é patogênica para o homem e animais, e sua ampla distribuição ambiental, igual às outras espécies, é favorecida pela sua capacidade de se desenvolver entre 0°C e 44°C, embora sua faixa ótima de crescimento seja entre 30°C e 37°C, porém, esta espécie pode sobreviver em alimentos congelados. Tolerância a pHs extremos de 5 a 9, baixa atividade de água e concentrações de NaCl de 10% ou superiores. Este conjunto de características faz com que a *L. monocytogenes* seja considerada como um patógeno emergente de grande interesse na área de alimentos e explica o destaque que este microrganismo vem ocupando nos últimos anos no controle de qualidade na

indústria de alimentos, visto às dificuldades de sua eliminação, assim como, a possibilidade de causar uma doença grave no consumidor, a listeriose (PEREIRA & ROCOURT, 1993; LANDGRAF, 1997; CATÃO & CEBALLOS, 2001).

Diversos surtos e casos de listeriose relacionados com leite e seus derivados têm sido descritos (KATHARIOU, 2004; MAKINO et al., 2005; PINTADO et al., 2005), entretanto, no Brasil, não existem estatísticas oficiais, sendo pouco difundidas as notificações de surtos e principais microrganismos envolvidos em doenças de origem alimentar.

As BAL possuem um papel essencial na fermentação dos alimentos, visto que uma grande variedade de linhagens tem sido utilizada rotineiramente como culturas *starter* na fabricação de produtos lácteos, cárneos e vegetais. A principal contribuição destes microrganismos para os alimentos é de preservar as qualidades nutritivas da matéria-prima, prolongar a vida útil de prateleira e inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas. Isto se deve a competição por nutrientes e a presença de inibidores produzidos pelas culturas *starter* incluindo os ácidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio (O'SULLIVAN et al., 2002). Além disso, as BAL podem produzir peptídeos biologicamente ativos, com atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, denominados bacteriocinas. Estes compostos protéicos podem agir inibindo (efeito bacteriostático) ou destruindo (efeito bactericida) espécies relacionadas. A inclusão de compostos similares, com ação sobre uma diversidade maior de espécies, e cuja estrutura é formada por outros grupos funcionais (carboidratos, lipídeos), possibilitou uma definição mais ampla das bacteriocinas (MADIGAN et al., 2004; BROMBERG et al., 2006).

As bacteriocinas produzidas por BAL têm despertado grande interesse científico e industrial devido ao seu potencial como bioconservadores alimentares (ALEXANDRE et al., 2002; MADIGAN et al., 2004; FRANCO et al., 2006). O potencial de aplicação das bacteriocinas como bioconservadores de alimentos requer um conhecimento aprofundado de como elas exercem o seu efeito bactericida. Para muitas bacteriocinas o modo de ação parece ocorrer inicialmente ao nível da membrana citoplasmática. Tem sido proposto que estes peptídeos formem poros transversalmente à bicamada fosfolipídica, causando a



permeabilização da membrana e perda da força protomotora das células sensíveis (KLAENHAMMER, 1993).

Devido à grande importância econômica das BAL para a indústria de alimentos e bebidas fermentados, estudos sobre a fisiologia, bioquímica, genética, e biologia molecular das bacteriocinas tiveram um avanço significativo, permitindo a elucidação das estruturas e dos mecanismos de ação de muitos desses compostos. Além disso, o reconhecimento dos microrganismos *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157:H7 e *Salmonella* como principais patogênicos de alimentos fez aumentar o interesse no desenvolvimento de novos métodos para a obtenção de alimentos seguros (FRIEDMAN et al., 2003). Com isto, as pesquisas com BAL relacionadas ao uso de linhagens produtoras de bacteriocinas foram retomadas por pesquisadores visando à inibição de *L. monocytogenes* (ALEXANDRE et al., 2002; DÍAZ, et al., 2003; GUEDES NETO et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2005). Algumas bacteriocinas já possuem seu potencial de ação bem determinado como antimicrobiano, assim como sua possível aplicação como bioconservantes de alimentos. As únicas bacteriocinas com potencial de aplicação prática em alimentos são as produzidas por BAL, as quais são consideradas GRAS pela FDA (MONTVILLE & WINKWOSKI, 1997).

Na literatura encontram-se diversos trabalhos (DABÉS et al., 2001; ALEXANDRE et al., 2002; MARTINS et al., 2006; PEREIRA & GÓMEZ, 2007; BELGACEM et al., 2010) que tratam da atividade antimicrobiana exercida pelas BAL, bem como da produção de peptídeos biologicamente ativos. Alexandre et al. (2002) isolaram-se 192 linhagens de BAL de cinco amostras de queijo-de-minas artesanal, sendo que 48 destas cepas isoladas (25%) foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de microrganismos indicadores, dentre os quais *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Dabés et al. (2001) realizaram um estudo com 288 linhagens de BAL isoladas de produtos cárneos. Pelo teste de inibição direta, relataram que 59 destas linhagens foram capazes de inibir *in vitro* o desenvolvimento da *Listeria monocytogenes* e do *Staphylococcus aureus*, o que demonstra produzirem compostos inibitórios. Martins et al. (2006) realizaram um estudo com 36 BAL isoladas de fezes suínas. Estes isolados foram avaliados

pela sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores (*Salmonella typhi* ATCC 6539, *Campylobacter jejuni* ATCC 29428, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538). Todas as linhagens de BAL avaliadas levaram a formação de halo de inibição sobre pelo menos dois dos microrganismos indicadores testados. Pereira & Gómez (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana, pelo teste de multicamadas e difusão em ágar, do *Lactobacillus acidophilus* La5, frente ao crescimento de dois microrganismos patogênicos veiculados por alimentos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os melhores resultados de inibição foram obtidos pelo método de difusão em ágar, com halos de inibição de 14,75mm e 15,0mm de diâmetro para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Belgacem et al. (2010), isolaram bactérias gram-positivas de um produto cárneo fermentado artesanal da Tunísia. Destes isolados, 24 linhagens apresentaram atividade antimicrobiana e foram identificadas como *Enterococcus faecium*, através do seqüenciamento do gene do rRNA das regiões 16S e 23S. Todos os isolados produziram bacteriocinas com atividade inibitória contra as bactérias presentes nos alimentos incluindo, *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* CECT 877.

## 2.7. Atividade Antioxidante

Antioxidantes são substâncias capazes de inibir a oxidação, diminuindo a concentração dos radicais livres no organismo e/ ou quelando íons metálicos, prevenindo a peroxidação lipídica (RODRIGUES et al., 2003). Para Barreiros et al., (2006); Halliwell & Gutteridge (1999), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

Segundo Siqueira et al. (1997), nutrientes antioxidantes são substâncias que agem nos sistemas biológicos, eliminando os oxidantes ou impedindo a sua transformação em produtos mais tóxicos. A maioria deles é de natureza exógena e precisam ser ingeridos na dieta como antioxidantes em si ou como precursores. Podem ser divididos em: vitaminas lipossolúveis:  $\beta$ -caroteno (Pró-vitamina A), e  $\alpha$ -

tocoferol (vitamina E); vitaminas hidrossolúveis: Ácido Ascórbico (vitamina C); Oligoelementos: Zinco, Cobre, Selênio, Magnésio, e outros como: Glicose, Tióis, Taurina, Ácido Úrico e Glutamina.

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes, devido principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. Nas últimas décadas, os radicais livres têm sido foco de inúmeras pesquisas, uma vez que estão envolvidos em inúmeros processos fisiopatológicos de diversas doenças humanas. Com frequência, encontram-se artigos relacionados às Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs) que, por seu caráter multidisciplinar, tem atraído a atenção de uma grande parcela da comunidade científica (COS et al., 2001). Existem diversas definições na literatura para o termo radical livre. São átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. Podem ainda, serem considerados como qualquer espécie capaz de existir independentemente, que contenha um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, dentro de regiões específicas denominadas orbitais. Este não-emparelhamento de elétrons da última camada eletrônica confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (VÁSQUEZ-VIVAR et al., 2001; SOARES, 2002; JANSEN, 2003).

A peroxidação dos lipídeos ou lipoperoxidação (LPO) das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis à oxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Este processo promove grave alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana. Além disso, tem sido observada perda da seletividade na troca iônica, com liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos até a morte celular (SIQUEIRA et al., 1997; BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos alvos mais atingidos em decorrência do processo da

peroxidação lipídica, já que ocasiona alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. A perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e a formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA), culminando com a morte celular, são algumas das conseqüências do processo lipoperoxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; COS et al., 2001).

Embora os seres humanos e outros organismos vivos possuem sistemas de defesa antioxidante e de reparação que evoluíram para protegê-los contra os danos oxidativos, esses sistemas não são suficientemente eficazes para impedir totalmente este dano. Contudo, suplementos e substâncias antioxidantes, ou alimentos que contenham antioxidantes, podem ser usados para ajudar a reduzir o dano oxidativo do organismo. Para se protegerem contra oxidações, os organismos dispõem de mecanismos químicos e enzimáticos. No mecanismo químico, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), selênio, e glutathiona reduzida (GSH) diminuem a ação tóxica dos radicais livres produzidos intra e extracelularmente. No mecanismo enzimático, quando são expostos aos radicais livres os organismos sintetizam enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (CuZn-SOD - citosólica e extracelular; Mn-SOD - mitocondrial), a catalase (heme-enzima) e a glutathiona peroxidase (GPX - dependentes e não-dependentes de selênio) para decomporem, respectivamente,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e lipoperóxidos (YU, 1994).

Além dos suplementos, das substâncias e dos alimentos antioxidantes, as BAL também estão sendo investigadas em relação à capacidade antioxidante. O interesse pelo papel das BAL como antioxidantes iniciou-se em 1908, quando Metchnikoff sugeriu que o consumo de leite fermentado com *Lactobacillus* poderia prolongar a vida dos seres humanos (METCHNIKOFF, 1908).

O efeito antioxidante do extrato intracelular do *Bifidobacterium longum* (ATCC 15708) e *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), foi investigada por Lin & Chang (2000). Este estudo demonstrou atividade antioxidante pela inibição da peroxidação do ácido linoléico (28-48%) com as duas linhagens em estudo. As

duas BAL apresentaram também capacidade em capturar o radical DPPH (21-52%) do extrato intracelular. A inibição da peroxidação lipídica do plasma também foi avaliada, demonstrando que ambas as linhagens foram capazes de proteger o plasma contra a oxidação.

Lin & Yen (1999) investigaram a atividade antioxidante de 19 linhagens de bactérias lácticas, dentre elas: *Lactobacillus acidophilus* B, E, N1, 4356, LA-1, e Farr; *Lactobacillus bulgaricus* 12 278, 448, 449, LB, 1006 e 11 842; *Streptococcus thermophilus* 821, MC, 573, 3641, e 19 987, e *Bifidobacterium longum* B6 e 15 708. Através do extrato intracelular, observou-se que todas as linhagens demonstraram atividade antioxidante pelos métodos de inibição da auto-oxidação do ácido ascórbico, capacidade quelante de íons metálicos e captura de espécies reativas ao oxigênio. Porém, atividade antioxidante pela enzima superóxido dismutase (SOD) não foi demonstrada por estas espécies de BAL.

Zanoni et al. (2008), investigaram três linhagens de BAL, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus thermophilus*, que foram caracterizadas com relação à capacidade antioxidante. Todas as linhagens, *B. lactis* B 933, *L. plantarum* LP 1 e *S. thermophilus* Z 57, apresentaram atividade antioxidante pelos métodos de inibição da peroxidação lipídica e da auto-oxidação do ácido ascórbico, corroborando com os resultados encontrados por Lin & Yen (1999), Lin & Chang (2000) e Kullisaar et al. (2002).

No entanto, há poucos estudos sobre a capacidade antioxidante do gênero *Enterococcus* disponíveis até a data, o que justifica a importância deste trabalho.

## **2.8. Ensaio antioxidantes**

### **2.8.1. Reação ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a peroxidação dos lipídeos é o teste do malonaldeído (MDA), realizado através do método conhecido como Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). O aumento da peroxidação lipídica pode ser observado através do aumento significativo dos

níveis de malonaldeído (MDA) o produto mais abundante da peroxidação lipídica. O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão *beta* dos ácidos graxos poliinsaturados peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. É volátil, possui baixo peso molecular ( $C_3H_4O_2$ , P.M. = 72,07), tem uma cadeia curta 1,3-dicarbonil e, é ainda, considerado um ácido moderadamente fraco ( $pK_a = 4,46$ ). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar em espectro visível (LIMA & ABDALLA, 2001).

A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), forma produtos que podem ser determinados por absorção visível ( $\lambda = 532$  nm), ou por fluorescência ( $\lambda = 515$  nm e  $\lambda = 553$  nm). Se a formação de produtos derivados do MDA usualmente requer pH baixo e temperaturas elevadas (80-100°C), algumas substâncias fluorescentes derivadas do MDA podem ser geradas em pH neutro e temperatura mais baixa (37°C). Em pH neutro, à 37°C, uma reação de condensação tipo Hantzsch entre o MDA e aminas primárias produz compostos fluorescentes. A reação não específica do MDA com grupos aminos primários ocorre em várias biomoléculas (proteínas, ácidos nucléicos, aminas e fosfolípidos) produzindo complexos 1:1, que são bases de Schiff conjugadas. Essa reação, chamada de “substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico”, representa múltiplos métodos que utilizam o TBA, formando o complexo MDA:TBA (1:2),  $C_{11}H_8N_4S_2O_4 \cdot H_2O$  (P.M.=342,35). Neste teste utiliza-se como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetrametoxipropano ou tetraetoxipropano (LIMA & ABDALLA, 2001).

#### 2.8.2. Capacidade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina)

O método do DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina) de antioxidantes presentes em uma amostra, o qual produz um decréscimo na absorbância à 515 nm (SANCHEZ-MORENO et al., 1998). Este

método pode ser útil para obter informações preliminares de compostos com habilidade na captura de radicais livres. Também requer amostras pequenas, sendo sensível para substâncias hidrofílicas (TEPE et al., 2005). Este radical apresenta coloração violeta, que em contato com a substância antioxidante confere coloração amarela. A atividade do antiradical expressa pelo parâmetro  $EC_{50}$  é definida como a quantidade do antioxidante necessário para diminuir 50% da concentração do DPPH inicial (ALVES et al., 2006).

### 2.8.3. Capacidade antioxidante pelo método $ABTS^{*+}$ (2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico)

A Reação com o cátion radicalar  $ABTS^{*+}$  é outro método espectrofotométrico muito aplicado para analisar compostos hidrofílicos ou lipofílicos. Este método apresenta como característica, propriedades eletrônicas do cátion-radical em doar elétrons e formar ligações de hidrogênio. A reação é monitorada por ensaios espectrofotométricos medindo a absorvância à 734 nm, valor característico para detectar a reação do extrato em estudo com o cátion  $ABTS^{*+}$  (PANNALA et al., 2001).

## 2.9. Considerações finais

Nesta revisão procurou-se obter informações relevantes quanto ao uso das BAL na alimentação humana e animal, demonstrando os possíveis benefícios do consumo destes microrganismos, bem como os efeitos do uso destas bactérias na alimentação e na nutrição, prevenindo ou impedindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas, e ainda, agindo como bioconservantes. Além disso, as BAL são consideradas bactérias que apresentam propriedades probióticas, promovendo efeitos benéficos aos sistemas digestório, imunológico e respiratório. Do mesmo modo, a capacidade antioxidante exercida pelas BAL tem sido estudada.

Baseado neste contexto, as BAL apresentam-se como microrganismos importantes para a saúde dos seres humanos e dos animais, e ainda, uma importância econômica significativa para as indústrias de alimentos. O estudo destes microrganismos pode contribuir com novas pesquisas na área de alimentos, visando obter dados característicos sobre as atividades antimicrobiana, antioxidante, como também, capacidade probiótica exercida pelas BAL, neste trabalho em especial por espécies do gênero *Enterococcus*.

