

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos produzidos por
Enterococcus spp. provenientes de amostras alimentares e ambientais.**

CAROLINA BALDISSEROTTO COMERLATO
Biomédica – UFCSPA

Março, 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos produzidos por
Enterococcus spp. provenientes de amostras alimentares e ambientais.**

CAROLINA BALDISSEROTTO COMERLATO
Biomédica – UFCSPA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do
Ambiente como um dos requisitos
para obtenção do Grau de Mestre
na Área de Microbiologia de
Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre (RS), março de 2015.

CIP - Catalogação na Publicação

Baldisserotto Comerlato, Carolina
Isolamento e caracterização de peptídeos
antimicrobianos produzidos por *Enterococcus* spp.
provenientes de amostras alimentares e ambientais. /
Carolina Baldisserotto Comerlato. -- 2015.
101 f.

Orientador: Ana Paula Guedes Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. *Enterococcus*. 2. Bacteriocinas. 3.
Munditicina. I. Guedes Frazzon, Ana Paula, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, pela força e coragem que me concede todos os dias.

Gostaria de agradecer todas as pessoas que fizeram parte da realização desse trabalho e que me incentivaram com palavras de carinho, bom ânimo e amor. Portanto, dedico e agradeço:

Aos meus pais, **Paulo** e **Lilhane**, pelo incentivo, carinho e dedicação que sempre tiveram comigo e por me ouvir meus desabafos. À minha irmã, **Ana Paula**, por sempre estar ao meu lado e por ser, acima de tudo, uma grande amiga.

À minha orientadora, **Ana Paula Frazzon**, pelo apoio, carinho, paciência e dedicação incansáveis. Muito obrigada por todos os ensinamentos e por estar sempre disponível e me fazer acreditar que pra todo problema existe uma solução.

À minha IC, **Júlia**, obrigada pela tua dedicação e interesse.

À **Prof. Amanda Motta**, por toda ajuda e conhecimento que me proporcionou.

Às gurias do laboratório 164, **Aline** e **Dani** pela amizade, café e risadas. À **Jaque** que me ajudou tanto no início do mestrado. Em especial a **Fefe**, que já está há muito tempo na minha vida, sempre me ajudando e sendo uma amiga mais que especial. Espero que possamos estar sempre juntas nas empreitadas que inventamos.

Às gurias do 209, especialmente a **Ju Coelho** e a **Gabi**, que se tornaram grandes amigas e que vou levar pra vida toda. Às gurias do 165, em especial à **Géssica**, que sempre foi tão amável e da qual compartilhamos tantas dúvidas, frustrações e alegrias. Adoro todas vocês!

Às minhas queridas e sempre amigas, **Evelise**, **Lahna**, **Vanessa** e **Marlise**, a amizade de vocês fez meus dias melhores, com certeza. Vocês são meu biotônico.

Ao Laboratório de Virologia, por sempre estarem de portas abertas, já que eu sempre estava lá para pedir alguma coisa. Ao **Prof. Pedro d'Azevedo**, pela concessão das dependências e de materiais da UFCSPA.

À empresa Cooperbúfalo, por ceder as amostras de leite cru bubalino utilizadas nesse trabalho.

Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos produzidos por *Enterococcus* spp. provenientes de amostras alimentares e ambientais.

Autor: Carolina Baldisserotto Comerlato¹

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

As enterocinas são compostos de natureza proteica que apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos. Sendo assim, 53 isolados de *Enterococcus* spp. de leite cru de búfala e fezes de lobos-marinhos foram triados através da técnica de dupla camada e 26 apresentaram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*. A presença dos genes *entA*, *entB*, *entP* e *munKS* foi avaliada por PCR e 10 isolados apresentaram o *entB*, um *munKS* e nenhum *entA* e *entP*. De 26 isolados foi produzido o sobrenadante livre de células para a avaliação da atividade e destes, somente *E. mundtii* (que apresentou o gene *munKS*) apresentou atividade contra *L. monocytogenes*. Este isolado foi suscetível aos antimicrobianos testados e foi negativo para os genes de virulência *cyIA*, *ace* e *asa* e positivo para *gelE*. O sobrenadante livre de células de *E. mundtii* apresentou resistência a maioria dos solventes orgânicos testados, estabilidade ao aquecimento (121 °C por 15 min), a uma ampla faixa de pH e à estocagem por 30 dias a -20 °C, além do aumento da atividade com Tween 80. A sensibilidade a proteases confirmou a natureza proteica desse peptídeo. Foi realizada a curva de produção da mundticina, que começou na fase logarítmica e obteve sua atividade máxima na fase estacionária. Não foi observada a presença de plasmídeo sendo, portanto, considerado que o gene que expressa este peptídeo esteja presente no cromossomo. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a mundticina possui potencial de aplicabilidade em novos estudos relacionados com bioconservantes.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101 p.) Março, 2015.

Isolation and characterization of antimicrobial peptides produced by *Enterococcus* spp. from food and environmental samples.

Author: Carolina Baldisserotto Comerlato¹

Supervisor: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

Enterocins are proteic compounds that exhibit antimicrobial activity against spoilage and food borne pathogenic bacteria. Therefore, 53 *Enterococcus* spp. of raw milk from buffalo milk and feces of fur seals were screened by double-layer assay and 26 showed antimicrobial activity against *L. monocytogenes*. The presence of *entA*, *entB*, *entP* and *munkS* genes was assessed by PCR and 10 isolates showed the *entB*, one *munkS* and no *entA* and *entP*. From 26 isolates was produced cell-free supernatant for evaluating the activity; and only *E. mundtii* (who presented *munkS* gene) showed activity against *L. monocytogenes*. This isolate was susceptible to antimicrobials tested and was negative for virulence genes *cylA*, *ace*, *asa* and positive for *gelE*. Cell-free supernatant of *E. mundtii* showed resistance to most organic solvents tested, stability to heat (121 °C for 15 min), to a wide range of pH and to storage for 30 days at -20 °C, in addition, increase the activity with the addition of Tween 80. The sensibility to proteases confirmed the protein nature of this peptide. Mundtacin production curve was performed, which began production in log phase and obtained its maximum activity in the stationary phase. The presence of plasmid was not observed, therefore, was considered the gene that expresses this peptide is present in the chromosome. The results obtained in this study indicate that the mundtacin has potential applicability in new studies related biopreservatives.