## 2.10. Referências Bibliográficas

- ABE, F.; ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Effect of administration of Bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. **Journal of Dairy Science**, Amsterdam, v. 78, p. 2838-2846, 1995.
- ADAMS, M. R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, New York, v. 8, p. 227-239, 1997.
- ADNAN, A. F. M.; TAN, I. K. P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potencial. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, p. 1380-1385, 2007.
- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido 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, p. 424-428, 2002.
- ALVES, R. E; BRITO E. S.; RUFINO, M. do S. M. 2006. **Prospecção da atividade antioxidante e de compostos com propriedades funcionais em frutas tropicais**. In: XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, Cabo Frio. Palestras e resumos: SBF/UENF/UFRRJ, p. 133-141.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2002. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Brasil. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em: 05 de jan. 2010.
- ÁVILA, F. A.; PAULILLO, A. C.; SCHOCKEN- ITURRINO, R. P.; LUCAS, F. A.; ORGAZ, A.; QUINTANA, J. L. Avaliação da eficiência de um probiótico no



- controle da diarreia e no ganho de peso de Bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n.1, p.41-46, 2000.
- BARBOSA, F. H. F.; SILVA, A. M.; DUARTE, R.; NICOLI, J. R. Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana de *Bifidobacterium bifidum* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 1, n. 2, p. 1-11, 2001.
- BARREIROS, L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.
- BELGACEM, Z. B.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; LUCAS, R.; MARTINEZ-CANAMERO, M.; GALVEZ, A.; MANAI, M. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. **Food Control**, New York, v. 21, p. 462-470, 2010.
- BERTECHINI, A. G.; HOSSAIN, S. M. 1993. **Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frangos de corte**. In: Conferência de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos: APINCO, p. 1.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, 123-130, 1999.
- BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. 1995. **Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise**. 2ª ed, vol. 9, Enzymes, Biomass, food and feed, ed. by G. Reed and T. W. Nagodawithana. Bridgeton, Cap. 5. Production of Microbial Biomass.
- BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, 135-144, 2006.
- BUDDE, B. B.; HORNBAEK, T.; JACOBSEN, T.; BARKHOLT, V.; KOCH, A. G. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meat application experiments. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 83, p. 171-184, 2003.
- BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. 2001. **Tietz Fundamental of Clinical Chemistry**. 5ª Ed, Philadelphia: WB Saunders, p. 1091.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

- CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *Escherichia 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, 2001.
- CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; FERNANDEZ, M. F.; HERNANDEZ, P. E. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, Pediocin PA-1, Nisin A and Lactocin S against spoilage and pathogenic bacteria. **Food Microbiology**, San Diego, v. 15, p. 289-298, 1998.
- COS, P.; CALOMME, M.; SINDAMBIWE, J.B.; BRUYNE, DE T.; CIMANGA, K.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. **Planta Medica**, New York, v. 67, p. 515-519, 2001.
- DABÉS, A. C.; SANTOS, W. L. M. ; 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, 2001.
- DE LEON, C. A. P.; BAYON, M. M. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: A study of different incorporation methods. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 92, p. 602-610, 2002.
- 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**, Amsterdam, v. 18, p. 191-208, 2002.
- DE VRESE, M.; STEGLMAN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHEREZENMEIR, J. Probiotics compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, p. 421-429, 2001.
- DÍAZ, J. C.; ALVAREZ, C. R.; LÓPEZ, A. S.; RODRÍGUEZ, A. A. Estudio microbiológico de las comidas servidas en los comedores escolares de la isla de tenerife. **Revista Española de Salud Pública**, Madrid, v. 77, n. 6, p. 749-760 2003.
- ENGLAND, J.A., WATKINS, S.E., SALEH, E. et al. Effects of *Lactobacillus reuteri* on live performance and intestinal development of male turkeys. **The Journal of Applied Poultry Research**, North Carolina, v. 5, p. 311-324, 1996.
- FACKLAM, R. R.; SAHM, D. F.; TEIXEIRA, L. M. 1999. **Enterococcus**. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup> ed. Washington: ASM PRESS, p. 297-305.

- FAO/WHO. 2002. **Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization**. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working Group Report, London, p.1-11.
- FARIAS, M. E.; RUIZ HOLGADO, A. A. P.; SESMA, F. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, New York, v. 57, p. 1013-1015, 1994.
- FEORD, J. Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. **Antonie van Leeuwenhoek**, Surrey, v. 82, p. 353-360, 2002.
- FERREIRA, C. L. L. F. 2003. **Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas**. In: Probióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção. Viçosa, p. 206.
- FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Probióticos – Uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 142, p. 22-33, 2006.
- FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHELEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 80, p. 105-122, 2003.
- FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, New York, v. 66, n. 10, p. 1811-1821, 2003.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **Journal of Applied Bacteriology**, Aubiere, v. 66, p. 365-378, 1989.
- FULLER, R. 1992. **History and development of probiotics**. In: Probiotics: the scientific basis. 2. ed. London: Chapman & Hall, Cap.1.
- GANTHER, H. E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 20, p. 1657-1666, 1999.
- GOLDIN, B. R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 80, n. 2, p. 203-207, 1998.
- GUEDES NETO, L. G. 2004. **Produção de queijo coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de *Staphylococcus spp* e bactérias ácido-lácticas e de sua atividade antagonista *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 94 f.

- GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p. 245-250, 2005.
- GUERRA, N. P.; BERNÁRDEZ, P. F.; MÉNDEZ, J.; CACHALDORA, P.; CASTRO, L. P. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**, Boston, v. 134, p. 89-107, 2007.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. 1999. **Oxidative stress and antioxidant protection: some special cases**. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. Oxford: Clarendon Press, p. 530-533.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 2000. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Oxford: Clarendon, p. 936.
- HAMILTON, S. J. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 326, n. 1-3, p. 1-31, 2004.
- HILDE, M.; OSTILE, M. H. H.; JUDITH, N. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 87, p. 17-27, 2003.
- HIIL, K.; ZHOU, J.; MACMAHAN, W. J.; MOTLEY, A. K.; ATKINS, J. F.; GESTELAND, R. F.; BURK, R. F. Deletion selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. **The Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 278, p. 13640-13646, 2003.
- HOLZAPFEL, W.H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, p.365-373, 2001.
- HUGAS, M.; MONFORT, J. M. Bacterial *starter* cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, New York, v. 59, n. 4, p. 547-554, 1997.
- HUGAS, M. Bacteriogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, Champaign, v. 49, n. 1, p. 139-150, 1998.
- HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T. Functionality of enterococci in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 88, p. 223-233, 2003.

- ISOLAURI, E., SÜTAS, Y., KANKAAPÄÄ, P., ARVILOMMI, H., SALMINEN, S. Probiotics: effects of immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, p. 444-450, 2001.
- JACKSON, M. S., BIRD, A. R., MCORIST, A. I. Comparison of two selective media for the detection and enumeration of lactobacilli in human faeces. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 51, p. 313-321, 2002.
- JANSEN, S.J.K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, Amsterdam, v. 666, n. 1/2, p. 387-392, 2003.
- JIN, L.Z., HO, Y.W., ABDULLAH, N. et al. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 53, p. 351-368, 1997.
- JIN, L.Z., HO, Y.W., ABDULLAH, N. et al. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, Milwaukee, v. 77, p. 1259-1265, 1998.
- KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 91, p. 167-174, 2004.
- KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Science**, Amsterdam, v. 15, p. 1-9, 2002.
- KHEDID, K.; FAID, M.; MOKHTARI, A.; SOULAYMANI, A.; ZINEDINE, A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. **Microbiological Research**, New York, v. 164, p. 81-91, 2009.
- KIM, S. W.; LEE, S. O.; LEE, T. H. Purification and characterization of superoxide dismutase from *Aerobacter aerogenes*. **Agriculture Biology Chemistry**, Japan, v. 55, p. 101-108, 1991.
- KINOUCHI, F. L. 2006. “logurte” de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 85f.
- KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-45, 1993.
- KULLISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEMM, T.; ANNUK, H.; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 72, p. 215- 224, 2002.

- LACETERA, N.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Effects of selenium and vitamin E administration during a late stage of pregnancy on colostrum and milk production in dairy cows, and on passive immunity and growth of their offspring. **American Journal of Veterinary Research**, Washington DC, v. 57, p. 1776-1780, 1996.
- LANDGRAF, M. Novos patógenos de interesse em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 31, n. 1, p.5-7, 1997.
- LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, Washington DC, v. 147, p. 747-748, 1965.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, p. 293-303, 2001.
- LIN, M. Y.; CHANG, F. J. Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive Diseases and Sciences**, Stanford, v. 45, n. 8, p. 1617-1622, 2000.
- LIN, M.; YEN, C. Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington DC, v. 47, n. 4, 1460-1466, 1999.
- LÓPEZ-BREA, M.; DOMINGO, D. Antibioticoterapia con probióticos. **Revista Española de Quimioterapia**, Madrid, v. 20, p. 170-181, 2007.
- LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, Champaign, v. 56, p. 105-115, 2000.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall. 2004.
- MAKINO, S. I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 104, n. 2, p. 189-196, 2005.
- MARTINS, A. D. O.; MENDONÇA, R. C. S.; SILVA, D. L.; RAMOS, M. S.; MARTINS, M. C.; DONZELE, J. L. N.; ANDRADE, E. J. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 5, n.1, p. 53-59, 2006.
- MENDONZA, F.; MAQUEDA, M.; GÁLVEZ, A.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; VALDIVIA, E. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48 adapted strain *Listeria*

*monocytogenes*. **Applied Environment Microbiology**, Washington DC, v. 65, p. 618-625, 1999.

MERIAN, E. Metals and their compounds in the environment. **Occurrence analysis and biological relevance**. Weinheim: Wiley-VCH, 1991, p. 1439

METCHNIKOFF, I. 1907. **Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction**. In: The prolongation of life: Optimistic studies. London: Butterworth-Heinemann, p. 161-183.

METCHNIKOFF, E. 1908. **The prolongation of life**. New York: Putnam's son, p. 1845-1916.

MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J.; OUWEHAND, A.; HOLZAPFEL, W. H.; SHORTT, C.; FONDÉN, R.; MILLER, G.; DONOHUE, D. Food microorganisms - health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Montreal, n. 377, p. 4-9, 2003.

MONTVILLE, T. J.; WINKWOSKI, K. 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: Doyle, M. P. Beuchat, L. R., Montville, T. J. **Food Microbiology**. Washington DC: ASM Press, p. 557-577.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 1, p.23-28, 1999.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. and PFALLER, M. A. 1998. **Microbiologia Médica**. Trad. Patrícia J. Vouex. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.172.

NYMAN, D. W.; STRATON, N. S.; KOPLLIN, M. J. Selenium and selenomethionine levels in prostate cancer patients. **Cancer Detection and Prevention**, Amsterdam, v. 28, p. 8-16, 2004.

O' SULLIVAN, L.; ROSS, R.; HILL, C. Potential of bacteriocina-producing lactic bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, Mouligneaux, v. 84, p. 593-604, 2002.

PANNALA, A. S.; CHAN, S. T.; O'BRIEN, J. P.; RICEEVANS, A. C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, London, v. 282, n. 5, p.1161-1168, 2001.

- PAPP, L. V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants and Redox Signaling**, New Rochelle, v. 9, p. 775-806, 2007.
- PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A. Prebióticos e probióticos na nutrição de aves. **Revista de Ciências Agrárias e da Saúde**, Andradina, v. 2, n. 1, p. 59-64, 2002.
- PEREIRA, M. L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes* - Uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. **Revista de Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n. 26, p. 5-12, 1993.
- PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.
- PINTADO, C. M.; OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M.; FERREIRA, M. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. **Food Microbiology**, Washington, DC, v. 22, p. 79-85, 2005.
- PUPIN, A. M. 2002. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. **Seminário Novas Alternativas de Mercado**, Campinas: ITAL, p. 133-145.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A. M.; OKSMAN-CALDENTY, K. M.; MYLLARINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2002.
- REDONDO, N. C. 2008. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 109f.
- REID, G.; JASS, J.; SEBULSKY, M. T.; MCCORMICK, J. K. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 16, n. 4, p. 658-672, 2003.
- RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. L. B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.
- RODRÍGUEZ, E.; CALZADA, J. ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, J. M.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactics* on



*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 15, p. 131-137, 2005.

ROSSI, E.A.; GIORI, G.S.; HOLGADO, A.P.R.; VALDEZ, G.F. *In vitro* effect of *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* on cholesterol. **Microbiologie Aliments Nutrition**, Amsterdam, v. 12, p. 267-270, 1994.

ROSSI, E. A. 2000. **Desenvolvimento e avaliação biológica do potencial hipocolesterolêmico de um novo produto probiótico de soja**. Tese (Livre Docência)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 154f.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 2-16, 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDE, R.; MALTTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 84, p. 197-215, 2000.

SANDERS, J. W.; LEEHOUTS, K. J.; HAANDRIKMAM, A. J.; VENEMA, G.; KOK, J. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v. 177, p. 5254-5260, 1995.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALISTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal Science Food Agriculture**, Hoboken, v. 76, p. 270-276, 1998.

SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M. I. A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 111-114, 2003.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal Dairy Science**, Japan, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.

SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, Chicago, v. 55, n. 11, p. 46-52, 2001.

SIMONETTA, A. C.; MORAGUES DE VELASCO, L. G.; FRISÓN, L. N. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. **Letters in Applied Microbiology**, Cardiff, v. 24, p. 139-143, 1997.

SIQUEIRA, F. M.; OETTERER, M.; REGINATO-D'ARCE, M. B. Nutrientes antioxidantes. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 192-199, 1997.

- SIVIERI, K.; CANO, V. P. S.; VALENTINI, S. R. ROSSI, E. A. Demonstration of the cellular viability and safety of *Enterococcus faecium* CRL 183 in long-term experiments. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 87, p. 59-69, 2007.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- TAKASSAGO, T.; PETERS, E. E.; GRAHAM, D. I.; MASAYASU, H.; MACRAE, I. M. Neuroprotective efficacy of abselen, an antioxidant with antiinflammatory action, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. **British Journal of Pharmacology**, Cambridge, v. 122, p. 1251-1256, 1997.
- TEPE, B.; SOKMEN, M.; SOKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium organifolium* (Labil) Manden & Sheng. **Journal of Food Engineering**, California, v. 69, p. 335-342, 2005.
- THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias ácido lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2005.
- TISSIER, H. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. **Royal Society Biological**, London, v. 60, p. 359-361, 1906.
- TOMITA, H.; FUJIMOTO, S.; TANIMOTO, K.; IKE, Y. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone responsive conjugative plasmid pPDI. **Journal of Bacteriological**, Washington DC, v. 179, p. 7843-7855, 1997.
- TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, Haywards Heath, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.
- TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausage. **International Journal Food Microbiology**, Cambridge, v. 83, p. 233-244, 2003.
- VANDERHOOF, J. A.; YOUNG, R. J. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, California, v. 27, n. 3, p. 323-332, 1998.
- VÁSQUEZ-VIVAR, J.; WHITSETT, J.; MARTÁSEK, P.; HOGG, N.; KALYANARARAMAN, B. Reaction of tetrahydrobiopterin with superoxide: EPR132

Kinetic analyses and Characterization of the Pteridine radical. **Free Radical Biology & Medicine**, Maryland Heights, v. 31, n. 8, p. 975-985, 2001.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *Lactobacillus acidophilus* and lactic starter in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Japan, v. 10, p. 271-275, 2000.

ZANONI, S.; POMPEI, A.; CORDISCO, L.; AMARETTI, A.; ROSSI, M.; MATTEUZZI, D. Growth kinetics on oligo and polysaccharides and promising features of three antioxidative potential probiotic strains. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 105, p. 1266-1276, 2008.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, Washington DC, v. 74, p. 139-161, 1994.

WACHSMAN, M. B.; FARIAS, M. E.; TAKEDA, E.; SESMA, F.; RUIZ HOLGADO, A. P.; TORRES, R. A.; COTO, C. E. Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpes viruses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Kidlington, v. 12, p. 293-299, 1999.

### 3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho, capítulos II e III, estão apresentados na forma de artigos submetidos para publicação nas seguintes revistas:

- **Journal of Basic Microbiology:**

3.1. Antimicrobial and antioxidant activities among enterococci isolated from meat and dairy products.

- **Microbiological Research:**

3.2. Evaluation of selenite bioremoval from liquid culture by *Enterococcus* species.

**CAPÍTULO II – Artigo I**

**ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES AMONG ENTEROCOCCI  
ISOLATED FROM MEAT AND DAIRY PRODUCTS**

### 3.1. Antimicrobial and antioxidant activities among enterococci isolated from meat and dairy products

Simone Pieniz<sup>1</sup>, Robson Andreazza<sup>3</sup>, Benedict C. Okeke<sup>2</sup>, Flávio C. Camargo<sup>3</sup>,  
Adriano Brandelli<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Biology, Auburn University at Montgomery, P.O. Box 244023, Montgomery, Alabama, USA.