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (101 p.) March, 2015.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS.....	XI
RELAÇÃO DE FIGURAS	XII
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1 Objetivo Geral.....	2
1.1.2 Objetivos Específicos	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Leite de Búfala.....	4
2.2 Lobo-marinho (<i>Arctocephalus australis</i>)	5
2.3 Gênero <i>Enterococcus</i> spp	6
2.4 Enterococos e a indústria de alimentos	8
2.5 Bacteriocinas	10
2.6 Biossíntese	14
2.7 Mecanismo de Ação	16
2.8 Resistência bacteriana às bacteriocinas.....	17
2.9 Aplicação das bacteriocinas	18
2.10 Enterocinas.....	21
2.11 Mundticina KS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Amostras.....	25
3.1.1 Leite de Búfala.....	25
3.1.2 Lobo-marinho	25
3.2 Isolamento de <i>Enterococcus</i> spp. do leite de búfala.....	26
3.3 Identificação fenotípica dos <i>Enterococcus</i> spp. do leite de búfala.....	27
3.4 Extração do DNA total	29
3.5 Confirmação do gênero <i>Enterococcus</i> spp. por PCR	30

3.6 Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. por PCR Multiplex.....	30
3.7 Triagem das cepas produtoras de substância antagonista	32
3.8 Amplificação dos genes das enterocinas	32
3.9 Obtenção do sobrenadante livre de células	33
3.10 Teste de atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células.....	34
3.11 Teste de suscetibilidade antimicrobiana	34
3.12 Fatores de virulência.....	35
3.13 Determinação do espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células	36
3.14 Quantificação da atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células.....	36
3.15 Avaliação da estabilidade da substância antimicrobiana	37
3.15.1 Estabilidade térmica	37
3.15.2 Manutenção da atividade antimicrobiana sob congelamento	38
3.15.3 Estabilidade frente à variação do pH.....	38
3.15.4 Suscetibilidade a Enzimas Proteolíticas	39
3.15.5 Suscetibilidade a Solventes Orgânicos.....	39
3.16 Análise da atividade com Tween 80	40
3.17 Curva de produção da enterocina.....	40
3.17.1 Preparação do pré-inóculo	41
3.17.2 Realização da curva de produção	41
3.18 Verificação da presença de plasmídeo	41
3.19 Análise Estatística.....	42
4. RESULTADOS	43
4.1 Isolamento e identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de amostras de leite cru de búfala.....	43
4.1.1 Isolamento de <i>Enterococcus</i> spp. a partir de amostras de leite cru de búfala.....	43
4.1.2 Confirmação do gênero pela detecção do gene <i>tuf</i>	43
4.1.3 Identificação das espécies por PCR Multiplex e provas bioquímicas	43
4.2 Triagem dos isolados produtores de substância antagonista	44

4.3 Amplificação dos genes das enterocinas	46
4.4 Teste de atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células	48
4.5 Determinação do espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células	49
4.6 Quantificação da atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células.....	50
4.7 Avaliação da estabilidade da substância antimicrobiana	50
4.7.1 Estabilidade térmica	50
4.7.2 Manutenção da atividade antimicrobiana sob congelamento	52
4.7.3 Estabilidade frente à variação do pH.....	52
4.7.4 Suscetibilidade a Enzimas Proteolíticas	53
4.7.5 Suscetibilidade a Solventes Orgânicos.....	54
4.8 Análise da atividade com Tween 80	55
4.9 Curva de produção de enterocinas.....	56
4.10 Verificação da presença de plasmídeo	57
5. DISCUSSÃO.....	58
5.1 <i>Enterococcus</i> spp. em amostras de leite cru de búfala e amostras fecais de lobos-marinhos	58
5.2 Peptídeos antimicrobianos em amostras de animais marinhos e leite cru de búfala.....	60
5.3 Triagem dos isolados produtores de substância antagonista	61
5.4 Amplificação dos genes das enterocinas.....	62
5.5 Teste de atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células	63
5.6 Determinação dos fatores de virulência.....	64
5.7 Determinação do espectro de atividade antimicrobiana e quantificação do sobrenadante livre de células	65
5.8 Avaliação da estabilidade da substância antimicrobiana	67
5.8.1 Estabilidade térmica e manutenção da atividade antimicrobiana sob congelamento	67
5.8.2 Estabilidade frente à variação do pH.....	68
5.8.3 Suscetibilidade a Enzimas Proteolíticas	69
5.8.4 Suscetibilidade a solventes orgânicos e análise da atividade com Tween 80.....	70

5.9 Curva de produção de enterocinas.....	71
5.10 Verificação da presença de plasmídeo	72
6. CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR gênero-específico (<i>tuf</i>) e espécie-específicos.....	32
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para <i>entA</i> (enterocina A), <i>entB</i> (enterocina B), <i>entP</i> (enterocina P) e <i>munKS</i> (mundticina KS).....	34
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para <i>gelE</i> (gelatinase), <i>cylA</i> (citolisina), <i>ace</i> (adesina de colágeno) e <i>asa</i> (substância de agregação).....	36
Tabela 4. Características fenotípicas de <i>Enterococcus</i> spp. isolados de amostras de leite cru de búfala.....	45
Tabela 5. Resultados da amplificação dos genes das enterocinas por PCR em todos isolados positivos no teste de dupla camada.....	48
Tabela 6. Distribuição do padrão de resistência antimicrobiana do isolado <i>E. mundtii</i> obtido de amostra fecal de lobos-marinhos (OTARIIDAE: Arctocephalus spp.).....	50
Tabela 7. Resultados do espectro de atividade do sobrenadante livre de célula proveniente do isolado de <i>E. mundtii</i> J5 contra microrganismos indicadores..	51

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1. Ensaio de dupla camada onde se observam os halos de inibição formados por 5 cepas de *Enterococcus faecalis* provenientes do leite cru de búfala (C17, C18, C19, C20 e C21) contra a bactéria indicadora *L. monocytogenes* ATCC 35153..... 46
- Figura 2. Ensaio de dupla camada, onde se observa um halo de inibição (25 mm) do isolado *Enterococcus mundtii* (J5) proveniente de fezes de lobo-marinho contra a bactéria indicadora *L. monocytogenes* ATCC 35153..... 46
- Figura 3. Fragmento de DNA referente ao gene da Munditicina KS do isolado de *E. mundtii* em gel de agarose 1,0 % com marcador molecular KAPA Universal Ladder (canaleta 1), controle negativo (canaleta 2), e isolado de *E. mundtii* (canaleta 3)..... 49
- Figura 4. Halos de inibição formados com o sobrenadante livre de células do *Enterococcus mundtii* J5 contra *L. monocytogenes* ATCC 35153 com os devidos tratamentos térmicos..... 52
- Figura 5. Resultado da análise de variância utilizando os halos de inibição (mm) obtidos no teste de manutenção da atividade antimicrobiana após tratamento térmico, com um índice de confiança de 95%. Cada ponto representa a média dos halos de inibição do sobrenadante testado em triplicata e (C) – controle sem tratamento..... 53
- Figura 6. Resultado da análise de variância utilizando os halos de inibição (mm) obtidos no teste de manutenção da atividade antimicrobiana após tratamento com diferentes pHs, com um índice de confiança de 95%. Cada ponto representa a média dos halos de inibição do sobrenadante testado em triplicata..... 54
- Figura 7. Halos de inibição do sobrenadante livre de células de *E. mundtii* J5 após o tratamento com as enzimas proteolíticas contra *L. monocytogenes* ATCC 35153. A) sobrenadante tratado com proteinase K; B) com tripsina; C) com papaína..... 55
- Figura 8. Resultados utilizando os halos de inibição (mm) obtidos no teste de manutenção da atividade antimicrobiana após tratamento com diferentes solventes orgânicos, com um índice de confiança de 95%. Cada ponto representa a média dos halos de inibição do sobrenadante testado em triplicata..... 56

Figura 9. Curva de produção da munditocina KS. Crescimento bacteriano (triângulos) e atividade antimicrobiana (quadrados) monitorados durante 48h em meio TSB a 35 °C..... 57

Figura 10. Verificação da presença de plasmídeo do isolado de *E. mundtii* em gel de agarose 1,0% com marcador molecular KAPA Universal Ladder (canaleta 1 e 7), controle negativo (canaleta 2), controle positivo com isolado de *E. coli* (canaleta 3), isolado de *E. mundtii* (canaleta 4), DNAC de *Enterococcus* spp.(canaleta 6)..... 58