<sup>3</sup> Departamento de Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

\*Corresponding author: [abrand@ufrgs.br](mailto:abrand@ufrgs.br); Fax: +5551 3308 7048

**Running title:** Biological activities of food enterococci

#### Abbreviations

LAB – Lactic acid bacteria

ROS – Reactive oxygen species

TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances

ABTS<sup>•+</sup> – 2,2 azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

BHI – Brain Heart Infusion

## Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) have an important role in a great variety of fermented foods. In addition to their contribution to sensory characteristics, they enhance food preservation and can be used as probiotics. In this study, the antimicrobial and antioxidant activities of culture supernatants and cell extracts of 36 LAB isolated from meat and dairy products were investigated. The bacteria were identified by 16S rRNA sequencing. GenBank BLAST analysis revealed that all the isolates belong to the genus *Enterococcus*. Three isolates were identified as *E. hirae*, one isolate as *Enterococcus* sp., 17 as *E. faecium* and 15 as *E. faecalis*. Antimicrobial activity against the indicator microorganism (*Listeria monocytogenes*) was observed for 21 culture supernatants and 7 cell extracts. All of the isolates showed antioxidant activity as determined by the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) method with both types of extracts. When the antioxidant capacity was investigated using ABTS<sup>++</sup> method (2,2 azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) and DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) it was observed that only culture supernatants showed antioxidant capacity. The highest antimicrobial and antioxidant activities were observed with *E. faecium* IS196 and *E. faecium* IS197. These bacteria could particularly help to reduce or inhibit pathogenic microorganisms as well as oxidative spoilage in foods and feed.

**Keywords:** antimicrobial activity; antioxidant; *Enterococcus*; lactic acid bacteria; molecular characterization

## 1 Introduction

Lactic acid bacteria (LAB), which include the genera *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* and *Propionibacterium*, have an essential role in food fermentations given that a wide variety of strains are routinely employed as *starter* cultures in the manufacture of dairy, meat and vegetable products [1]. The most important contribution of these microorganisms to the product is to preserve the nutritive qualities of the raw material through an extended shelf life and the inhibition of spoilage and pathogenic bacteria. This is due to competition for nutrients and the presence of inhibitors produced by the *starter* culture, including organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins [2]. The ability to produce large quantities of organic acids (mainly lactic acid), through fermentation of food carbohydrates, and consequent pH decrease, are the fundamental factors of the antimicrobial activity of lactic bacteria. Organic acids, other inhibitory and beneficial substances, such as hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl, acetaldehyde, and bacteriocins produced by LAB or substances added to food act in concert producing a broad spectrum of action against pathogenic and spoilage microorganisms [3].

Biological systems provide favorable conditions for occurrence of oxidative reactions that are due to the existence of unsaturated lipids in cell membranes, and due to abundance of oxidative reactions that occur during normal metabolism. The susceptibility of a cell or a tissue to oxidative stress depends on a number of factors including the availability of antioxidants and the ability for inactivation or elimination of formed oxidized products [4]. Free radicals and other reactive oxygen species (ROS) are generated by exogenous chemicals or endogenous metabolic processes in food systems or the human body. The radicals may cause oxidative damage by oxidizing biomolecules leading to tissue damage and cell death. Atherosclerosis, cancer, emphysema, cirrhosis, and arthritis have been correlated with oxidative damage [4, 5]. Therefore, oxidative damage plays a significant pathological role in human disease. However, ingestion of antioxidative



supplements, or foods containing antioxidants, may reduce the oxidative damage on the human body [6, 7, 8].

Although the antioxidative properties of LAB are not studied in detail, it has been shown that numerous LAB species contain NADH oxidase/peroxidase and/or catalase to prevent deleterious oxidative effects [9]. The antioxidant effect of LAB in rats showing vitamin E deficiency was studied by Kaizu et al. [10]. The authors showed that some *Lactobacillus* species possess antioxidant activity, and are able to decrease the risk of ROS accumulation during food ingestion. The antioxidant activity of some species of LAB has been demonstrated by enzymatic assays *in vitro* [11, 12].

Due to the overwhelming importance of lactic acid bacteria in foods and feed, we evaluated the antioxidant capacity and antimicrobial activity of food isolates of *Enterococcus* spp. characterized by molecular analysis of the 16S rRNA gene sequence. Antioxidant capacities of the LAB isolates were comparatively measured by three methods.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Microorganisms**

Thirty-six LAB strains isolated from different meat and dairy products, from the collection of the Laboratory of Applied Microbiology and Biochemistry - ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil), were used. Strains 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 29, 30, 31, 32, 33 and 38 were isolated from Minas Frescal (typical Brazilian soft cheese) and strains A3, A33, A11, A111, C5, B22, IS196 and IS197 from regional homemade sausage. Strains were kept as frozen stock cultures in Brain Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) broth containing 20% (v/v) glycerol. Bacteria were grown in BHI broth at 37°C and thereafter inoculated to plates of BHI solidified with 1.5% agar and incubated at 37°C for 24 hours. The indicator organism tested in this study was *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

## 2.2 DNA amplification and sequencing

Isolates were identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing as follows. The isolates were grown on Brain Heart Infusion agar at 37°C for 24 h for evaluation of culture purity. Cells were recovered by centrifugation. DNA was extracted from the cells using Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) with slight modification. Briefly, cells were re-suspended in 300 µL of nucleic acid lysis solution, incubated at 80°C for 15 min and allowed to cool to room temperature. RNase solution (1.5 µL) was added and incubated at 37°C for 20 min. Protein precipitation solution (100 µL) was added and the tubes incubated on ice for 5 min. Following centrifugation, the supernatant was transferred to a tube and 900 µL ice cold 95% ethanol was added. The precipitate was recovered by centrifugation. The pellet was washed with 70% ambient temperature ethanol and re-suspended in sterile distilled water. Oligonucleotide primers corresponding to positions 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') were used for PCR amplification of the 16S ribosomal RNA gene [13]. The PCR reaction mixture consisted of 12.5 µL of PCR master mix (Promega, Madison, WI), genomic DNA template (0.5 µL), primer 27F (2.5 µL=12.5 pmol), primer 1492R (2.5 µL=12.5 pmol) and made up to 25 µL final volume with nuclease-free water. The 16S rRNA gene was amplified using a 35-cycle PCR (initial denaturation, 95°C for 5 min; subsequent denaturation, 95°C for 0.5 min; annealing temperature, 50°C for 1 min; extension temperature, 72°C for 1 min and final extension, 72°C for 5 min). The PCR amplification products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel. Millipore Montage PCR filter units (Millipore, Billerica, MA) were used to remove primers salts, and unincorporated dNTPs according to the manufacturer's instructions except that an additional 400 µL of sterile nuclease free water was added to further remove remaining ingredients of PCR. DNA cycle sequencing was performed using BigDye terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) with sequencing primer 519r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') in independent reactions (Institute of

Integrative Genome Biology , UCR, CA).

### **2.3 Phylogenetic Analysis**

Genbank BLAST (N) was used for homology searches. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 4.1 [14]. The rRNA sequence was submitted to the database of GenBank with accession number FJ619707-FJ619742.

### **2.4 Collection of culture supernatant**

Strains of LAB were inoculated to 10 mL of BHI broth and incubated at 37°C for 24 hours. Aliquots of the culture were transferred to 2 mL polypropylene tubes, and centrifuged at 10.000 x *g* for 15 min at 4°C. The resulting supernatant was neutralized (pH 6.5-7.0) with 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH and heated to 95°C for 5 min [15]. This culture supernatant was used to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity.

### **2.5 Preparation of Intracellular cell extract**

Strains of LAB were inoculated in 10 mL of BHI broth and incubated at 37°C for 24 hours. Aliquots of the culture were transferred to 2 mL polypropylene tubes, and centrifuged at 10.000 x *g* for 15 min at 4°C. The cell pellet was washed twice with Milli-Q water and resuspended in the same water followed by ultrasonic disruption. The sonication was performed in five intervals of 1 minute in ice bath. Cellular debris was removed by centrifugation at 10.000 x *g* for 15 minutes. The resulting supernatant was used as cell extract to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity.

## 2.6 Antimicrobial activity

The indicator microorganism, *L. monocytogenes* ATCC 7644, was suspended in 0.85% NaCl standardized to optical density (OD<sub>600</sub>) of 0.150 in spectrophotometer, which corresponded to a 0.5 McFarland turbidity standard solution. One aliquot of 20  $\mu$ L of culture supernatant was applied on cellulose discs (5 mm) onto BHI agar plates previously inoculated with a swab soaked in culture of the indicator bacterium. The plates were incubated at 37°C and inhibition zones were measured after 24 h. The same procedure was performed to evaluate the antimicrobial activity of cell extracts. The diameter of inhibition zones was measured using a caliper and halos  $\geq$  7 mm were considered inhibitory [15]. The experiment was performed in triplicate.

## 2.7 Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

The reaction to thiobarbituric acid was performed according to the methodology of Ohkawa et al. [16]. Test tubes containing Milli-Q water, extra virgin olive oil were subjected to oxidation with 100  $\mu$ M ferrous sulfate and incubated in a water bath at 80°C, for 10 min. Thereafter, to each tube was added the sample (culture supernatant and cell extract of the bacteria), 81 mg mL<sup>-1</sup> sodium lauryl sulfate (SDS), buffered acetic acid pH 3.44 and 6 mg mL<sup>-1</sup> thiobarbituric acid (TBA). The reaction mixture was further incubated in a water bath at 100°C for 1 h. For each sample tested had a blank to either the culture supernatant and cell free extract, and a standard control for all comparisons. The products of reaction were determined by measurement of absorbance at 532 nm with a spectrophotometer. The concentration of TBARS was calculated using a standard curve developed with known concentrations of 1,1,3,3-tetramethoxypropane, and results were expressed as nmol of malonaldehyde (MDA)/mL of sample. The standard was 0.03 mmol L<sup>-1</sup> MDA, 8.1% SDS, acetic acid pH 3.44 and 0.6% TBA in distilled water and incubated in a water bath at 100°C for 1 h. The experiment was performed in triplicate.

## 2.8 Antioxidant capacity using ABTS<sup>•+</sup> method

The antioxidant activity was determined using ABTS<sup>•+</sup> (2,2 azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical cation [17] with some modifications described by Rossini et al. [18]. ABTS<sup>•+</sup> was dissolved in water (7 mmol L<sup>-1</sup>). ABTS radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) was produced by reacting ABTS stock solution with 2.45 mmol L<sup>-1</sup> potassium persulfate (final concentration) and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 16 h before use. Stock solution was used for a maximum of 3 days. Before use, the ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted with ethanol, to an absorbance of  $0.700 \pm 0.020$  at 734 nm. Samples were diluted with ethanol to obtain between 20%–95% inhibition of the blank absorbance. Ascorbic acid was used as the standard in the range 0–9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . After addition of 10  $\mu\text{L}$  of sample (or standards) in 1.0 mL of ABTS<sup>•+</sup> solution, the absorbance was read at 30 sec interval for 5 min. Likewise, these same proportions (10  $\mu\text{L}$  of supernatant of culture medium or free extract and 1.0 mL of ABTS<sup>•+</sup> solution) were used as a control. All determinations were carried out at least three times. The percentage inhibition of absorbance at 734 nm was calculated using ascorbic acid standard curve.

## 2.9 Scavenging ability on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals

The DPPH method used was as described by Brand-Williams et al. [19], based on the capture of the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical for antioxidants, producing a decrease in absorbance at 515 nm. The DPPH was used at a concentration of 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , dissolved in methyl alcohol. The solution was homogenized and transferred to a dark glass bottle. The prepared solution was used only in the day of analysis. In the dark, aliquots of 0.1 mL of sample (culture supernatant or cell free extract) were transferred to test tubes with 3.9 mL of radical DPPH (60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  DPPH solution) and homogenized by shaking. Likewise, these same proportions (0.1 mL of culture medium or free extract and 3.9 mL of radical DPPH) were used as a control. Methyl alcohol was used as a blank. The

standard curve was DPPH in the range 0 to 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The results were expressed as  $\text{EC}_{50}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), which is the minimum antioxidant concentration required to reduce 50% of the initial DPPH reaction from the time the extract reached stability.

## 2.10 Statistical analysis

Means, standard deviation and standard error of replicates were computed and test of significance was carried out by Tukey's test at 5% probability of error, using statistical software SOC, developed by the Computing Technology NTIA Center [20].

## 3 Results

### 3.1 Bacterial Identification

All microorganisms were identified as Gram-positive and facultatively anaerobic. The bacteria were identified by 16S rRNA sequence analysis as *Enterococcus faecium* (17 strains), *Enterococcus faecalis* (15 strains), *Enterococcus hirae* (3 strains) and *Enterococcus* sp. (1 strain). Blast analysis of 16S rRNA gene sequence revealed that isolates 1, 16, 33 and B22 showed 96% similarity to each other. Isolates 3, 6, 7, 9, 10, 18, 19, 21, 22, 29, 30, 31, 32, A111, IS196 and IS197 displayed 98% of similarity and the isolates 2, 4, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 24, 38, A3, A11 and C5 have 99% of similarity (Fig. 1).

### 3.2 Antimicrobial Activity

Antimicrobial activities of culture supernatants and cell extracts of the strains are summarized in Table 1. Of the 36 strains analyzed, 21 strains displayed inhibitory capability against the indicator organism *L. monocytogenes* when the culture supernatant was used and 7 strains showed inhibitory activity with the cell

extract. Inhibitory capacity of the culture supernatants of LAB isolates against *L. monocytogenes* (Table 1) ranged from 7.0 to 11.0 mm. The highest inhibition zones, 10.7 mm and 11.0 mm were respectively observed with culture supernatants of isolates IS196 and IS197. The lowest zones of inhibition were recorded with culture supernatants of isolates LAB 24 (7.0 mm) and LAB 38 (7.0 mm) and cell extracts of isolate LAB 32. Antimicrobial activity against *L. monocytogenes* was observed in both culture supernatants and cell extracts of LAB isolates 1, 16, 17, 18, 32, IS196 and IS197. Other isolates displayed only extracellular antimicrobial activity.

### 3.3 Antioxidant activity

The antioxidant activity of both culture supernatants and cell extracts were evaluated by three different methods: TBARS, ABTS<sup>•+</sup> radical cation and the DPPH method.

#### 3.3.1 Thiobarbituric Reactive Substances (TBARS)

Both culture supernatants and cell extracts of all LAB isolates used in this study showed antioxidant activity by the TBARS method. However, some preparations showed higher activity compared to the control, particularly culture supernatants of the *E. faecium* strains 5, 6, 7, 9, IS196 and IS197 (Fig. 2A) as well as *E. faecalis* strains 1 and 4, and *E. hirae* strain A11 (Fig. 2B). The cell extracts that showed higher antioxidant activity were from *E. faecium* 3, 6, 8, B22, C5, IS196 and IS197 (Fig. 3A), *E. faecalis* 1 and 4, *Enterococcus* sp. A33, and *E. hirae* A11 and A111 (Fig. 3B).

#### 3.3.2 ABTS<sup>•+</sup> free radical scavenging assay

All samples of the culture supernatants showed ability to sequester free radicals by the ABTS<sup>•+</sup> method (Fig. 4). Strains 3, 8, 12, 32, and C5 showed higher

percentage of inhibition and consequently, higher antioxidant activity when compared to the rest of *E. faecium* strains, which showed inhibitory activity between 59 and 92.5% (Fig. 4A). The antioxidant activity of culture supernatants of *E. faecalis*, *Enterococcus* sp. and *E. hirae* is shown in Fig. 4B. The highest antioxidant activity was observed in culture supernatants of strains 19 and 21 which caused about 92% inhibition or sequestration of free radical. Contrarily, samples of cell extracts showed weak antioxidant activity with percent inhibition between 0.6 and 6% for *E. faecium* and from 0.6 to 4.5% for *E. faecalis*, *Enterococcus* sp. and *E. hirae* strains (data not shown).

### 3.3.3 Assay for DPPH radical-scavenging activity

The results obtained with the culture supernatants are shown in Fig. 5. Assays conducted with culture supernatants of *E. faecium* (Fig. 5A), all strains showed antioxidant activity compared with the control ( $EC_{50} = 9.77 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).  $EC_{50}$  values ranging from  $2.41$ – $5.02 \mu\text{g mL}^{-1}$  were observed with the *E. faecium* culture supernatant. Strain B22 displayed the lowest  $EC_{50}$  value ( $2.41 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and, consequently, higher antioxidant activity in terms of DPPH free radical scavenging. The antioxidant activity of the culture supernatants of *E. faecalis*, *Enterococcus* sp. and *E. hirae* strains are shown in Fig. 5B. All supernatants were capable of scavenging free radicals by DPPH method with  $EC_{50}$  values between  $2.49$ – $4.57 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The strain A11 (*E. hirae*) showed the lowest value of  $EC_{50}$  ( $2.49 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and thus higher antioxidant activity.

The results of cell extracts of enterococci which showed no antioxidant activity measured by the DPPH free radical scavenging activity method are not presented. However, the cell extract of one strain, *E. faecium* strain 3, displayed significant antioxidant activity with an  $EC_{50}$  of  $7.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ .



## 4 Discussion

Antimicrobial and antioxidant activities of LAB are of extreme importance in fermented foods. In this study we examined both antioxidant and antimicrobial activities in culture supernatants and cell-free extracts of lactic acid bacteria isolated from regional dairy and meat products. All the isolates were identified as *Enterococcus* spp., which are a diverse group of Gram-positive, catalase-negative cocci that share many characteristics with the genera *Lactococcus* and *Streptococcus* [21]. The enterococci are a complex and important group of bacteria that can be found in a variety of food products, such as milk and cheese, meat and vegetables [22, 23].

We applied the PCR assay for DNA sequencing. The small fragment (500 bp) of the 16S rRNA gene was used to characterize the microbial community in this study. This region is called V3 region. The V3 region of 16S rRNA gene is a commonly used region for bacterial phylogenetic analysis. Despite of the short nucleic acid sequences, hypervariable V3 region can provide information enough to describe microbial community [24]. The isolates were clustered within four species (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* and *Enterococcus* sp.), and the results obtained by 16S rDNA sequencing indicated a high degree of sequence similarity among them and from a phylogenetically coherent group of lactic acid bacteria, the genus *Enterococcus*. All the clusters are supported by high bootstrap values and should be considered significant. Also, LAB strains were designated to the correct species with close homology. In fact, BLAST search analyses using 16S rDNA sequence resulted in homologies between 93 and 99%. Interestingly, *Enterococcus* species are frequently found in traditional fermented foods and may be included as a component of some mixed *starters* [25].

Antimicrobial activity against *L. monocytogenes* was observed in 58% of the culture supernatants of the tested strains, indicating that antilisterial substances are secreted by these bacteria. *L. monocytogenes* can tolerate a wide range of pH, temperatures, salt concentration and water activity that they can be undesirable to many other bacteria. In ready-to-eat products, refrigeration is the principal method

to control undesirable microorganisms in many cases and sometimes the only method of preservation. At low preservation or storage temperature some psychrotrophic pathogenic microorganisms, like *L. monocytogenes*, can multiply with little or no change in sensory characteristics of products. However, the inhibition of *Listeria* is very relevant to food safety since this pathogen has been associated with several disease outbreaks [26].

LAB isolated from milk and cheese had inhibitory activity against spoilage and pathogenic bacteria such as *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., and bacteria of coliform group [27, 28]. Two hundred and twenty six LAB strains, isolated from various “Alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages), were screened for their antagonistic activity against food pathogens [29]. Fourteen isolates were active against *L. innocua* and *L. monocytogenes*. Our results are interesting, because of several of our isolates displayed antibacterial activity against *L. monocytogenes*.

Several antimicrobial substances may be synthesized by enterococci, such as organic acids (like lactic acid), hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl, acetaldehyde and bacteriocins, called enterocins [30]. Although the nature of the antimicrobial substances was not investigated in this study, production of enterocins is widespread among *Enterococcus* spp. [31]. Enterocins are most frequently produced by *E. faecium* strains, however, many other species of *Enterococcus* have also been found to produce bacteriocins, including *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* and *E. columbae* [32, 33].

Although, the efficiency of enterocins against food spoilage and pathogenic bacteria in food systems is well demonstrated [34], little information is available on the role of bacteriocins in the animal ecosystem. Some studies indicated application of enterocins or enterocin-producing strains to control/reduce pathogenic bacteria (*Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *E. coli*) in the gastrointestinal tract of animals [3, 35]. *E. faecium*, for example, which is contained in many probiotic preparations, inhibits the adhesion of enterotoxigenic *E. coli* K88 to porcine small intestine mucus [36].

Several methods have been developed to evaluate antioxidant activity, including quantification of products formed during lipid peroxidation (TBARS) and free radicals (ABTS<sup>•+</sup> and DPPH) scavenging assays [37, 38, 39]. Our results clearly depict the *in vitro* antioxidant activity of the food isolated enterococci as observed by all the three methods, although the radical scavenging effect was only observed for culture supernatants. On contrast, free radical scavenging activity was described to intracellular extracts of some LAB, such as *Lactobacillus delbrueckii* [40], *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* [41].

In our work, olive oil (monounsaturated fatty acid) was used as substrate and ferrous sulfate as a pro-oxidant since it can split lipid hydroperoxides. The oxidation of olive oil was inhibited by adding the samples of culture supernatants and cell extracts, as a clear decrease in absorbance was observed resulting from the inhibition of lipid peroxidation (antioxidant activity). These results suggest that the strains have antioxidant properties.

Though TBARS method is widely accepted, other methods for evaluation of antioxidant activity, like DPPH radical method and ABTS<sup>•+</sup> radical method, can be used. These tests are different in relation to reaction mechanism to target radical species, reaction conditions and expression of the results. There is no universal method to evaluate antioxidant activity. Thus it is necessary to use different methods to properly evaluate the antioxidant capacity [42]. The antioxidant activity of culture supernatants and cell extracts were measured as capability of sequestration of free radicals, according to the ABTS<sup>•+</sup> method. This method measures the ability of the sample in sequester the radical ABTS<sup>•+</sup>, compared with a standard amount of Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), and it is an excellent tool to determine the antioxidant activity of antioxidants and hydrogen donors terminators of antioxidants chains [17].

The high antioxidant activity found in culture supernatants was confirmed by the results obtained with the DPPH radical method. The DPPH free radical is stable but efficient antioxidant substances transfer electrons or hydrogen atoms to it neutralizing its radical character [43]. Microbial antioxidants are involved in termination of free radical reactions and reducing power [44]. The DPPH test

provides information about the reactivity of an antioxidant with a stable free radical [45].

Absence of antioxidant activity in cell extracts of some isolates suggests that this property may be extracellular. It may also be due to loss of activity from the method of extraction. The effectiveness of ultrasonic disruption of microbial cells varies between organisms. The influence of ultrasonic waves in the activity and stability of enzymes has been shown to be specific for each enzyme and dependent on parameters of sonication [46]. Detection of the antioxidant activity of these microorganisms in the culture supernatant offers a practical advantage in that it eliminates the need for free radical transport to cellular sites with antioxidant activity.

In summary, the antimicrobial and antioxidant capacities of these lactic acid bacterial isolates indicate they could be very useful in food fermentation and feed composition. They could particularly help to inhibit pathogenic microorganisms as well as oxidative spoilage in foods and feeds. The capacity of the isolates to accumulate selenite ( $\text{Se}^{+4}$ ), an essential element, is currently under study.

## **Acknowledgments**

Authors thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for scholarship to Simone Pieniz. This work received financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). The thermal cycler used for PCR amplification of 16S rRNA gene of bacterial isolates was purchased with an equipment grant from Auburn University at Montgomery.

## **5 References**

- [1] Chao, S.H., Tomii, Y., Watanabe, K., Tsai, Y.C., 2008. Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu. *Int. J. Food Microbiol.*, 123, 134-141.

- [2] O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593-604.
- [3] Cheng, H., Hoover, D.G., 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2, 82-100.
- [4] Storz, G., Imlay, J., 1999. Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 188-194.
- [5] Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.*, 97, 1634-1658.
- [6] Kapila, S., Vibha, P.R.S., 2006. Antioxidative and hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus casei* ssp *casei* (biodefensive properties of lactobacilli). *Indian J. Med. Sci.*, 60, 361-370.
- [7] Terahara, M., Nishide, S., Kaneko, T., 2000. Preventive effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the oxidation of LDL. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 1868-1873.
- [8] Wang, Y.C., Yu, R.C., Chou, C.C., 2006. Antioxidative activities of soy milk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.*, 23, 128-135.
- [9] Noonpakdee, W., Sitthimonchai, S., Panyim, S., Lertsiri, S., 2004. Expression of the catalase gene *katA* in *starter* culture *Lactobacillus plantarum* TISTR850 tolerates oxidative stress and reduces lipid oxidation in fermented meat product. *Int. J. Food Microbiol.*, 95, 127-135.
- [10] Kaizu, H., Sasaki, M., Nakajima, H., Suzuki, Y., 1993. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *J. Dairy Sci.*, 76, 2493-2499.
- [11] Lin, M.Y., Yen, C.L., 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1460-1466.
- [12] Sanders, J.W., Leehouts, K.J., Haandrikmam, A.J., Venema, G., Kok, J., 1995. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J. Bacteriol.*, 177, 5254-5260.

- [13] Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing, In: E. Stackebrandt, M.N. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Wiley, Chichester, pp. 115-147.
- [14] Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24, 1596-1599.
- [15] Bromberg, R., Moreno, I., Delboni, R.R., Cintra, H.C., 2006. Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 and its effect on *Listeria monocytogenes* in bovine meat. *Cienc. Tecnol. Alim.*, 26, 135-144.
- [16] Ohkawa, H., Ohishi, H., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351-358.
- [17] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Panala, A., Yang, M., *et al.*, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 26, 1231-1237.
- [18] Rossini, K., Noreña, C.P.Z., Olivera, F.C., Brandelli, A., 2009. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. *LWT-Food Sci. Technol.*, 42, 862-867.
- [19] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 25-30.
- [20] EMBRAPA, 1997. Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para Agricultura. Manual do Usuário Ferramental Estatístico. Ambiente de Software NTIA. Versão 4.2.2. Campinas.
- [21] Valenzuela, A.S., Ben Omar, N., Abriouel, H., López, R.L., Veljovic, K., *et al.*, 2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 20, 381-385.
- [22] De Vuyst, L., Foulquie-Moreno, M.R., Revets, H., 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.*, 84, 299-318.

- [23] Gomes, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I.C.V., Darini, A.L.C., Felis, G.E., *et al.*, 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.*, 25, 668-675.
- [24] Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., Knight, R., 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucl Acids Res.*, 35, 1-10.
- [25] Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2008. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.*, 18, 714-728.
- [26] Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 1-15.
- [27] Caridi, A., 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *Int. J. Dairy Technol.*, 13, 191-200.
- [28] González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., *et al.*, 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18, 716-722.
- [29] Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T., *et al.*, 2007. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from "Alheiras" (traditional Portuguese fermented sausages): *in situ* assays. *Meat Sci.*, 76, 796-800.
- [30] Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, R.A., 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 39, 13-126.
- [31] Maqueda, M., Sanchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalban-López, M., Valdivia, E., *et al.*, 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32, 2-22.
- [32] Sabia, C., Messi, P., De Niederhausern, S., Manicardi, G., Bondi, M., 2004. Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus faecalis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38, 99-105.
- [33] Sánchez, J., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M., *et al.*, 2007. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by

- Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). FEMS Microbiol. Lett., 270, 227-236.
- [34] Lauková, A., Mareková, M., 2001. Production of bacteriocins by different enterococcal isolates. Folia Microbiol., 46, 49-52.
- [35] Mareková, M., Lauková, A., Skaugen, M., Nes, I., 2007. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 34, 533-537.
- [36] Fioramonti, J., Theodorou, V., Bueno, L., 2003. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., 17, 711-724.
- [37] Aruoma, O.I., 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutat. Res., 523, -20.
- [38] Frankel, E.N., Meyer, A.S., 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. J. Sci. Food Agric., 80, 1925-1941.
- [39] Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Food Agric., 76, 270-276.
- [40] Lin, M.Y., Yen, C.L., 1999. Reactive oxygen species and lipid peroxidation product-scavenging ability of yogurt organisms. J. Dairy Sci., 82, 1629-1634.
- [41] Lin, M.Y., Chang, F.J., 2000. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Digest. Dis. Sci., 45, 1617-1622.
- [42] Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem., 53, 1841-1856.
- [43] Naik, G.H., Priyadarsini, K.I., Sata, J.G., Banavalikar, M.M., Sohoni, D.P., *et al.*, 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in ayurvedic medicine. Phytochemistry, 63, 97-104.



- [44] Yang, J.H., Mau, J.L., Ko, P.T., Huang, L.C., 2000. Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chem.*, 71, 249-254.
- [45] Banerjee, A., Dasgupta, N.B., 2005. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem.*, 90, 727-733.
- [46] Özbek, B., Ülgen, K.O., 2000. The stability of enzymes after sonication. *Process Biochem.*, 35, 1037-1043.

**Table 1.** Antimicrobial activity of culture supernatants and cell extracts of LAB against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Strain	Inhibition zone (mm)	
	Culture Supernatant	Cell Extract
LAB 1	8.0±0.20	8.3±0.27
LAB 2	9.0±0.32	0
LAB 3	7.7±0.15	0
LAB 4	7.3±0.05	0
LAB 5	8.0±0.12	0
LAB 7	7.3±0.06	0
LAB 16	8.7±0.29	8.0±0.18
LAB 17	8.3±0.09	8.3±0.17
LAB 18	8.7±0.29	7.3±0.06
LAB 21	7.7±0.21	0
LAB 24	7.0±0.02	0
LAB 32	8.0±0.18	7.0±0.02
LAB 38	7.0±0.02	0
LAB A3	7.5±0.08	0
LAB A33	7.8±0.08	0
LAB A11	7.7±0.23	0
LAB A111	8.0±0.21	0
LAB B22	8.0±0.08	0
LAB C5	7.5±0.16	0
LAB IS196	10.7±0.13	9.7±0.23
LAB IS197	11.0±0.15	9.3±0.08

\* The strains LAB 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 19, 20, 22, 29, 30, 31, 33 showed inhibitory zones of  $\leq 7$  mm in both culture supernatants and cell extracts. Results are means  $\pm$  standard error of the mean.

## Figure legends

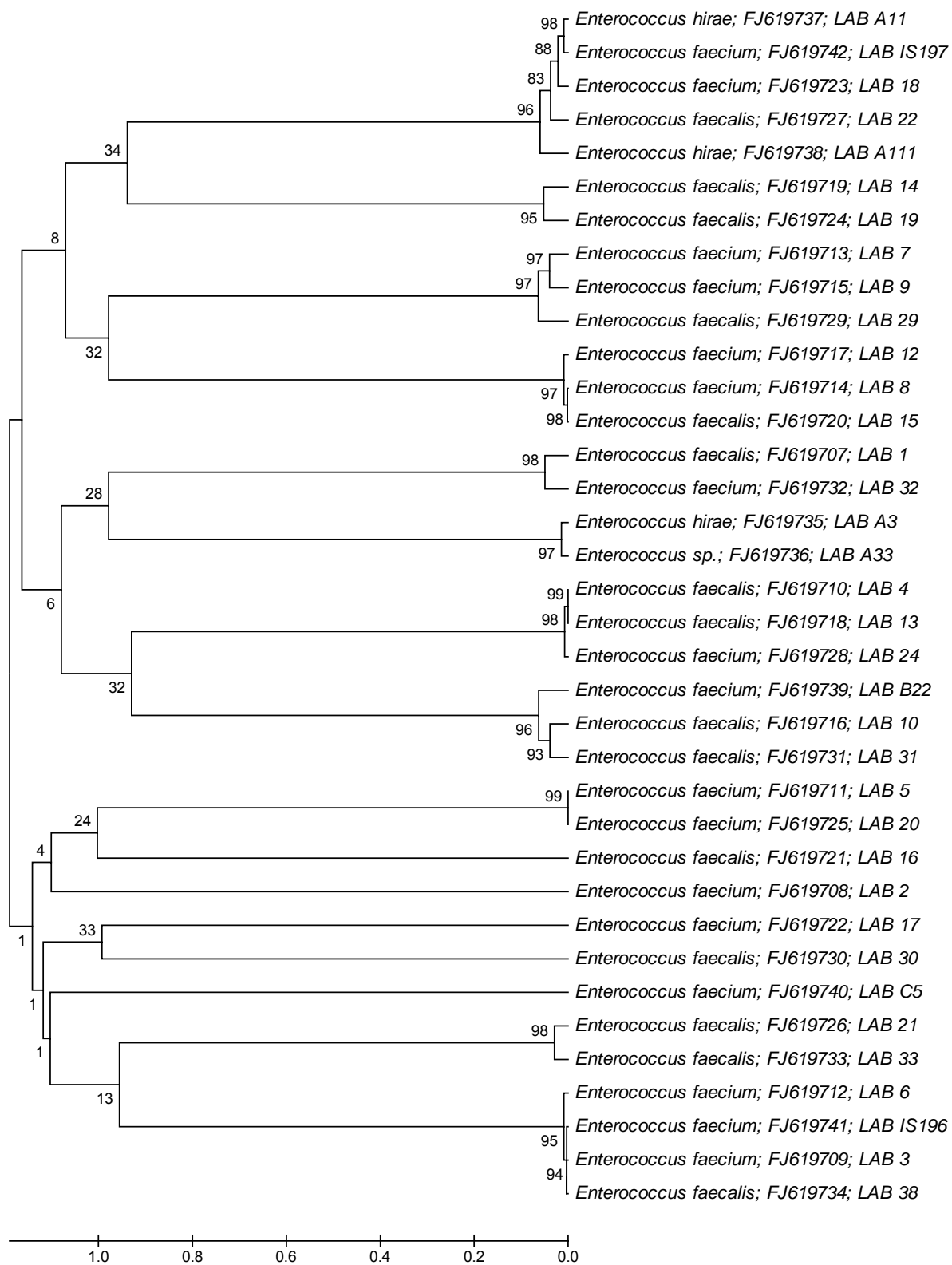
**Fig. 1.** Phylogenetic tree showing evolutionary distance between lactic acid bacterial isolates based on 16S rRNA gene sequence (500 pb). The scale represents the evolutionary distance value. The number at each node is the bootstrap from 100 replicates.