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg: microgramas
µL: microlitros
µM: micromolar
Ace: Adesina de colágeno
ace: gene responsável pela codificação da proteína Ace
Agg: substância de agregação
AMP: ampicilina
ARA: arabinose
ARG: arginina
asa: gene associado à codificação da proteína Agg
ATCC: *American Type Culture Collection*
BEA: Bile Esculin Agar
BHI: Brain Heart Infusion
CIP: ciproflaxacina
CLO: cloranfenicol
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
cm: centímetro
CylA: enzima citolisina
cylA: gene da enzima citolisina
DAB: Dextrose Azida Broth
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
dNTP: Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERI: Eritromicina
EST: Estreptomicina
FDA: *Food and Drug Administration*
GeIE: enzima gelatinase
geIE: gene da enzima gelatinase
GEN: Gentamicina
h: hora
ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde
LAB: bactérias ácido-láticas
M: marcador
MAN: manitol
mg: miligramas
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MGP: metil- α -D-glicopiranosídeo
min: minuto
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
NaCl: Cloreto de Sódio
NaOH: Hidróxido de Sódio
ng: nanogramas

NIT: Nitrofurantoína
NOR: Norfloxacina
°C: graus Celsius
p.: página
pb: pares de base
PBS: Tampão fosfato
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico
PIR: Piruvato
PYR: L-pirrolidonil- β -naftilamida
PVDF: Fluoreto de polivinilideno
RAF: rafinose
RNA: Ácido Ribonucléico
rpm: rotações por minuto
rRNA: Ácido Ribonucléico Ribossomal
SAC: sacarose
SBL: sorbitol
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
SLC: sobrenadante livre de células
SOR: sorbose
TAE: Tampão Tris-Ácido Acético-EDTA
Taq: enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*
TE: Tampão Tris-EDTA
TET: Tetraciclina
TRIS: trisaminometano
TSA: Trypticase Soy Agar
TSB: Trypticase Soy Broth
U: Unidade
UA: unidades arbitrárias
UFC: Unidade Formadora de Colônia
UV: Luz Ultravioleta
VAN: Vancomicina
VRE: enterococos vancomicina resistentes

1. INTRODUÇÃO

Embora existam muitos estudos sobre bioconservação de alimentos, ainda é um desafio, tanto em países em desenvolvimento, quanto nos industrializados, a busca de novas técnicas ou substâncias que sejam eficientes na conservação de alimentos com baixa toxicidade e que mantenham as características de cor, textura, sabor e aroma. As bactérias ácido-láticas possuem a habilidade de produzir peptídeos antimicrobianos, sendo o gênero *Enterococcus* spp. um representante. As bacteriocinas apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos. Algumas espécies de *Enterococcus* spp. têm sido utilizadas como cultura *starter* e também em preparações probióticas. O interesse da indústria alimentícia sobre esses compostos aumentou nos últimos anos, pois esses podem ser usados como preservantes naturais vindo a substituir os químicos, aumentando o tempo de prateleira dos alimentos e tornando-os mais seguros.

Muitas bacteriocinas foram caracterizadas de diferentes espécies de *Enterococcus* spp., principalmente, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, porém, esses peptídeos também têm sido isolados de *E. mundtii*, *E.*

avium, *E. hirae*, e *E. durans*. Enterococos bacteriocinogênicos são amplamente encontrados em alimentos como o leite *in natura*, em fezes e no trato gastrointestinal de humanos e animais. As enterocinas que pertencem à classe II das bacteriocinas são chamadas de *pediocin-like* e apresentam atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, um importante patógeno de origem alimentar. Um exemplo dessa classe de bacteriocinas provém de *Enterococcus mundtii* e chama-se mundticina.

Antes da aplicação na área de alimentos, as bacteriocinas são testadas quanto ao seu espectro antimicrobiano, quanto às características bioquímicas e genéticas e quanto à eficácia em alimentos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O principal objetivo desse trabalho foi de isolar, identificar e caracterizar peptídeos antimicrobianos provenientes de *Enterococcus* spp. de fontes como leite cru de búfala e fezes de lobos marinhos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Isolar *Enterococcus* spp. de leite cru de búfala;
- Confirmar o gênero *Enterococcus* spp. por PCR gênero-específico e determinar as espécies de enterococos por PCR Multiplex e por testes bioquímicas;
- Identificar os isolados de *Enterococcus* spp. quanto à produção de peptídeos antimicrobianos através do ensaio de dupla camada e através do sobrenadante livre de células;

- Identificar as enterocinas através de PCR convencional;
- Caracterizar os padrões de suscetibilidade antimicrobiana através do teste de disco difusão segundo o CLSI;
- Caracterizar as enterocinas produzidas pelos isolados quanto ao seu espectro de atividade antimicrobiano, estabilidade térmica, sensibilidade à proteases, alterações de pH e quantificação da atividade antimicrobiana;
- Determinação da curva de produção da enterocina dos isolados produtores;
- Determinar a presença de plasmídeo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Leite de Búfala

No Brasil, o grande interesse pela criação de búfalos (*Bubalus bubalis*), verificado nos últimos anos, tem determinado maior produção e consequente utilização do leite dessa espécie na alimentação humana. Desde a década de 90, foi observado um aumento significativo na produção de leite de búfalas e seus derivados, determinando um crescimento efetivo em várias regiões. A produção de leite bubalino no Brasil é de aproximadamente 92,3 milhões de litros por ano, a indústria processa por volta de 45 milhões de quilos desse leite, gerando uma produção de 18,5 mil toneladas de produtos lácteos (Bernardes, 2007). No Rio Grande do Sul, o crescimento da demanda por produtos lácteos processados com leite de búfala tem aumentado cerca de 30% ao ano (Cooperbúfalo, 2012).

O leite de búfala apresenta características diferenciadas quanto ao seu sabor ligeiramente adocicado e quanto a sua cor mais branca quando comparada ao leite bovino, isso é devido à ausência quase total de beta-caroteno em sua gordura. Além disso, há uma elevada taxa de gordura e proteína, os quais são responsáveis pelas características físicas de estrutura, cor e sabor do leite e seus derivados (Amaral et al., 2005).

As características microbiológicas do leite de búfalas são, relativamente, pouco conhecidas, principalmente quando comparadas as do leite bovino. É importante ressaltar que o leite bubalino *in natura* apresenta também alta perecibilidade e está sujeito às mesmas fontes de contaminação microbiana, que podem existir na bovinocultura leiteira, desde a ordenha, transporte do leite até a indústria de processamento. Algumas peculiaridades do comportamento das búfalas podem contribuir para aumentar significativamente a concentração microbiana inicial do leite cru, como, a tendência natural em se banhar na água ou lama, quando a água não está disponível, diminuindo assim a qualidade e a validade do produto, limitando seu emprego na indústria (Cunha Neto, 2003). Em contrapartida, Mesquita et al. (2001) afirmam que o leite bubalino possui maior atividade antibacteriana do que o bovino, pelo fato de possuir mais lactoferrina, substância que mantém o ferro iônico fora do alcance das bactérias.

O leite de búfala tem sido utilizado na preparação de derivados em diferentes regiões do mundo, destacando-se queijos, iogurtes e outros leites fermentados. A produção de um dos principais derivados desse leite é a *mozzarella*, amplamente comercializada (Oliveira, 2006).

2.2 Lobo-marinho (*Arctocephalus australis*)

A zona costeira brasileira apresenta grande diversidade de mamíferos marinhos e o litoral do Rio Grande do Sul (RGS) é uma área de concentração sazonal destes animais. A espécie mais observada é o leão-marinho-sul-americano (*Otaria flavescens*), seguido das espécies de lobos-marinhos *Arctocephalus australis* e *Arctocephalus tropicalis*.

Os lobos-marinhos possuem um focinho mais pontiagudo, estreito e alongado, e orelhas mais finas e compridas quando comparado ao leão-marinho. Esses animais possuem o costume de parar na orla para descansar e, por isso, são os mais avistados pela população, havendo registros de três espécies no (RGS) (Rocha-Campos et al., 2011; CECLIMAR, 2014).

O ecossistema marinho funciona como uma via de transporte de poluentes microbiológicos (bactérias, vírus e protozoários), carreadores de características adquiridas em outros ambientes seletivos e com potencial de patogenicidade para seres humanos e outros animais (Stewart et al., 2014). Alguns agentes biológicos isolados a partir destes animais poderiam ser utilizados como indicadores de perturbação do ecossistema marinho (Pereira et al., 2008). Neste trabalho será abordada a espécie do gênero *Arctocephalus australis*.

2.3 Gênero *Enterococcus* spp.

O nome “entérococoque” foi utilizado inicialmente por Thiercelin na França, em 1899, em uma referência à origem intestinal de novos diplococos Gram-positivos (Thiercelin & Jouhaud, 1899; Thiercelin, 1899). Desde meados da década de 80, os enterococos sofreram modificações taxonômicas, em 1990 foram classificados como cocos Gram-positivos entéricos e posteriormente incluídos no gênero *Streptococcus* (Murray, 1990). Após o avanço da Biologia Molecular, foi sequenciado um grupo de nucleotídeos do rRNA 16S do gênero *Streptococcus* e assim foi subdividido em três grupos: *Streptococcus*, que corresponde a maioria das espécies conhecidas;

Enterococcus spp., para o grupo de estreptococos entéricos e *Lactococcus* spp., para os estreptococos lácticos (Devriese, 1993).

Através do sequenciamento quase completo do 16S rRNA, os enterococos foram incluídos na subdivisão dos clostrídios das bactérias Gram-positivas, juntamente com o gênero das Bactérias ácido lácticas (BAL) (Collins et al, 1989). A análise filogenética dos cocos Gram-positivos, baseada na comparação de 1400 bases do gene 16S rRNA, mostrou que o gênero *Enterococcus* spp. está mais próximos dos gêneros *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, e *Carnobacterium* do que do *Streptococcus* e *Lactococcus* (Facklam et al., 2002).

As principais características morfológicas e fisiológicas dos enterococos são a forma esférica ou ovóide, coradas positivamente pela coloração de Gram e arranjadas aos pares ou cadeias (Thiercelin, 1899). São bactérias não esporuladas, anaeróbios facultativos e quimiorganotrófos fermentativos obrigatórios. Geralmente possuem ótimo crescimento em 35°C e crescem na faixa de 10 a 45°C (Sherman, 1937). Esses microrganismos toleram 6,5% de NaCl, hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares (Facklam, 1973). São catalase negativos, embora algumas espécies produzam catalase; o ácido láctico é produzido como produto final da fermentação da glicose, sem produção de gás (Murray, 1990; Klein, 2003).

Algumas espécies são móveis, tais como *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus* (Graudal, 1957; Mundt, 1986), e algumas possuem pigmento amarelo como *E. sulfureus*, *E. casseliflavus* e *E. mundtii* (Graudal,

1957; Mundt, 1986; Martinez-Murcia & Collins, 1991). A maioria das espécies é capaz de hidrolisar L-Pirrolidonil- β -Naftilamida (PYR) e produzir leucina aminopeptidase (Svec et al., 2006; Rahkila et al., 2011).

O gênero *Enterococcus* spp. compreende bactérias que fazem parte da microbiota natural do trato gastrointestinal (TGI) de humanos e animais, sendo também encontrados em solo, água e alimentos. Por serem isolados de diversas fontes, sua sobrevivência está associada a sua excepcional adaptação e resistência a ambientes hostis (Reffuveille et al., 2011).

Esse gênero compreende mais de 40 espécies e possui importância médica, por estarem frequentemente relacionados com infecções hospitalares. São causa de endocardites, bacteremia, infecções do trato urinário, sistema nervoso central, intra-abdominal e infecções pélvicas. Algumas espécies são patógenos oportunistas sendo as mais frequentes *E. faecalis* e *E. faecium*. Alguns estudos mostram que animais tratados com antimicrobianos podem ser reservatórios de enterococos resistentes e contribuir para a disseminação de resistência antimicrobiana entre populações (Ali et al., 2014).

2.4 Enterococos e a indústria de alimentos

A complexidade para se obter alimentos e produzi-los de forma segura tem sido amplamente reconhecida. Vários países elaboraram e introduziram regulamentações para garantir a segurança do alimento em diferentes estágios na cadeia de produção (Valeeva et al., 2005). Assim, no Brasil, em 2005, entrou em vigor a Instrução Normativa 51 na qual, dentre

vários fatores a serem adotados para a obtenção de leite de boa qualidade, implementou-se a coleta do leite a granel e seu resfriamento a 4 °C em tanques de resfriamento por expansão, até que esse possa chegar às indústrias (Brasil, 2002). O principal objetivo dessas regulamentações é limitar o desenvolvimento da microbiota mesofílica em que se encontra a grande maioria dos microrganismos patogênicos e deterioradores, sendo essa microbiota usada por muitos pesquisadores para diagnosticar múltiplos problemas que possam existir nos rebanhos leiteiros (Jayarao et al., 2004). Entretanto, no leite, não são encontradas apenas bactérias mesofílicas. A microbiota predominante no leite cru geralmente inclui espécies de bactérias do ácido láctico, *Pseudomonas spp.*, bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae* e leveduras. Outros grupos microbianos presentes no leite cru incluem *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria spp.* e enterobactérias (Lafarge et al., 2004). Muitos desses micro-organismos que compõem a microbiota do leite são psicrotróficos, e sob baixas temperaturas impostas pelo armazenamento em tanque de expansão conseguem se multiplicar e produzir enzimas, proteases e lipases, capazes de deteriorar o leite sob refrigeração; assim, a vida de prateleira do leite cru resfriado não consegue exceder cinco dias.

Na indústria de alimentos, os enterococos são utilizados como inoculantes em silagens, culturas *starter*, na fabricação de queijos e salames. Essas culturas possuem um papel importante no desenvolvimento de características organolépticas, enquanto como probiótico, eles contribuem para o balanço microbial e para o tratamento de gastroenterites em humanos e animais (Yang et al., 2008).

As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são as mais prevalentes em alimentos de origem láctea (Gelsomino et al., 2001). Altos níveis de contaminação por *Enterococcus* spp. são indicativos da falta de higiene durante a fabricação e levam à deterioração das propriedades sensoriais de alguns alimentos. Alguns enterococos isolados de alimentos têm sido identificados como produtores de bacteriocinas (enterocinas) que inibem bactérias deteriorantes de alimentos e patogênicas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp. (Giraffa, 2003).