**Fig. 2.** Evaluation of culture supernatants of isolates for antioxidant activity using thiobarbituric reactive substances (TBARS) method. *E. faecium* (Fig. 2A); *E. faecalis* (1-38), *Enterococcus sp.* (A33) and *E. hirae* (A3-A111) (Fig. 2B). Results are means  $\pm$  standard error of the mean.

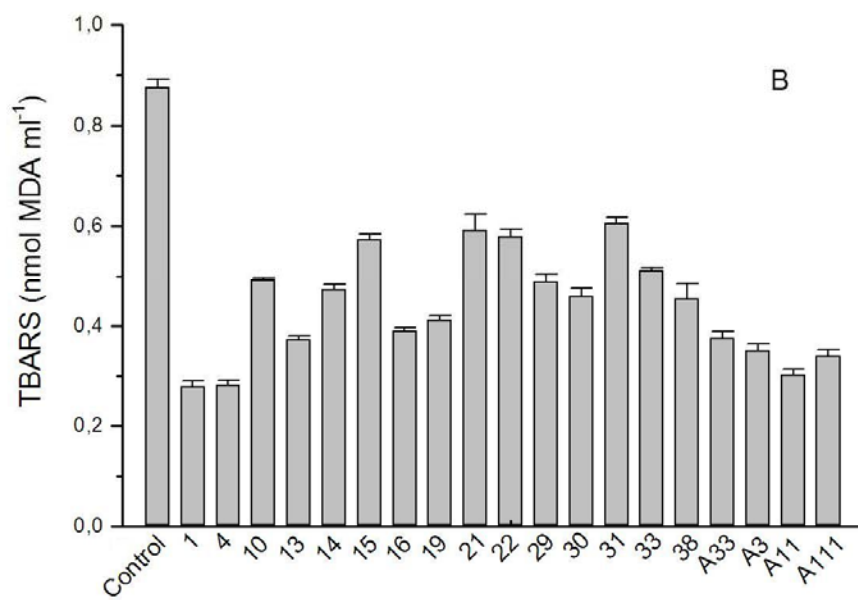
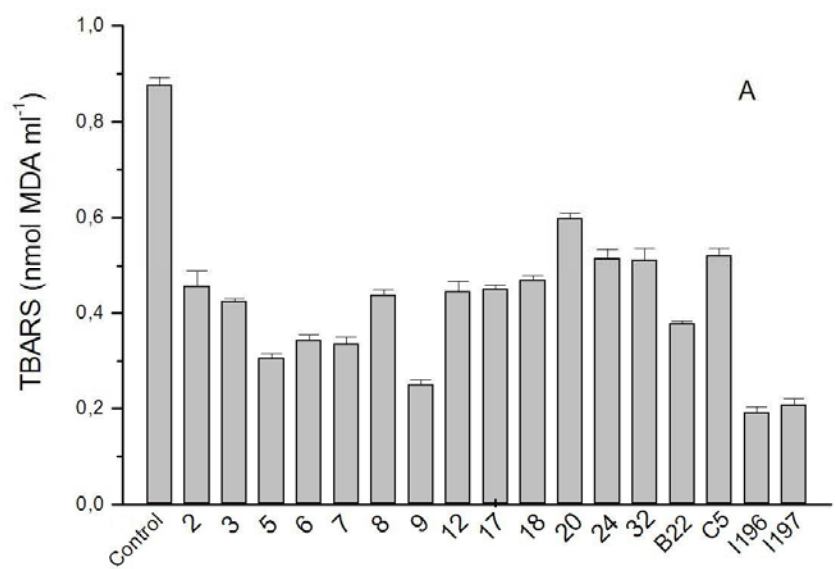
**Fig. 3.** Evaluation of cell extracts of isolates for antioxidant activity using thiobarbituric reactive substances (TBARS) method. *E. faecium* (Fig. 3A); *E. faecalis* (1-38), *Enterococcus sp.* (A33) and *E. hirae* (A3-A111) (Fig. 3B). Results are means  $\pm$  standard error of the mean.

**Fig. 4.** Determination of antioxidant capacity of culture supernatants using the ABTS<sup>+</sup> method. *E. faecium* (Fig. 4A); *E. faecalis* (1-38), *Enterococcus sp.* (A33) and *E. hirae* (A3-A111) (Fig. 4B). Results are means  $\pm$  standard error of the mean.

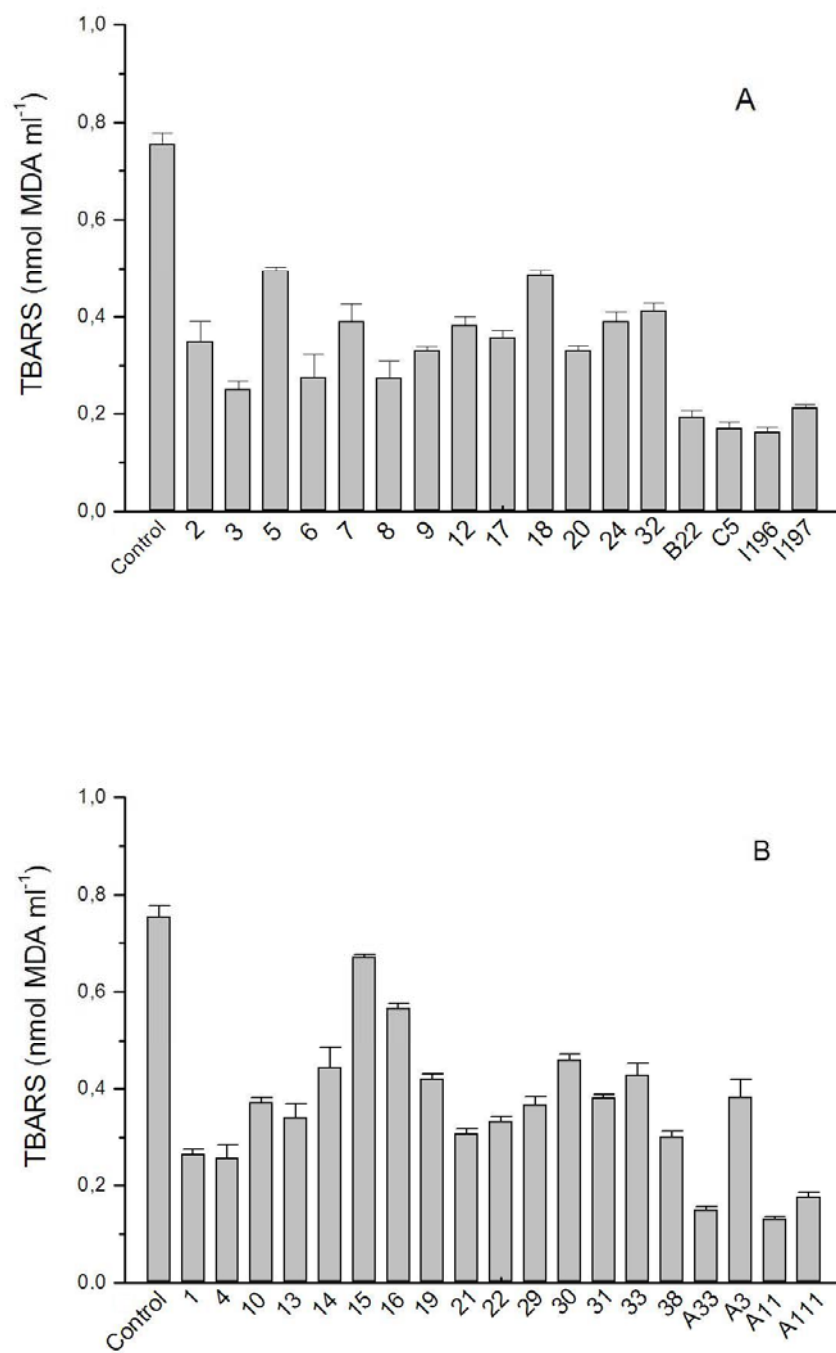
**Fig. 5.** Determination of antioxidant capacity of culture supernatants using the DPPH method. *E. faecium* (Fig. 5A); *E. faecalis* (1-38), *Enterococcus sp.* (A33) and *E. hirae* (A3-A111) (Fig. 5B). Results are means  $\pm$  standard error of the mean.



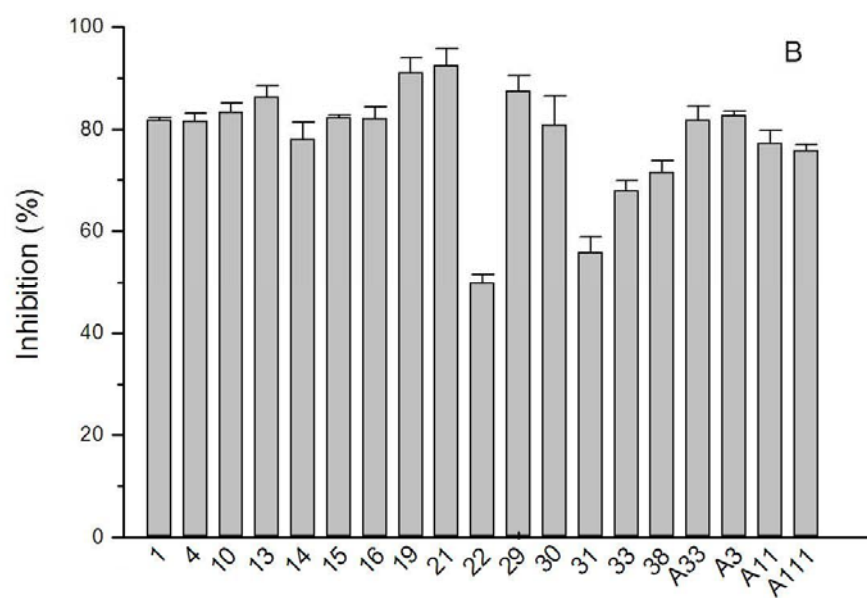
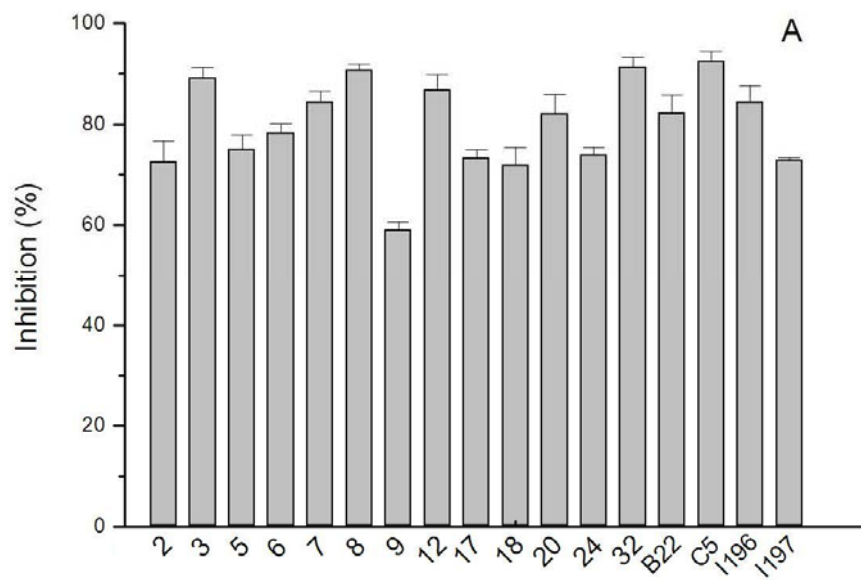
Pieniz et al., Fig. 1



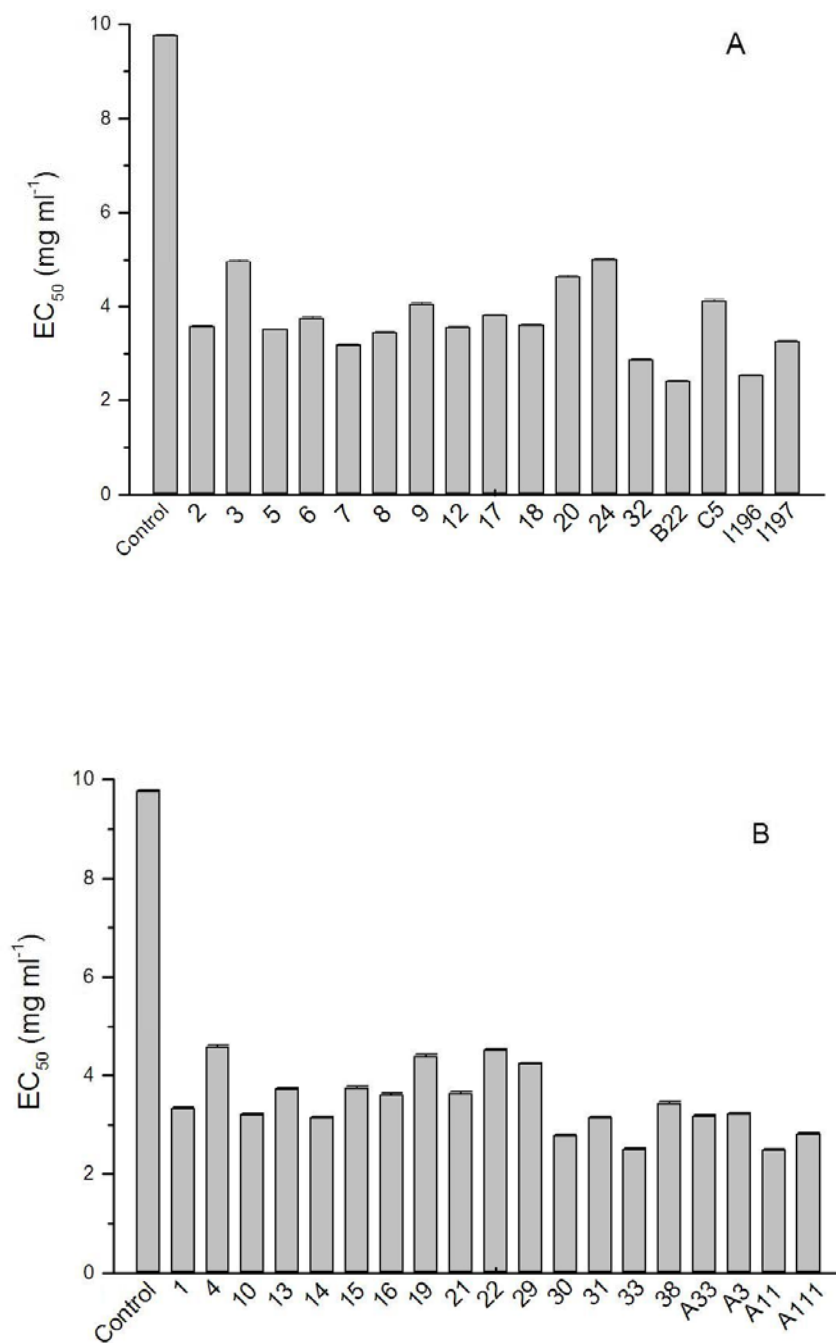
Pieniz et al., Fig. 2



Pieniz et al., Fig. 3



Pieniz et al., Fig. 4



Pieniz et al., Fig. 5



**CAPÍTULO III – Artículo II**

**EVALUATION OF SELENITE BIOREMOVAL FROM LIQUID CULTURE BY  
*ENTEROCOCCUS* SPECIES**

### 3.2. Evaluation of selenite bioremoval from liquid culture by *Enterococcus* species

Simone Pieniz<sup>a,b</sup>, Benedict C. Okeke<sup>a\*</sup>, Robson Andreazza<sup>a,c</sup> and Adriano Brandelli<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Biology, Auburn University at Montgomery, P.O. Box 224023, Montgomery, AL 36124, USA.

<sup>b</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brazil.