2.5 Bacteriocinas

Em 1925, foi descoberta a primeira bacteriocina por André Gratia, ficando conhecida como colicina V. Este pesquisador reparou que este composto antimicrobiano, produzido por uma cepa de *Escherichia coli* V (*verotoxin-producing strain*, ou seja, virulenta), impedia o crescimento de outras *E. coli* (Gillor et al., 2005; Nishie et al., 2012). Somente em 1951, foi proposto o uso de bacteriocinas como conservantes de alimentos. Durante alguns anos, as pesquisas de bacteriocinas tiveram foco nas bactérias Gram-negativas que são indesejáveis nos alimentos. Os primeiros trabalhos foram importantes para desenvolver métodos básicos atualmente utilizados para detecção e isolamentos de outras classes de bacteriocinas (Cotter et al., 2005).

As bacteriocinas se estabelecem como uma estratégia de defesa altamente específica e comum contra bactérias, eliminando potenciais oponentes e aumentando o número de nutrientes disponíveis no meio ambiente para o seu próprio crescimento. Existem diversos tipos estruturais e,

conseqüentemente, diferentes mecanismos de ação e diversas aplicações terapêuticas (Lee e Kim, 2011).

As bactérias lácticas são capazes de produzir uma série de substâncias antimicrobianas incluindo ácido láctico, peróxido de hidrogênio, diacetil e outros ácidos orgânicos. Além desses produtos finais, resultantes do metabolismo, alguns isolados são capazes de sintetizar compostos antimicrobianos de origem proteica, denominados bacteriocinas (Deegan et al., 2006; Galvez et al., 2008). De um modo simplificado, as bacteriocinas são pequenos peptídeos catiônicos, termoestáveis, ativos contra outras bactérias, sendo que a bactéria produtora possui um mecanismo de imunidade contra essa substância (Cotter et al., 2005). As bacteriocinas variam em relação ao espectro de atividade (restrito ou amplo espectro), modo de ação, massa molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (Galvez et al., 2008).

O estudo dessas substâncias antimicrobianas produzidas por BAL tem atraído grande interesse nos últimos anos pelo seu potencial como biopreservante na indústria de alimentos, para fins de eliminar bactérias patogênicas e deteriorantes. Compostos antimicrobianos produzidos por BAL podem conferir uma vantagem adaptativa. No entanto, a expressão de bacteriocinas produzidas por determinada cepa depende de vários fatores como: ambiente inadequado para a expressão da bacteriocina, perda da capacidade de produzir essa enzima, antagonismo pela microbiota, desenvolvimento de organismos resistentes às bacteriocinas e formação de complexos não ativos entre bacteriocinas e macromoléculas (Cui et al., 2012).

O biocontrole de alimentos, utilizando-se bacteriocinas, é organizado em: 1) O uso de BAL produtoras de bacteriocinas ou 2) a adição direta de preparações de bacteriocinas, sintéticas ou purificadas de um sobrenadante de cultura da cepa produtora. A produção *in situ* de bacteriocinas pode aumentar a competitividade da cepa produtora na matriz do alimento e contribuir para a prevenção da sua degradação. Entretanto, a microbiota endógena, a fórmula e a tecnologia podem influenciar o desempenho da cultura produtora (Hugas et al, 2003).

A nomenclatura das bacteriocinas é contraditória e ainda está em discussão. Algumas bacteriocinas recebem nomes conforme as suas espécies bacterianas produtoras, mas mesmo essa nomenclatura dá origem a contradições. Às vezes, os nomes dos gêneros são utilizados como raízes dos nomes, como é o caso dos enterococos cujas bacteriocinas denominam-se enterocinas (Tagg & Ray, 1995; Cotter et al.,2005).

Diversas classificações das bacteriocinas foram propostas sendo a mais recente proposta por Heng e colaboradores em 2007. Esses peptídeos formados pelas bactérias Gram-positivas são agrupados em quatro classes, de acordo com sua estrutura química e função biológica:

- Classe I (Lantibióticos): possuem o aminoácido lantionina (Lan) na sua estrutura e são subdivididos em três grupos:

Subclasse Ia: bacteriocinas com estrutura linear;

Subclasse Ib: bacteriocinas com estrutura globular;

Subclasse Ic: bacteriocinas formadas por mais de um componente.

- Classe II: peptídeos não modificados (não lantibióticos e não cíclicos), de peso molecular inferior a 10 kDa, também subdividido em três grupos:

Subclasse IIa: bacteriocinas ativas contra *Listeria monocytogenes*;

Subclasse IIb: bacteriocinas multicomponentes, precisam que dois ou mais peptídeos para serem ativadas;

Subclasse IIc: bacteriocinas variadas, de baixo peso molecular, e que não se enquadram em a e b.

- Classe III: bacteriocinas proteínas, peptídeos de peso molecular superior a 10 kDa, subdividido em dois grupos:

Subclasse IIIa: peptídeos que agem causando a lise celular;

Subclasse IIIb: bacteriocinas de alto peso molecular que inibem o desenvolvimento das células alvo por outros meios que não a lise celular.

- Classe IV: proteínas complexas que requerem associações com lipídeos e carboidratos para apresentarem atividade.

A classe dos lantibióticos tem recebido maior atenção nos últimos anos devido à nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, utilizada, comercialmente, como preservante de alimentos em muitos países. A nisina pertence a classe I, que inclui moléculas flexíveis e alongadas que tem carga positiva, atuando na despolarização da membrana (Molloy et al., 2014).

A classe II é formada por bacteriocinas pequenas (<10 kDa), não modificadas, exceto pela clivagem do peptídeo líder, estáveis ao calor e subdivididas em três subgrupos. A classe IIa é a mais estudada, pois é o maior subgrupo de bacteriocinas produzidas por BAL e a que possui o maior

potencial de aplicação. Esse subgrupo possui uma forte atividade anti-listeriana e por isso esse grupo possui um significativo potencial como biopreservante em muitos alimentos. Além da *Listeria spp.* outros gêneros microbianos estão se mostrando sensíveis a esse grupo de bacteriocinas, como os *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Brochothrix spp.* (Heng et al., 2007).

A produção de bacteriocinas depende diretamente do crescimento e da atividade fisiológica da bactéria produtora (Cui et al., 2012). A composição do meio de cultura, a suplementação com nutrientes especiais, a temperatura e o pH são fatores que influenciam na produção desse peptídeo. Altas taxas de crescimento celular não necessariamente aumentam os níveis de produção, conseqüentemente existe uma relação complexa entre as condições ambientais e os níveis de atividade da bacteriocina (Leroy & De Vuyst, 2002).

O gene estrutural codifica para a produção de um pré-peptídeo contendo uma sequência líder N-terminal, cuja função é de prevenir as bacteriocinas de se tornarem biologicamente ativas dentro da célula produtora e fornecer um sinal de identificação para o sistema transportador (Ishibashi et al., 2014).

2.6 Biossíntese das bacteriocinas

Quanto à biossíntese, quase todas bacteriocinas produzidas por BAL são sintetizadas no início da fase logarítmica de crescimento e manifestam cinética de metabólito primário. A síntese desses peptídeos está determinada pela estrutura genética de quatro genes, que codificam funções básicas

requeridas para a produção da atividade antimicrobiana extracelular. Esses genes podem estar localizados em cromossomo, plasmídeo ou transposons.

Embora as bacteriocinas, geralmente, estejam relacionadas com a presença de plasmídeos, algumas pertencentes a classe IIa foram localizadas sobre fragmentos cromossomais (Perry et al., 2009). Primeiramente, ocorre a síntese de um pré-peptídeo que é regulado por um operon. Os genes que constituem esse operon são: um gene estrutural que codifica a pré-enterocina, um gene da imunidade, localizado ao lado do gene estrutural, um gene que codifica um transportador ABC com a finalidade de externalizar o pré-peptídeo e um gene codificador de uma proteína acessória (Claverys & Håvarstein, 2007; Perry et al., 2009).

A ativação biológica dos pré-peptídeos da classe IIa das enterocinas ocorre pela clivagem e separação da extensão N-terminal ou sequência líder. A secreção da bacteriocina é mediada por um transportador ABC e uma proteína acessória.

O mecanismo de proteção do próprio microrganismo produtor de enterocina ocorre com proteínas de imunidade (Tomita et al., 1997). Quanto a sua produção, esses peptídeos são considerados metabólitos primários somente quando a sua síntese ocorre na fase exponencial de crescimento, tornando-o indispensável ao crescimento do microrganismo produtor. A produção após a fase exponencial fará com que essas substâncias sejam consideradas metabólitos secundários, não sendo vital para o crescimento do micro-organismo produtor, embora estejam envolvidos em processos de manutenção dessas substâncias (Maqueda et al., 2008).

2.7 Mecanismo de Ação

Devido à sua diversidade estrutural, as bacteriocinas, apresentam diferentes mecanismos de ação e, em muitas situações, apenas um tipo de bacteriocina dispõe de mais do que um tipo de mecanismo de ação, podendo atuar em diferentes funções celulares, como por exemplo, na transcrição, na tradução, na replicação e na membrana celular (Jeevaratnam et al., 2005; Lee & Kim, 2011).

O mecanismo de ação das bacteriocinas ocorre inicialmente na membrana citoplasmática. Esses peptídeos da classe IIa possuem uma natureza anfifílica e, portanto, podem formar hélices transmembrana que apresentam solubilidade em água e possuem a capacidade de se ligar à membrana, formando poros complexos (Gabrielsen et al., 2012). Outros estudos indicam que não seja necessário um receptor proteico a nível de membrana para que ocorra a formação de poros (Bierbaum et al., 2009).

As bacteriocinas que atuam criando poros na membrana da célula alvo causam efeito deletério, como a dissipação da força protomotora, a diminuição de ATP e a perda de nutrientes e metabólitos. Embora a formação de poros seja uma característica geral, o tamanho, a estabilidade e a condutividade desses poros diferem entre as bacteriocinas (Herranz, 2001). Para a formação do poro, a bacteriocina interage com a membrana plasmática da célula alvo utilizando-se de interações eletrostáticas entre as cargas positivas do peptídeo e os lipídeos aniônicos presentes em grande quantidade na membrana das bactérias Gram-positivas.

A nisina é a bacteriocina mais estudada produzida por *Lactococcus lactis* e seu mecanismo de ação ocorre através da interação desse peptídeo com o lipídeo II, inibindo a síntese do peptidoglicano e formando poros específicos na membrana citoplasmática. Assim, a permeabilidade da membrana aumenta resultando na morte celular. Uma mutação no lipídeo II das membranas das células pode levar a resistência dessas a determinadas bacteriocinas. Alguns estudos mostram que além da formação de canais iônicos, formação de poros transmembrana e rupturas da membrana citoplasmática, as bacteriocinas também podem possuir alvos intracelulares atuando nas moléculas de DNA, RNA, enzimas e outros locais específicos (Fimland et al., 2005).

2.8 Resistência bacteriana às bacteriocinas

Alguns fatores podem contribuir para aumentar a resistência das células às bacteriocinas. A composição e estrutura da parede e da membrana celular podem fazer com que a bacteriocina seja incapaz de atingir o alvo, além disso, certos componentes celulares (receptores) que são essenciais para a ligação do peptídeo, podem estar mutados. Outra possibilidade é a presença de proteases junto à célula alvo que podem reduzir a efetividade da bacteriocina em alguns casos (Eijsink et al., 2002).

Bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação das bacteriocinas, pois possuem uma barreira adicional em sua parede celular, a membrana externa. Essa membrana é impermeável a grande maioria das moléculas, porém a presença de poros permite a entrada de substâncias menores que 600 Da. As bacteriocinas produzidas por BAL possuem tamanho

médio de 3 KDa e não conseguem atravessar essa membrana (Chalón et al., 2011).

Já existem inúmeros relatos de resistências às bacteriocinas, sendo que alguns estudos revelam que o mecanismo de resistência das bactérias à nisina e às bacteriocinas de classe IIa está correlacionado com o aumento da rigidez da membrana, o que impede a inserção da bacteriocina, e pela neutralização da sua carga de superfície, o que aumenta a capacidade da bactéria repelir os peptídeos antimicrobianos catiônicos. Este mecanismo pode estar relacionado com mutações na molécula de DNA bacteriano.

Um exemplo é uma mutação no fator sigma B, ou SigB, um mediador envolvido na resposta da bactéria a condições ambientais adversas é responsável por tornar a *L. monocytogenes* (agente etiológico responsável por causar listeriose, uma infecção oportunista de origem alimentar, que afeta principalmente indivíduos imunodeprimidos e grávidas) tolerante à nisina A e lacticina 3147 (Begley et al., 2006).

Outro mecanismo de resistências as bacteriocinas de classe IIa, envolve o gene *man-PTS* (Manose fosfotransferase) da *L. monocytogenes* e do *L. lactis*. Devido a uma mutação por transversão (Ala356Gly), ocorre uma diminuição da expressão do gene *man-PTS*, conduzindo a uma diminuição do número de receptores na membrana celular bacteriana e a consequente resistência da bactéria a esta classe de bacteriocinas (Tessema et al., 2009; Kjos et al., 2011; Lohans & Vederas, 2012).

2.9 Aplicação das bacteriocinas

É indispensável salientar que as bacteriocinas, como a nisina e a pediocina PA-1, são amplamente utilizadas na indústria alimentar porque inibem o crescimento de determinadas bactérias que deterioram ou são veiculadas pelos alimentos, tais como o *C. botulinum*, o *E. faecalis*, a *L. monocytogenes*, o *S. aureus*, entre outras (Settanni & Corsetti, 2008).

Presentemente, os lantibióticos são considerados pela FDA, substâncias seguras, pois como são peptídeos, são facilmente metabolizados a aminoácidos pelas proteases presentes no trato gastrointestinal. É de realçar que as bacteriocinas produzidas pelas BAL, não alteram sabor ou odores nos alimentos e apresentam elevada estabilidade e podem possuir um espectro de ação altamente reduzido e extremamente específico para uma dada bactéria, o que é altamente vantajoso para a sua aplicação nos alimentos (De Vuyst & Leroy, 2007; Rajaram et al., 2010; Lee & Kim, 2011; Lohans & Vederas, 2012; Nishie et al., 2012).

Alguns lantibióticos como a nisina A e F, a mersacidina, a mutacina 1140, a lactacina 3147 e a pediocina AcH/PA-1 por serem extensivamente aplicados como bioconservantes na indústria alimentar, demonstraram ser ativos contra alguns MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) e enterococos resistentes à vancomicina (VRE) estabelecendo-se como uma possível estratégia terapêutica no combate às bactérias multirresistentes e infeções bacterianas (Collins et al., 2010; Lohans e Vederas, 2012; Nishie et al., 2012).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em concentrações apropriadas, exercem um efeito benéfico na saúde do

hospedeiro a nível profilático, ajudando a restabelecer, ou a manter a microbiota natural do hospedeiro (Gillor et al., 2008; Lohans & Vederas, 2012). No entanto, segundo Dabour et al. (2009), quando existe uma infecção bacteriana, as bacteriocinas purificadas apresentam atividade terapêutica superior, o que é comprovado pelo estudo realizado através da administração da pediocina PA-1 e do *Pediococcus acidilactici* UL5, uma bactéria produtora de pediocina PA-1, em ratos infetados com *L. monocytogenes*.