<sup>c</sup>Departamento de Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

\*Corresponding author: Tel: +1 334 244 3508; Fax: +1 334 244 3826, *E-mail* address: [bokeke@aum.edu](mailto:bokeke@aum.edu) (Benedict C. Okeke)

## Abstract

The genus *Enterococcus* belong to the genera of bacteria that produce lactic acid and can confer health benefits to living organisms. Selenium (Se) is an essential micronutrient for humans and animals. Thirty-six *Enterococcus* species isolated from dairy products were screened for Se(IV) sorption capacity for use as a probiotics in animal nutrition. Several isolates grew luxuriantly and significantly removed Se(IV) from Se(IV) amended medium. Two isolates, LAB 14 and LAB 18, identified by 16S rRNA gene sequence analysis as *Enterococcus faecalis* (98% nucleotide sequence similarity) and *Enterococcus faecium* (97% nucleotide sequence similarity), respectively, were selected for further studies. The two isolates grew optimally and removed selenium at initial pH 7.0. Optimum removal of Se(IV) from the medium was recorded at 25°C. Time course studies showed that after 9 hours of incubation LAB 14 and LAB 18 cultures displayed the highest biomass production and Se(IV) bioremoval and most selenite in culture depleted in 24 h. At initial concentrations of 10 mg L<sup>-1</sup> and 60 mg L<sup>-1</sup>, *E. faecium* (LAB 18) removed 9.91 mg L<sup>-1</sup> and 59.70 mg L<sup>-1</sup>, respectively after 24 h. Similar Se(IV) bioremoval capacity was recorded with *E. faecalis* (LAB 14). Substantial amount of selenium was detected in biomass of *E. faecium* (0.4599 mg g<sup>-1</sup> of dry weight and *E. faecalis* (0.4759 mg g<sup>-1</sup> of dry weight). The significant uptake of Se(IV) by the *Enterococcus* species observed in this study suggest that they can be used to deliver dietary Se through feed augmentation with Se(IV)-enriched *Enterococcus* biomass.

Keywords: *Enterococcus*; selenium; biomass production; biosorption; probiotic

## Introduction

*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Bifidobacterium* (Khedid et al., 2009) are the most important genera of lactic acid bacteria (LAB). These organisms are currently under intensive research because of their probiotic properties (ability to bestow health benefits to living systems) and other essential roles in most fermented foods including antimicrobial activity, antitumor activity, reduction of serum cholesterol, alleviation of lactose intolerance, stimulation of the immune system and stabilization of gut microflora (Toma and Pokrotnieks, 2006; Khedid et al., 2009; Malinowska et al., 2009).

The enterococci are Gram-positive, catalase-negative, spherical bacteria that share many characteristics with the genera *Streptococcus* and *Lactococcus* in the order Lactobacillales (Cai, 1999). They are part of the dominant flora in traditionally fermented cheeses made with raw milk and play a relevant role in the development of the organoleptic characteristics of the final product due to their proteolytic and esterolytic activities as well as production of diacetyl through citrate metabolism (Valenzuela et al., 2009). Franz et al. (2007) reported that many strains of enterococci, mainly *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, may produce a variety of bacteriocins active against foodborne pathogens such as *Bacillus cereus*, *Clostridium spp.*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Currently, there is increasing interest to add probiotic microorganisms to animal diets in place of antibiotics because they leave no residues in the environment and the carcass of the animal which may cause resistance to antimicrobials (Simon, 2005).

Selenium (Se) is an essential micronutrient because of its antioxidant properties. It stimulates the activity of glutathione peroxidase, an antioxidant enzyme (Lyn, 2004). Trace concentrations are required for normal growth and development, low concentrations can be stocked for maintenance of homeostatic functions but high concentrations can result in toxic effects (Hamilton, 2004). Some enzymes (selenoenzymes), including glutathione peroxidase, iodothyronine

deiodinase, and thioredoxin reductase (Brigelius-Flohe, 1999) contain selenocysteine. It was found that selenium could also form selenomethionine (SeMet) by replacing sulfur in methionine and could then be incorporated nonspecifically into proteins instead of methionine (Behne and Kyriakopoulos, 2001). In addition, selenium can be incorporated into other biological macromolecules, such as seleno-tRNA-s and selenosugar, influencing the synthesis of selenoproteins (Suzuki et al., 2006; Piršljcin et al., 2008).

A number of microorganisms have been reported to take up and transform significant concentrations of selenium species such as selenate and selenite (Dungan et al., 2003; Siddique et al., 2005). However, only few studies on selenite uptake and transformation have been conducted with probiotic microorganisms (Calomme et al., 1995; Zhang et al., 2009). We had reported that *Enterococcus* species display antibacterial and antioxidant capacity. Se-enriched probiotic microbial biomass can be used to deliver dietary levels of Se to livestock through feed augmentation. In this study the capacity of *Enterococcus* strains to remove and transform Se(IV) added to culture medium was investigated. Factors affecting Se uptake and transformation by the *Enterococcus* species were also evaluated.

## **Materials and methods**

### **Microorganisms and culture conditions**

Thirty six lactic acid bacteria isolated from “Minas Frescal” cheese were obtained from the culture collection of Laboratory of Applied Microbiology and Biochemistry of Foods - ICTA, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Inoculum were prepared by transferring three loops of each isolate to 20 mL of tryptic soy broth (TSB) in air-tight sealed tubes without shaking and incubated at 35°C for 24 h without agitation. Optical density (OD<sub>600</sub>) of each inoculum was measured using a spectrophotometer. Five milliliters of TSB amended with sodium selenite (10 mg L<sup>-1</sup>) in 16 x 125 mm glass tubes equipped with polypropylene caps were inoculated in independent experiments with 100 µL of each inoculum and

gently mixed. Cultures were incubated at 35°C for 24 h. Inhibition (%) was calculated as % difference in OD<sub>600</sub> of cultures amended and not amended with Se(IV).

### **Analysis of bacterial mass and Se(IV)**

Biomass development in culture was monitored by measuring optical density (OD<sub>600</sub>) using sterile tryptic soy broth as the blank. Remaining Se concentrations in supernatants of cultures subjected to centrifugation (2.500 x g for 10 min) were analyzed by hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS) (Zhang et al., 1999).

### **Determination of selenium content in biomass**

The method of Zhang et al. (2009) was used with slight modification. Briefly, twenty milliliters of TSB medium amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of sodium selenite were inoculated with 100 µL of each inoculum. Strains were cultivated at 35°C for 24 h. Cells were harvested by centrifugation and digested in 6 mL of nitric acid. The samples were left for 10 h at room temperature and then heated to 90°C for 1 h. The temperature was then elevated to 120°C for 2 h. Thereafter 1 mL of perchloric acid was added and the temperature was elevated to 180°C for 30 min. After cooling the vessels down to 50°C, the samples were transferred to volumetric flasks and made up to a final volume of 20 mL with deionized water. The selenium content in each sample was determined following digestion in concentrated nitric-perchloric acid by Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry (ICP-OES).

### **Molecular identification of selected isolates**

Two isolates LAB 14 and LAB 18 highly efficient in Se enrichment in biomass was selected for further studies were identified by 16S ribosomal rRNA gene sequencing by means of the following procedures.

### **Cultivation of isolates and DNA extraction**

The isolates were plated by streaking on tryptic soy agar plates and incubated at 37°C for 24 h for evaluation of culture purity. DNA was extracted from the cells using Promega Wizard Genomic DNA Purification at Kit (Promega, Madison, WI) with slight modification. Briefly, cells from representative five colonies were re-suspended in 300 µL of nucleic acid lysis solution and incubated at 80°C for 15 min and allowed to cool to room temperature. RNase solution (1.5 µL) was added and incubated at 37°C for 60 min. Protein precipitation solution (100 µL) was added and the tubes incubated on ice for 5 min. Following centrifugation, the supernatant was transferred to a tube and 900 µL of ice cold 95% ethanol was added. The precipitate was recovered by centrifugation. Pellets were washed with 70% ethanol at ambient temperature and re-suspended in sterile distilled water.

### **Amplification of DNA by polymerase chain reaction**

The 16S rRNA genes of all isolates was amplified using bacterial universal primers corresponding to *E. coli* positions 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGAC TT-3') were used for PCR amplification of the 16S ribosomal RNA (Lane, 1991). The PCR reaction mixture consisted of 12.5 µL of PCR master mix (Promega, Madison, WI), genomic DNA template (0.5 µL), primer 27F (2.5 µL=12.5 pmol), primer 1492R (2.5 µL=12.5 pmol) and made up to 25 µL final volume with nuclease-free water. The 16S rRNA gene was amplified using a 35-cycle PCR (initial denaturation, 95°C for 5 min; subsequent denaturation, 95°C for 0.5 min; annealing temperature, 50°C for 1 min;

extension temperature, 72°C for 1 min and final extension, 72°C for 5 min). The PCR amplification products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel. Millipore Montage PCR filter units (Millipore, Billerica, MA) were used to remove primers salts, and unincorporated dNTPs according to the manufacturer's instructions except that an additional 400 µL of sterile nuclease free water was added to wash off residual PCR ingredients.

### **DNA sequencing**

DNA polymerase-mediated amplification of templates in the presence of mixtures of dNTPs, fluorescently-labeled dideoxynucleotide triphosphates and primer 519r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') using Sanger (BigDye) terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) was conducted at the Institute of Integrative Genomics Biology, UC Riverside, CA. Extension products were fractionated by capillary electrophoresis using Applied Biosystems 3730-XL DNA sequencing machine following the manufacturers' instructions.

### **Phylogenetic analysis of ribosomal RNA gene**

Evolutionary position amongst related lactic acid bacteria was analyzed by RDP release 10 software (Cole et al., 2009). Nucleotide sequence similarity searches were analyzed by Genbank Blast analysis and PDP seqmatch. DNA sequence employed included the V1, V2 and V3 hypervariable regions (Neefs et al., 1990).

### **Effect of temperature and pH**

Temperature and pH effects on bacterial growth and Se(IV) bioremoval were examined using TSB medium amended with Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (15 mg L<sup>-1</sup>). For the temperature effect, cultures were incubated at 25; 30; 35; 40 and 45°C for 24 h. In the experiment that examined the influence of pH, sterilized TSB medium



contaminated with sodium selenite was adjusted to pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0 by addition of predetermined amounts of sterilized 1M NaOH or 1M HCl. Inoculum was prepared by inoculating TSB containing 15 mg L<sup>-1</sup> of sodium selenite with three loops of 24-h-old isolate LAB 14 and LAB 18 colonies in tryptic soy agar. Cultures were incubated at 35°C for 24 h. Cultures for pH studies were then inoculated with 100 µL of inoculum (OD<sub>600</sub>=0.148 for LAB 14 and 0.111 for LAB 18, diluted 10 times before measurement).

### **Effect of Se(IV) concentration**

The effects of different concentrations of Se(IV) were determined using TSB medium amended with 10, 20, 30, 40, 50 and 60 mg L<sup>-1</sup> of Se(IV) using Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. The sterile Se(IV) media were inoculated with 100 µL aliquots of LAB 14 and LAB 18 (OD<sub>600</sub>=0.154 and 0.105 respectively, of cultures diluted 10 times) and incubated at 35°C for 24 h. Inoculum preparation, Se(IV) analysis and biomass determination were as described under the previous sections.

### **Time course analysis of Selenium biosorption**

In time course studies of Se(IV) bioremoval, TSB medium was amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of Se(IV) using Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Each medium was inoculated with 100 µL of LAB 14 and LAB 18 (OD<sub>600</sub>=0.154 and 0.105 respectively, of cultures diluted 10 times). Se(IV) bioremoval and biomass development were determined after 0, 2, 4, 8, 12 and 24 h of incubation at 35°C.

## **Results**

### **Growth and Se(IV)-resistance of lactic acid bacterial isolates in media amended with Se(IV)**

Substantial growth was recorded with the 36 lactic acid bacterial isolates ( $OD_{600}$ =1.0; 1.02; 1.03; 1.04; 1.04; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.07; 1.07 for isolates LAB B22; LAB 31; LAB 9; LAB 10; LAB 21; LAB 19; LAB 30; LAB 33; LAB IS 197; LAB 14; LAB 22 respectively) in media amended with 10 mg L<sup>-1</sup> of Se(IV). Figure 1 presents inhibition of growth of the 36 lactic acid bacteria. Between 0% and 28% inhibition of biomass development was observed amongst the isolates. LAB 20 was the most sensitive to Se(IV) and 28% inhibition was observed after 24 h of growth in medium amended with 10 mg L<sup>-1</sup> Se(IV). On the other hand, isolate LAB IS 197 was the least sensitive to Se(IV) with 0% inhibition observed in 24 h.

### **Se(IV)-bioremoval by lactic acid bacterial isolates**

Bioremoval of Se(IV) from media by lactic acid bacterial isolates is shown in Figure 2. Many of the isolates displayed significant Se(IV) bioremoval. Se(IV) bioremoval capacity was however comparatively higher in isolates LAB 7, 13, 14, 16 and 18 compared to other isolates. LAB 18 displayed the highest Se(IV) bioremoval capacity and removed more than 8 mg L<sup>-1</sup> of Se(IV) (> 80% bioremoval in 24 h). Se(IV) bioremoval was less than 2% in isolates LAB 31, 33, 38, A11, B22, C5, IS 196 and IS 197. Two isolates, LAB 14 and LAB 18, were selected for characterization of Se(IV) bioremoval.

### **Characterization of isolates LAB 14 and LAB 18**

Microscopic examination of isolates LAB 14 (FJ619719) and LAB 18 (FJ619723) revealed that they are Gram-positive cocci and mainly assemble in pairs. The isolates grew luxuriantly in sealed tubes indicating that they are facultatively anaerobic. GenBank Blast analysis of partial 16S rRNA gene sequence including hyper-variable regions V1, V2 and V3, identified isolates LAB 14 and LAB 18 as *Enterococcus faecalis* (98% identity) and *Enterococcus faecium* (97% identity), respectively. Nucleotide sequence of isolates LAB 14 (521 bp) and LAB 18 (521 bp) were deposited to the GenBank under accession numbers

FJ619719 (LAB14) and FJ619723 (LAB 18), respectively. Figure 3 presents a phylogenetic tree showing the evolutionary position of LAB 14 and LAB 18 among other members of the Lactobacillaceae family with *Paenibacillus borealis* in the family Paenibacillaceae as the out-group organism.

### **Selenium accumulation by bacterial isolates**

The selenium content in the biomass of isolates *E. faecalis* (LAB 14) and *E. faecium* (LAB 18) was determined after growth in medium amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of Se(IV) for 24 h (Table 1). The selenium content in biomass was 0.4759 and 0.4599 mg of selenium g<sup>-1</sup> of dry weight of biomass of *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively.

### **Effect of pH on Se(IV) bioremoval and biomass development**

The pH of the medium influenced both growth of isolates and Se(IV) bioremoval (Figure 4). The isolates grew luxuriantly at initial pH range between 6.0 and pH 9.0. Biomass development in Se(IV) medium was maximal in at initial pH 7.0 for both isolates (Figure 4A). The isolates were indifferent in their pattern of Se(IV) bioremoval from culture medium in the pH range 6.0 to 9.0 and removed most detectable Se(IV) from the medium at pH 6.0 to 9.0 (Figure 4B). Slight acidification of the medium was observed after 24 h of growth but overall pH variation was not significant (Figure 4C).

### **Effect of temperature**

The effect of temperature on biomass production and Se(IV) bioremoval in media was evaluated (Figure 5). Temperature had similar effect on growth of the isolates in the range from 25°C to 40°C. Biomass production was maximal in Se(IV) cultures of both isolates at 25°C (Figure 5A). Significant decrease in growth

of the isolates was observed at 45°C. Similar Se(IV) bioremoval pattern was observed for both isolates and most Se(IV) was removed within 24 h (Figure 5B).

### **Effect of Se(IV)-concentration**

Influence of different concentrations of Se(IV) on growth and Se(IV) bioremoval was examined in the range of 10-60 mg L<sup>-1</sup> (Table 2). Both isolates displayed similar pattern of growth and Se(IV) bioremoval at different concentrations. Se(IV) bioremoval increased with increase in concentration. Cell density measured as absorbance also increased with concentration. At initial concentrations of 10 mg L<sup>-1</sup> and 60 mg L<sup>-1</sup>, *E. faecium* (LAB 18) removed 9.91 mg L<sup>-1</sup> and 59.70 mg L<sup>-1</sup>, respectively after 24 h.

### **Time course**

Time course of biomass development and Se(IV) bioremoval was measured in TSB medium amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of Se(IV) (Figure 6). Isolates LAB 14 and LAB 18 grew exponentially in the Se(IV) amended medium and reached the stationary phase within 8 h. Similarly Se(IV) bioremoval by both isolates increased exponentially reaching maximum after 8 h and thereafter stabilized. Greater than 95% of initial concentration of Se(IV) was removed in 8 h.

### **Discussion**

Selenium, a metalloid, is an essential nutrient necessary for good health in living systems at low concentrations. In this study, 36 lactic acid bacterial isolates substantially grew and removed Se(IV) in media amended with 10 mg L<sup>-1</sup> selenite. Two *Enterococcus* species identified as *E. faecalis* and *E. faecium* by 16S rRNA sequencing displayed significant uptake of Se(IV) under different culture conditions. Cells were slightly red in most cases and substantiate the uptake and transformation of Se(IV) to elemental Se.