Ao longo dos anos, as bactérias probióticas foram demonstrando atividade antimicrobiana, pois inibem o crescimento de outras bactérias patogênicas, sendo por isso, utilizadas no tratamento de infecções das mucosas gastrointestinal e vaginal. As bactérias probióticas produtoras de bacteriocinas podem ser aplicadas no trato gastrointestinal, produzindo *in situ* diversos tipos de bacteriocinas, que contribuem para a manutenção de um balanço adequado entre a microbiota intestinal e o hospedeiro, evitando a proliferação de microorganismos patogênicos. Existem inúmeras bactérias que são empregadas como probióticos, devido à produção de bacteriocinas, como por exemplo: o *Lactobacillus salivarius* UCC118, responsável por produzir a bacteriocina Abp118 que inibe o crescimento da *L. monocytogenes*; o *Lactobacillus casei* L26 que inibe o crescimento de estirpes de *E. coli* 0111 (enterohemorrágicas) e de *L. monocytogenes*; o *L. johnsonii* LA1 e o *L. acidophilus* LB que inibem o crescimento de *Helicobacter pylori*; e o *E. mundtii* ST4SA produtor da bacteriocina ST4SA, o qual é ativo contra bactérias Gram-positivas (*E. faecalis*, *S. pneumoniae* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*P.s aeruginosa* e *K. pneumoniae*) (De Vuyst & Leroy, 2007; Gillor et al., 2008; Granger et al., 2008).

2.10 Enterocinas

As bacteriocinas produzidas por espécies *Enterococcus* spp. são comumente chamadas de enterocinas. Essas são, geralmente, ativas contra outros enterococos e contra *Listeria* spp. A capacidade de inibir *Listeria* spp. é de grande interesse para a indústria de alimentos, no que diz respeito a produção de queijos e seus derivados, já que a *L. monocytogenes*, espécie patogênica, sobrevive em temperaturas de refrigeração e às condições ácidas impostas pela fabricação do queijo (Scallan et al., 2011). Essa atividade anti-listeriana pode ser explicada pelo fato de os enterococos e as listérias serem filogeneticamente relacionados.

As enterocinas possuem estabilidade a altas temperaturas e a uma ampla faixa de pH, assim como são sensíveis a proteases e possuem um espectro de atividade antimicrobiana semelhante, inibindo os gêneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* e *Listeria*; poucas apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas.

Muitas enterocinas têm sido caracterizadas de várias espécies de enterococos de diversas fontes, como alimentos, lixo, fezes e trato gastrointestinal de humanos e animais (Nes et al., 2007). A maior parte das enterocinas caracterizadas é proveniente de *E. faecalis* e *E. faecium*, entretanto esses peptídeos também são isolado de *E. mundtii*, *E. avium*, *E. hiraе* e *E. durans*.

A bacteriocina hemolítica (citolisina), a circular AS-48, e a bacteriocina 21 são conhecidas por serem bacteriocinas de *E. faecalis*, e essas

têm sido geneticamente e bioquimicamente bem caracterizadas (Gilmore et al., 2002; Haas et al., 2002).

As enterocinas melhor caracterizadas de *E. faecium* são a P, a A e a B. A enterocina P, produzida por *E. faecium* P13, apresenta um amplo espectro antimicrobiano, inibindo o crescimento de diversas bactérias Gram-positivas presentes em alimentos, exceto Gram-negativas (Kang & Lee, 2005). Essa enterocina é produzida por muitos isolados de *E. faecium*: IJ-31, P13, GM-1, ATB 197a, JCM5804T, LHICA 51, LHICA 28-4, e LHICA 40-4, provenientes de diversas fontes, tais como embutidos cárneos, produtos lácteos e trato gastrointestinal de humanos e animais (Javed et al., 2010).

As enterocinas A e B também não possuem atividade contra Gram-negativas, entretanto por atuarem sinergicamente inibem um grande número de bactérias Gram-positivas deteriorantes de alimentos como *C. sporogenes*, *Propionibacterium spp.*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Casaus et al., 1997). A enterocina A foi isolada pela primeira vez de salame fermentado e é uma bacteriocina de classe II da família pediocina, tem peso molecular de 4829 Da e tem uma forte atividade contra o gênero *Listeria* (Aymerich et al., 1996). A enterocina B também pertence à família pediocina, possui peso molecular 5479 Da. Essas enterocinas também possuem atividade contra os gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* e *Enterococcus spp.* (Casaus et al., 1997).

Cinta et al. (1998), identificaram uma bacteriocina não modificada com 2 componentes em *E. faecium* L50 (enterocina L50A e L50B). A cepa de *E. faecium* L50 quando incubada entre 16°C e 25°C produz as enterocinas

L50A e L50B, mas em temperaturas mais altas produz a enterocina P e uma nova enterocina chamada de Q.

Muitas enterocinas têm sido identificadas e purificadas, porém a falta de caracterização bioquímica e molecular inviabiliza a sua aplicação como biopreservante de alimentos. Os genes necessários para a produção da enterocina são transferidos para outras BAL usadas como cultura *starter* e que sejam reconhecidas como seguras (GRAS).

2.11 Mundticina KS

O *E. mundtii* foi descrito como um microrganismo imóvel, com presença de pigmento amarelo, isolado de plantas, alimentos, solo, animais e está raramente associado a infecções humanas (Collins et al., 1986; Muller et al., 2001). Assim como as outras espécies de *Enterococcus* spp., essa espécie é anaeróbia facultativa e a quantidade de CG em seu DNA é de 38 a 39% (Muller et al., 2001). A Mundticina KS é um peptídeo que pertence a classe IIa das bacteriocinas e é produzido pela espécie *E. mundtii*.

Três cepas, conhecidas atualmente, de *E. mundtii* produzem bacteriocinas da classe IIa: o *E. mundtii* ATO6 isolado de chicória, o *E. mundtii* NFRI 7393 de silagem de capim na Tailândia, e o *E. mundtii* CRL35 de queijo argentino, esses produzem respectivamente a mundticina ATO6 (Bennik et al., 1998), a mundticina KS (Kawamoto et al., 2002) e a enterocina CRL35 (Saavedra et al., 2004).

Três isolados de *E. mundtii* foram encontrados produzindo bacteriocinas da classe IIa. Muitos micro-organismos dessa espécie são produtores dessas substâncias, porém ainda não possuem a sua estrutura bem

caracterizada (De Vuyst et al., 2003). A mundticina ATO6 foi originalmente descrita como um peptídeo diferente em dois amino ácidos na região C-terminal: SK para mundticina ATO6, KS para mundticina KS, produzidas por *E. mundtii* ATO6 e *E. mundtii* KS, respectivamente. Todavia, Saavedra et al. (2004) corrigiram as sequências da mundticina ATO6 e mostraram que esse peptídeo é idêntico ao peptídeo mundticina KS em relação aos seus aminoácidos.