Our results showed that LAB 14 and LAB 18 are efficiently able to bioaccumulate selenium in the microbial biomass. The LAB 14 accumulated  $0.4759 \text{ mg g}^{-1}$  of dry weight, and isolate LAB 18 accumulated  $0.4599 \text{ mg g}^{-1}$  of dry weight, in medium amended with  $15 \text{ mg L}^{-1}$  of Se (IV). According to the report by Calomme et al. (1995), the selenium concentrations in lyophilized cells, cultured in the presence of  $1 \text{ mg L}^{-1}$  Se(IV), were 375, 253 and  $407 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  for *Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Lactobacillus casei ssp. casei*, respectively. Andreoni et al. (2000) found similar results in their study, using different strains of *Lactobacillus*, in medium amended with  $2 \text{ mg L}^{-1}$  of Se(IV). Se-enriched biomass of our isolates could serve as a supplement for dietary selenium.

Temperature and pH are important parameters that regulate microbial metabolic activities. *E. faecalis* (LAB 14) and *E. faecium* (LAB 18) substantially removed Se(IV) from media over a wide range of pH (4.0-9.0) with significantly higher removal between pH 6.0 and 9.0. Biomass development was however very low at more acidic pH medium compared to pH 6.0 to 9.0 which strongly promoted biomass development. Shah (2007) reported optimum growth of *Bifidobacterium* at 6.0-7.0, with virtually no growth below pH 4.5-5.0 and above pH 8.0-8.5. Substantial growth and bioremoval of Se(IV) by *E. faecalis* (LAB 14) and *E. faecium* (LAB 18) was observed over a wide range of temperature (25-45°C). A marked decrease in cell density was however observed at 45°C. Shah (2000) reported growth of *Lactobacillus acidophilus* at as high as 45°C with optimum between 35-40°C and a *Bifidobacterium sp.* that grew optimally at of 37-41°C and maximally in the range at 43-45°C.

In studies of bioremoval of Se(IV) in media amended with different concentrations of Se(IV), removal increased with increasing concentration from 10.0 to  $60.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Contrarily in selenium culture of *Bifidobacterium animalis*, Zhang et al. (2008) observed that presence of  $10.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{Se}^{4+}$  or higher, significantly lowered growth compared to unsupplemented culture. Suhajda et al. (2000) reported that the selenium concentration of  $10.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  in the medium, or higher, yielded a pink or reddish biomass. Selenium can accumulate in bacterial

cells in organic and/or inorganic form or elemental form (Zhang et al., 2009). This may influence cell density.

Rapid growth is an important character of industrial microorganisms. Our time course studies on biomass development showed that LAB 14 and LAB 18 grew rapidly in selenium amended medium reaching a maximum biomass production and Se (IV) bioremoval within 8 h. Peak growth of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50 (Kojic et al., 1991) and *E. faecium* WHE (Izquierdo et al., 2009) were recorded after 8 h of growth in brain heart infusion broth.

Selenium is a very important nutrient in animal nutrition. In living organisms, a number of selenium compounds have been described including selenocysteine, selenomethionine, and trimethylselenonium (Lobinski et al., 2000). The value of addition of sodium selenite to animal feed is a current research interest. Use of selenium enriched biomass can result to greater weight gain, better rate of feed conversion, higher carcass yield and improved palatability of the different types of meat (Jin et al., 1998). Yu et al. (2008) found that selenium supplementation improved significantly the concentration of selenium in blood and liver with diets amended with selenite. Hintze et al. (2002) showed that the selenium content of muscle from grazing beef cattle was significantly related to the selenium level in the diet.

A dietary level of 0.3 mg kg<sup>-1</sup> is recommended for dairy cows (Phipps et al., 2008) and pigs (Lei et al., 1998). Interestingly, the *Enterococcus* species used in our study displayed substantial uptake and transformation of Se(IV). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus. plantarum* and *Lactobacillus casei* subsp. *casei* exposed to sodium selenite incorporated up to 0.407 ± 0.108 mg g<sup>-1</sup> dry weight (Calomme et al., 1995). Selenium accumulation was reported in yeast (Ponce de Leon et al., 2002) and filamentous fungi such as *Flammulina velutipes* (Ma et al., 2009) and *Ganoderma lucidum* (a medicinal mushroom) (Zhao et al., 2004). *Enterococcus* species and other lactic acid bacteria are however more attractive for biomass enrichment with micronutrients in that they are probiotic organisms which can confer health benefits to a healthy animal (López-Brea and Domingo, 2007).

Selenium is also an important nutrient for humans. The recommendations of selenium for humans are based on the Estimated Average Requirement (EAR) which recommends an intake of 15 to 20  $\mu\text{g day}^{-1}$  for children from 0 to 1 year old, 17 to 35  $\mu\text{g day}^{-1}$  for children between 1 and 13 years old. Selenium EAR for people over 14 years is 45  $\mu\text{g day}^{-1}$ . For pregnant women and infants the recommendations are 49 and 59  $\mu\text{g day}^{-1}$ , respectively (McLachlan et al., 2004). The Dietary Reference Intakes (DRI) for selenium for both men and woman is 55  $\mu\text{g day}^{-1}$ . This recommendation is based on the amount needed to maximize synthesis of the selenoprotein glutathione peroxidase (GPx). The tolerable upper intake Level for adult is set at 400  $\mu\text{g day}^{-1}$  (IOM, 2000). The percentage of absorption of inorganic selenium, sodium selenite, in humans is greater than 80%, and the absorption occurs mainly in the duodenum by simple diffusion. Similar absorption of sodium selenite occurs in animals, for example chickens (Mykkahen and Wasserman, 1989).

In summary, selenium is an important micronutrient for the health of humans and animals. Our results indicate that *E. faecalis* LAB 14 and *E. faecium* LAB 18 are potential organisms for supply of dietary levels of selenium through use of Se-enriched biomass as probiotic agents and in feed supplementation. In addition to using Se(IV)-enriched microbial biomass as a delivery system for dietary concentrations of selenium, such Se(IV)-enriched biomass can be used in food and feed to replace traditional sources of plants and animals protein (Boze et al., 1995).

## **Acknowledgments**

We give thanks to Yiqiang Zhang, University of California, Riverside and Steven Arnold, Auburn University Montgomery. Thanks to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial scholarship to Simone Pieniz. A grant from Auburn University at Montgomery to purchase a thermal cycler was awarded to Benedict Okeke. Adriano Brandelli is a Research Fellow of CNPq, Brazil.

## References

- Andreoni V, Luischi MM, Cavalca L, Erba D, Ciappellano S. Selenite tolerance and accumulation in the *Lactobacillus* species. *Ann Microbiol* 2000;50:77-88.
- Behne D and Kyriakopoulos A. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr* 2001;21:453-473.
- Boze H, Moulin G, Galzy P. Production of microbial biomass. In: Rehm HJ, Reed G, Puhler A, Stadler P, editors. *Biotechnology: A multi-volume comprehensive treatise*. New York:VCH; 1995. p. 167-220.
- Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biol Med* 1999;27:951-965.
- Cai Y. Identification and Characterization of *Enterococcus* Species Isolated from Forage Crops and Their Influence on Silage Fermentation. *J Dairy Sci* 1999;82:2466-2471.
- Calomme M, Hu J, Van Den Branden K, Vanden Berghe DA. Selenolactobacillus. Anorganic selenium source. *Biol Trace Elem Res* 1995; 47:379-383.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2009;37: 141-145.
- Dungan RS, Yates SR, Frankenberger WTJr. Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment. *Environ Microbiol* 2003;5:287-295.
- Franz CMAP, Van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping into a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 2007;31:293-310.
- Hamilton SJ. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci. Total Environ* 2004;326:1-331.
- Hintze KJ, Lardy GP, Marchello MJ, Finley JW. Selenium accumulation in beef: Effect of dietary selenium and geographical area of animal origin. *J Agric Food Chem* 2002;50: 3938-3942.



- IOM – Institute of Medicine. DRI – Dietary Reference Intakes: for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. Washington, DC: National Academy Press; 2000. p. 506.
- Izquierdo E, Marchioni E, Aoude-Werner D, Hasselmann C, Ennahar S. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol 2009;26:16-20.
- Jin LZ, Abdullah N, Ali MA, Jaluladin S. Effect of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. Anim Feed Sci Technol 1998;70:197-209.
- Khedid K, Faid M, Mokhtari A, Soulaymani A, Zinedine A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. Microbiol Res 2009;164:81-91.
- Kojic M, Svircevic J, Banina A, Topisirovic L. Bacteriocin-Producing Strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacitilactis* S50. Appl. Environ Microbiol 1991;57(6):1835-1837.
- Lei XG, Dann HM, Ross DA, Cheng WH, Combs Jr GF, Roneker KR. Dietary Selenium Supplementation Is Required to Support Full Expression of Three Selenium-Dependent Glutathione Peroxidases in Various Tissues of Weanling Pigs. The J Nutr 1998;128:130-135.
- Lobinski R, Edmonds JS, Suzuki KT, Uden PC. Species-selective determination of selenium compounds in biological materials. Pure Appl Chem 2000;72:447-461.
- López-Brea M and Domingo D. Antibioticoterapia con probióticos. Rev Esp Quimioterap 2007;20:170-181.
- Lyn P. Selenium biochemistry and cancer: A review of the literature. Alternative Med Rev 2004;9:239-258.
- Ma Y, Xiang Fu, Jin W, Liao N, Yu L. Selenium accumulation in mycelia of *Flammulina velutipes* during fermentation determined by RP-HPLC. Naturforsch C: J Biosci 2009;64:382-386.
- McLachlan SK, Thomson CD, Ferguson EL, McKenzie JE. Dietary and biochemical selenium status of urban 6- to 24-month-old south island New Zealand children and their postpartum mothers. The J Nutr 2004;134:3290-3295.

- Malinowska E, Krzyczkowski W, Herolda F, Łapienis G, Lusarczyk JS', Suchocki P, Kuras' M, Turło J. Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. *Enzyme Microb Technol* 2009;44:334-343.
- Mykkahen HM, Wasserman RH. Uptake of <sup>75</sup>Se-Selenite by brush border membrane vesicles from chick duodenum stimulated by vitamin D. *The J Nutr* 1989;119: 242-247.
- Neefs JM, Van De Peer Y, Hendriks L, De Wachter R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1990;18:2237-2317.
- Phipps RH, Grandison AS, Jones AK, Juniper DT, Ramos-Morales E, Bertin G. Selenium supplementation of lactating dairy cows: effects on milk production and total selenium content and speciation in blood, milk and cheese. *Animal* 2008;2:1610-1618.
- Piršljin J, Milinković-Tur S, Ljubić BB, Zdelar-Tuk M. The effect of organic selenium supplementation on antioxidative characteristics and lipid peroxidation in chicken blood during fattening and after fasting. *Veterinarski Arhiv* 2008;78:187-196.
- Ponce de Leon CA, Bayon MM, Paquin C, Caruso JA. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: A study of different incorporation methods. *J Appl Microbiol* 2002;92:602-610.
- Shah NP. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 2000;83:894-907.
- Shah NP. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J* 2007;17:1262-1277.
- Siddique T, Okeke BC, Zhang Y, Arshad M, Han SK, Frankenberger Jr WT. Bacterial diversity in selenium reduction of agricultural drainage water amended with rice straw. *J Environ Qual* 2005;34:217-226.
- Simon O. Micro-Organisms as Feed Additives - Probiotics. *Adv Pork Prod* 2005;16:161-167.
- Suhajda A, Hegoczki J, Janzso B, Pais I, Vereczkey G. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *J Trace Elem Med Biol* 2000;14:43-47.

- Suzuki KT, Somekawa L, Suzuki N. Distribution and reuse of 76 Seselenaõúcar in selenium-deficient rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;216:303-308.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24:1596-1599.
- Toma MAM and Pokrotnieks J. Probiotics as functional food: microbiological and medical aspects. *Acta Univ Latviensis* 2006;710:117-129.
- Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, Lopez RL, Veljovic K, Canamero MM, Topisirovic MKL, Galvez A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* 2009;20:381-385.
- Yu LL, Wang RL, Zhang YZ, Kleemann DO, Zhu XP, Jia ZH. Effects of selenium supplementation on polyunsaturated fatty acid concentrations and antioxidant status in plasma and liver of lambs fed linseed oil or sunflower oil diets. *Anim Feed Sci Technol* 2008;140:39-51.
- Zhang B, Zhou K, Zhang J, Chen Q, Liu G, Shang N, Qin W, Li P, Lin F. Accumulation and species distribution of selenium in Se-enriched bacterial cells of the *Bifidobacterium animalis* 01. *Food Chem* 2009;115:727-734.
- Zhang YQ, Okeke BC, Frankenberger Jr. WT. Bacterial reduction of selenate to elemental selenium utilizing molasses as a carbon source. *Bioresour Technol* 2008;99:1267-1273.
- Zhang YQ, Moore JN, Frankenberger Jr. WT. Speciation of soluble selenium in agricultural drainage waters and aqueous soil sediment extracts using hydride generation atomic absorption spectrometry. *Environ Sci Technol* 1999;33:1652-1656.
- Zhao L, Zhao G, Zhao Z, Chen P, Tong J, Hu X. Selenium distribution in a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. *J Agric Food Chem* 2004;52:3954-3959.

Table 1. Selenium accumulation in biomass by isolates LAB 14 (*E. faecalis*) and LAB 18 (*E. faecium*) growing in medium without selenium (control) and medium amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of sodium selenite (Se(IV)).

Isolates	Biomass		Se(IV) Accumulation	
	Control	Se(IV)	Control	Se(IV)
	----- OD <sub>600</sub> -----		----- mg g <sup>-1</sup> -----	
<b>LAB 14</b>	1.580 ± 3.09	1.118 ± 0.88	0.0040 ± 0.0018	0.4759 ± 0.0198
<b>LAB 18</b>	1.500 ± 3.28	0.997 ± 2.45	ND	0.4599 ± 0.0622

Values are means ± standard errors of triplicates.

ND: not detectable.

Table 2. Effect of Se(IV) concentration on biomass development and Se(IV) bioremoval following static incubation at 35°C for 24 h.

Se(IV) (mg L <sup>-1</sup> )	Biomass		Se(IV) Bio-removed	
	LAB 14	LAB 18	LAB 14	LAB 18
	----- OD <sub>600</sub> -----		----- (mg L <sup>-1</sup> )-----	
10	1.47±0.0033	1.36±0.0172	09.81±0.0217	09.91±0.0241
20	1.50±0.0093	1.55±0.0027	19.84±0.0120	19.89±0.0028
30	1.52±0.0046	1.58±0.0257	29.65±0.0731	29.91±0.0141
40	1.55±0.0009	1.69±0.0051	39.80±0.0202	39.96±0.0000
50	1.67±0.0043	1.80±0.0015	49.27±0.0814	49.63±0.0038
60	1.83±0.0049	1.84±0.0015	59.62±0.0290	59.70±0.0666

Values are means ± standard errors of triplicate independent experiments.

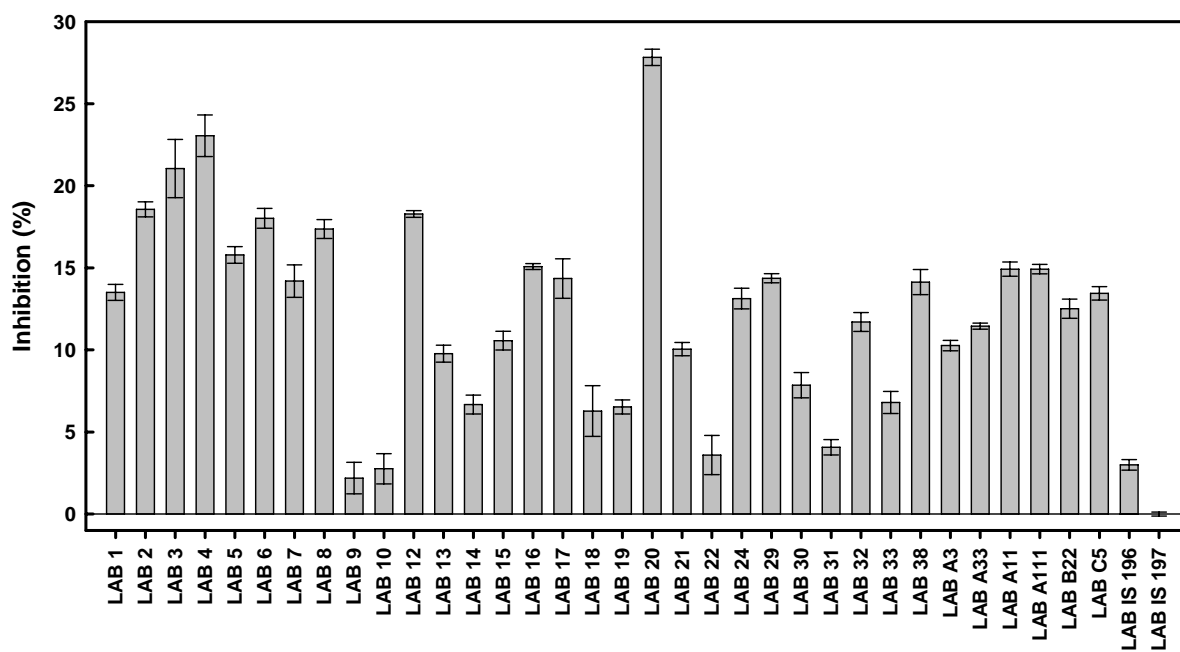


Figure 1. Se(IV) resistance profile of 36 bacterial isolates incubated in a medium amended with  $10 \text{ mg L}^{-1}$  of selenite at  $35^\circ\text{C}$  for 24 h. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments.

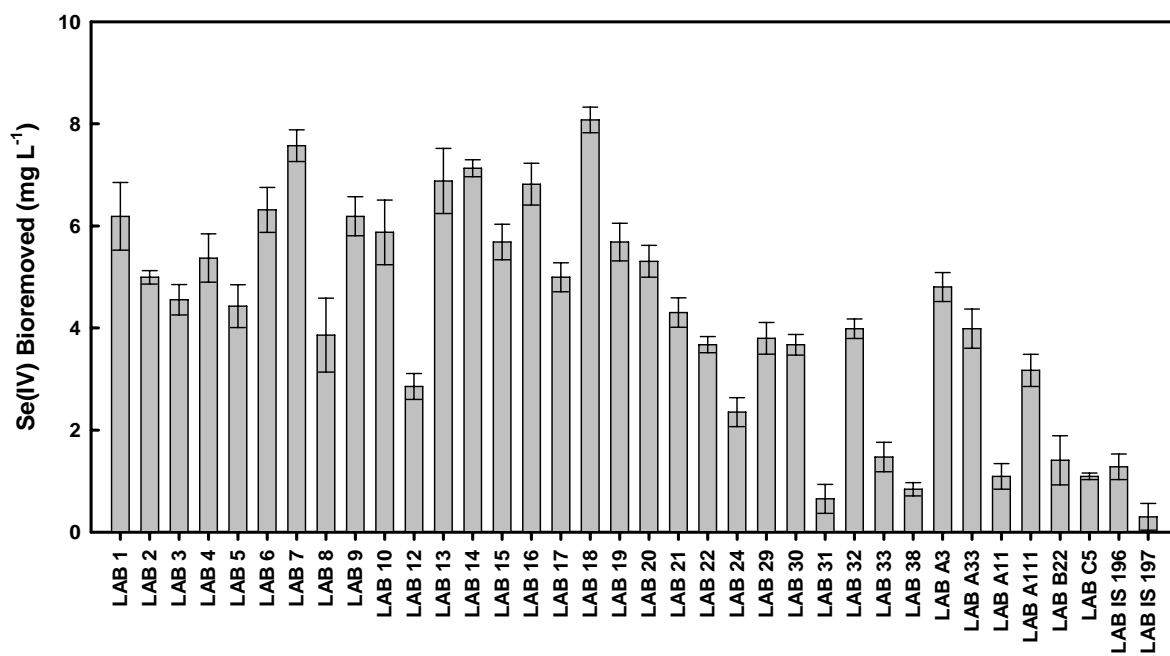


Figure 2. Se(IV) bioremoval LAB isolates after 24 h incubation in medium amended with 10 mg L<sup>-1</sup> of selenite at 35°C under static condition. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments.

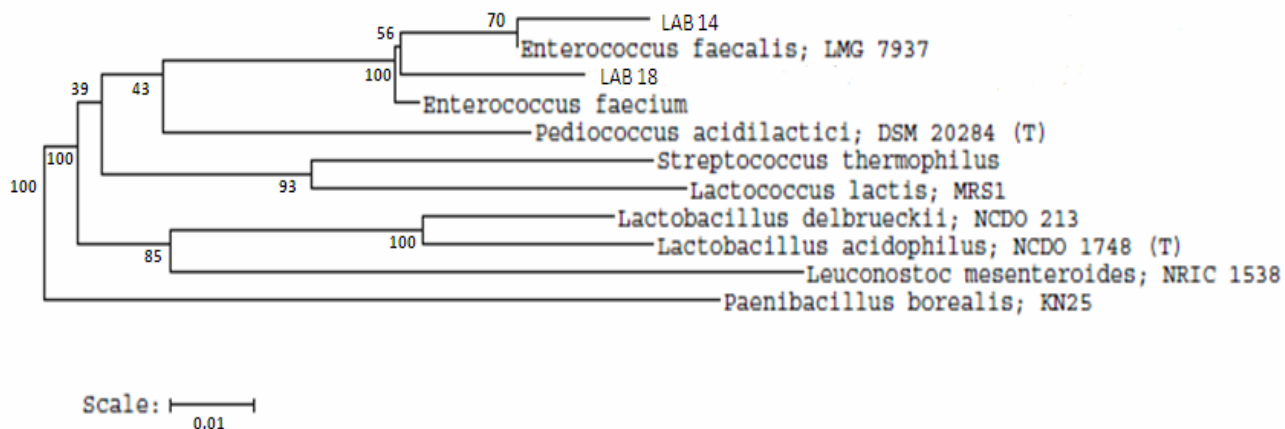


Figure 3. Phylogenetic tree showing the evolutionary position of isolates among other members of the family Lactobacillaceae with *Paenibacillus borealis* as the outgroup organism. The scale represents the evolutionary distance value. The number at each node is the bootstrap from 100 analyses.



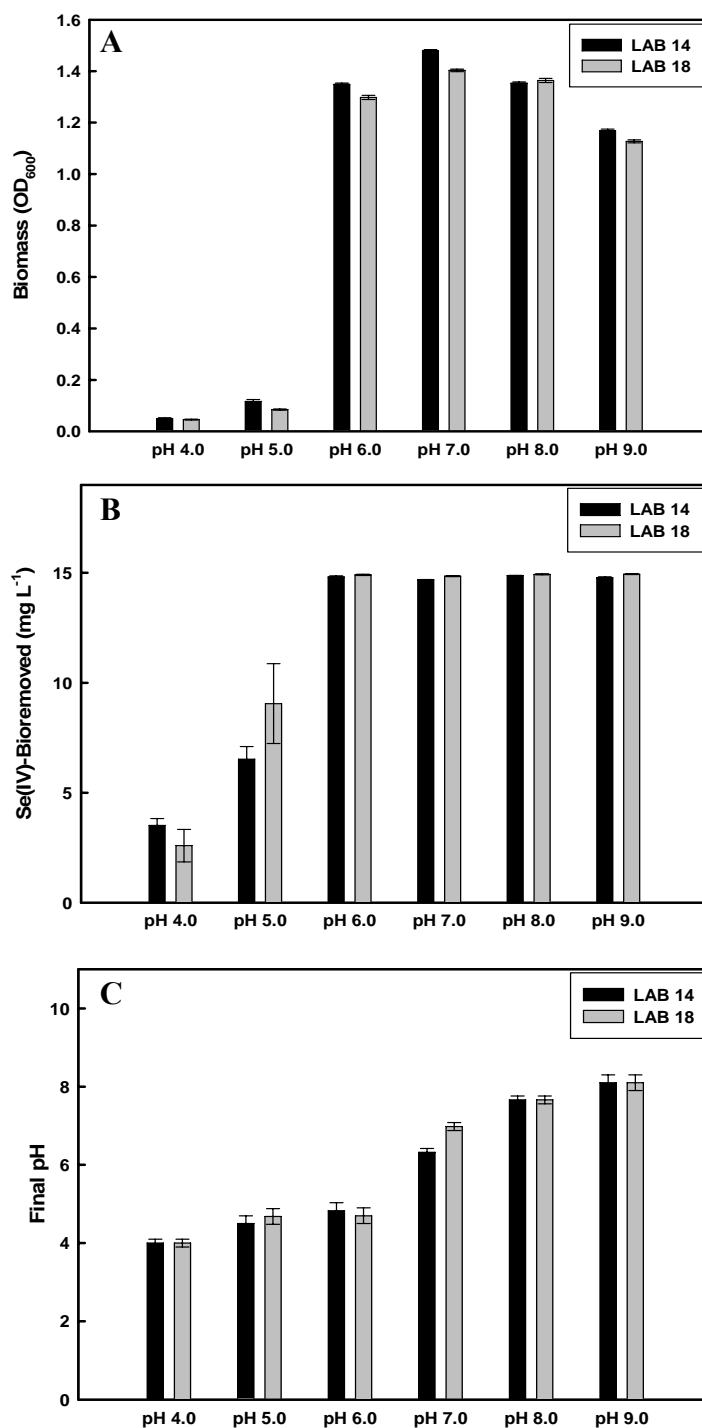


Figure 4. Effect of pH on biomass production (OD<sub>600</sub>) (A); Se(IV) bioremoval (B); and final pH (C) in TSB amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of selenite and incubated at 35°C for 24 h without shaking. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments.

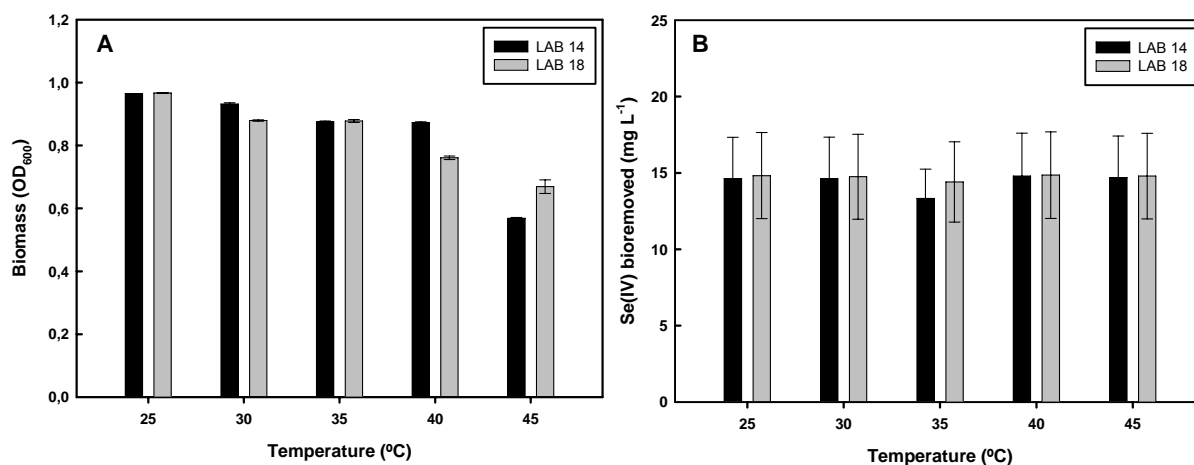


Figure 5. Effect of temperature on biomass production (OD<sub>600</sub>) (A); and Se(IV) bioremoval (B), after 24 h static incubation in TSB amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of selenite. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments.

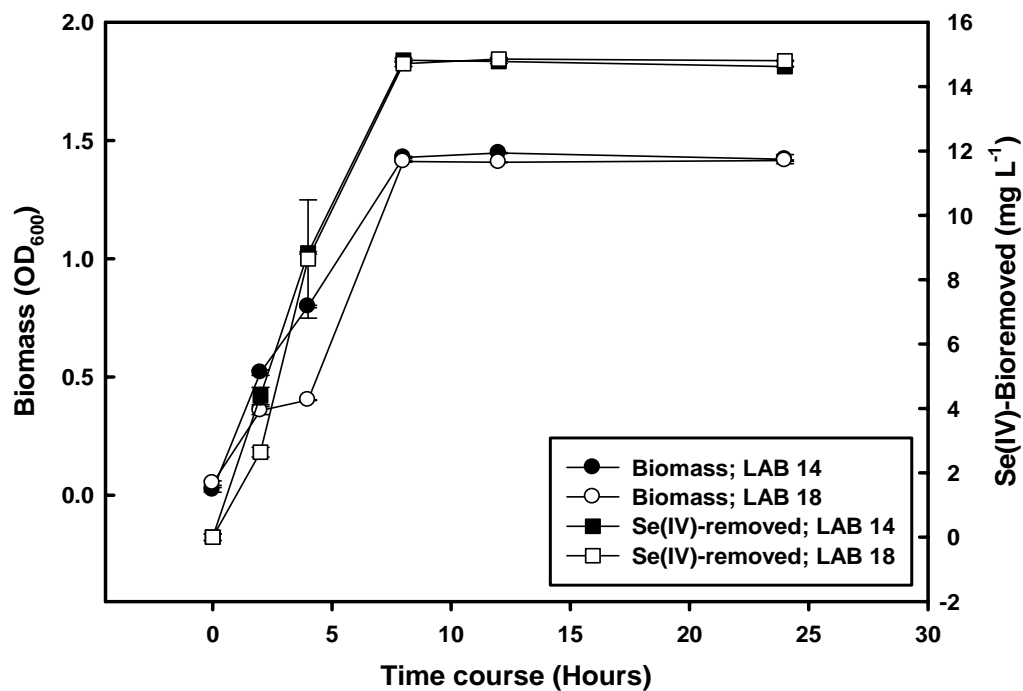


Figure 6. Time course of biomass production (OD<sub>600</sub>) and Se(IV) bioremoval in cultures during 24 h static incubation at 35°C in TSB amended with 15 mg L<sup>-1</sup> of selenite. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

Pesquisas com bactérias ácido lácticas (BAL) têm aumentado consideravelmente, pela sua importância em relação aos benefícios atribuídos a ingestão desses microrganismos na alimentação humana e animal (imunestimulação, exclusão de patógenos, produção de materiais bioativos, atividade anticarcinogênica, desconjugação dos ácidos biliares, dentre outros), bem como, pela importância econômica para a indústria de alimentos. Por este motivo, são necessários estudos mais abrangentes em relação às propriedades benéficas destes microrganismos. Este trabalho mostra que, além das espécies de *Enterococcus* possuírem propriedades probióticas, como citado na literatura, estes microrganismos mostraram capacidade em bioacumular o micronutriente selênio na biomassa bacteriana, atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante, podendo desta forma, contribuir para que o uso destas bactérias em alimentos, em rações animais e também na indústria, seja melhor aproveitado. Em complementação aos efeitos benéficos já comprovados, esses microrganismos ainda podem ser utilizados para conferir aroma, sabor e textura aos produtos alimentícios.

Os *Enterococcus*, identificados neste trabalho através do seqüenciamento do rRNA da região 16S, são aspirantes ao enriquecimento da biomassa (bioacumulação) com selênio. Todas as espécies de *Enterococcus* apresentaram alta produção de biomassa na presença de Se(IV), indicando que estes microrganismos podem ser utilizados, além de fonte protéica e potencial probiótico, como fonte de micronutrientes na dieta animal.

Neste trabalho observou-se que as espécies de *Enterococcus* em estudo demonstraram atividade antimicrobiana frente ao microrganismo indicador *L. monocytogenes*. Este fato é de suma importância, pois a Listeriose, doença provocada pelo microrganismo *L. monocytogenes*, pode ser evitada com a adição destas culturas em alimentos como leite e derivados lácteos, produtos cárneos e fermentados. Entretanto, o presente trabalho não avaliou a natureza das substâncias produzidas pelas culturas produtoras, porém as atividades inibitórias

verificadas justificam-se pela produção de substâncias inibidoras presentes nos extratos celulares que teriam impedido o crescimento da *L. monocytogenes*.

As espécies de *Enterococcus* estudadas apresentaram capacidade antioxidante *in vitro*, avaliada através da inibição da peroxidação lipídica induzida pela oxidação com sulfato ferroso, habilidade em seqüestrar os radicais livres pelo método do ABTS<sup>•+</sup> e ainda, capacidade de capturar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina). A atividade antioxidante observada no sobrenadante bruto (métodos de TBARS, ABTS<sup>•+</sup> e DPPH) e no extrato intracelular (método de TBARS), sugere que estas bactérias podem ser importantes como potenciais antioxidantes. O consumo de alimentos contendo BAL (produtos lácteos e cárneos, principalmente) pode contribuir para uma alimentação saudável, associada aos efeitos benéficos exercidos por estas bactérias como culturas probióticas, agregando ainda, os benefícios atribuídos ao consumo de fontes antioxidantes, como a inibição dos danos oxidativos provocados pela produção de radicais livres.

Conforme apresentado neste trabalho, resultados significativos foram encontrados através do estudo *in vitro*, em relação aos efeitos benéficos das bactérias do grupo de *Enterococcus* em termos de atividade antimicrobiana, antioxidante e capacidade em bioacumular Se(IV) na biomassa bacteriana. Além destes estudos já realizados, as mesmas 36 linhagens de BAL estão sendo utilizadas em estudos de determinação das atividades/capacidades antiinflamatória e anti-hipertensiva, e ainda, a presença intracelular da enzima superóxido dismutase (SOD), uma importante enzima envolvida na defesa antioxidante dos organismos vivos.