A maioria das enterocinas tem sido descobertas por isolados pertencentes às espécies *E. faecium* e *E. faecalis* e geralmente são aplicadas na manufatura de carnes e produtos lácteos (Franz et al. 2003). Entretanto, as bacteriocinas produzidas por *E. mundtii* parecem ser mais apropriadas para o uso na indústria de alimentos. Já é conhecido que a mundticina ATO6 possui um grande potencial como preservante de broto de feijão (Park et al., 2003).

As mundticinas são, geralmente, estáveis a uma ampla faixa de pH e resistem a uma faixa de temperatura muito grande, desde o congelamento até à temperatura de autoclave (121°C). Esses peptídeos são ativos principalmente contra *Listeria spp.*, mas também contra os gêneros *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (Foulquier e Moreno et al., 2003; Park et al., 2003).

O *E. mundtii* CRL 1656, isolado de leite bovino produz uma mundticina, que apresentou atividade antimicrobiana contra espécies de *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* e, principalmente, *L. monocytogenes*. A mundticina tem sido proposta, também, como um microrganismo probiótico para prevenir a mastite nesses mamíferos (Espeche et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.1 Amostras

3.1.1 Leite de Búfala

Foram recebidas quatro amostras de leite bubalino cru refrigerado que foram cedidas pela *Cooperativa Sulriograndense de Bubalinocultores Ind. Com. Ltda*, no período de maio a junho de 2013. Essas amostras foram transportadas até o laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, sendo mantidas na refrigeração até o momento das análises.

3.1.2 Lobo-marinho

Foram utilizados 13 isolados de *Enterococcus* spp., provenientes de fezes de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus australis*) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, pela equipe do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) – vinculado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Sete

espécies foram utilizadas nos ensaios: 3 *E. faecalis*, 1 *E. faecium*, 2 *E. hirae*, 2 *E. Gallinarum*, 2 *E. asini*, 2 *E. casseliflavus* e 1 *E. mundtii*, sendo essa última considerada atípica pelos testes bioquímicos. Os isolados pertencem à coleção de bactérias do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo isolados e identificados em estudo prévio (Santestevan et al., 2014).

3.2 Isolamento de *Enterococcus* spp. do leite de búfala

As quatro amostras de leite de búfala foram processadas para o isolamento de *Enterococcus* spp.. Os ensaios foram realizados com a diluição das amostras de leite bubalino em meio seletivo Caldo Azida Dextrose (DAB - *Dextrose Azida Broth*, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Em tubos contendo 9 mL de DAB foi noculado 1 mL de leite, estes tubos foram incubados na estufa por 24 h, a 35 ± 2 °C. Após o período de incubação, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-5} , sendo cada uma das 5 diluições plaqueadas em triplicata em ágar Infusão Cérebro Coração (BHI- *Brain Heart Infusion*, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) acrescido de 6,5% de NaCl (Merk Indústrias Químicas S.A., RJ, Brasil). As placas foram incubadas por 24 h, a 35 ± 2 °C. Após o período de incubação, cerca de 25 colônias, foram selecionadas aleatoriamente, das 4 amostras de leite, e foram semeadas em Ágar Bile Esculina (BEA- *Bile Esculin Agar*, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Os isolados que apresentavam capacidade de hidrolisar esculina na presença de sais biliares foram semeados em ágar BHI. Posteriormente, verificou-se a produção da enzima catalase utilizando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% (v/v) e a capacidade desses micro-organismos de multiplicar-se a 45 °C, durante 24 h de cultivo.

Os isolados que apresentaram resultado negativo para produção da enzima catalase e que apresentaram crescimento a 45 °C foram mantidos em ágar BHI, e submetidos à identificação microscópica preliminar através da verificação das características morfo-tintoriais em esfregaços corados pelo método de Gram, para evitar possíveis contaminações futuras. Em seguida, cada isolado foi mantido sob a forma de suspensão em solução contendo 1 mL de caldo BHI e glicerol (LabSynth®) a 50% (v/v), e armazenados em criotubos a - 20 °C.

3.3 Identificação fenotípica dos *Enterococcus* spp. do leite de búfala

Posteriormente, foi realizada a caracterização fenotípica das espécies. Os isolados foram caracterizados presuntivamente em nível de espécie por testes fisiológicos convencionais seguindo as recomendações propostas no *Manual of Clinical Microbiology* (Teixeira et al., 2011). Esses ensaios incluíram testes para verificar a capacidade dos isolados de utilizar piruvato, hidrolisar arginina e produzir ácidos a partir de diversas fontes de carboidratos (L-arabinose (Sigma-Aldrich®), manitol (Nuclear®), metil- α -D-glicopiranosídeo (MGP) (Sigma-Aldrich®), D-rafinose (Vetec®), sacarose (Vetec®), D-sorbitol (Difco® Laboratories) e D-sorbose (Sigma-Aldrich®)). Os ensaios foram realizados com cultivos recentes dos isolados em ágar BHI, obtidos após incubação a 35 \pm 2 °C, por 24 h, com os quais foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL). Cem microlitros de cada suspensão foram inoculados nos tubos

contendo os meios testados, e os tubos foram incubados a 35 ± 2 °C por sete dias. Cada tubo continha o meio teste composto por água peptonada, 0,1% de solução alcoólica do indicador de pH púrpura de bromocresol (Mallinckrodt®) e 1% do carboidrato a ser testado. O pH das soluções foi aferido antes da inoculação dos micro-organismos, sendo mantido na faixa de 7,2 – 7,6. Diariamente, realizaram-se as leituras e interpretações, observando-se a alteração da cor dos meios testados. Cepas padrão de *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* SS1274 foram utilizadas como controle para os testes. Foi considerado positivo o tubo em que se observou a presença de crescimento e a alteração da coloração do meio de púrpura para amarela.

No teste da hidrólise da arginina o meio *Decarboxylase Base Moeller* (peptona de carne 0,5%, extrato de levedura 3% e glicose 1%) foi utilizado e acrescido de 1% de L-arginina (Sigma-Aldrich®) e indicador de pH púrpura de bromocresol (Mallinckrodt®). O pH das soluções foi aferido antes da inoculação dos micro-organismos, sendo mantido na faixa de 7,2 – 7,6. Após a adição de 100 µL de suspensão bacteriana ajustada à escala padrão 0,5 de McFarland, foi gotejada uma camada de aproximadamente 10 mm de óleo mineral estéril (Proquímios®) e os tubos foram incubados a 35 ± 2 °C, sendo realizada leitura após 24 h e até sete dias após a incubação. Neste caso, os tubos controles não são acrescidos do açúcar e se tornam amarelos com resultado negativo, já o resultado positivo é verificado pela manutenção da coloração púrpura, devido à alcalinização do meio, em decorrência da hidrólise do substrato.

A utilização do piruvato de sódio (Nuclear®) a 1% foi verificada em meio contendo 1% de tripton (BD®), 0,5% de extrato de levedura (Himedia®),

India), 0,5% de K₂HPO₄ (LabSynth®), 0,5% de NaCl (Dinâmica® Química Contemporânea Ltda.) e 0,01% do indicador de pH azul de bromotimol. O pH da solução foi aferido antes da inoculação dos micro-organismos, sendo mantido a 6,8. Após a inoculação de 100 µL da solução bacteriana, incubou-se a 35 ± 2 °C e as leituras foram realizadas conforme mencionado. O teste foi considerado positivo para a utilização deste açúcar quando os meios mudaram a coloração para amarela.

3.4 Extração do DNA total

A extração do DNA total foi realizada por método físico-químico segundo Donato, (2007). Uma colônia isolada em ágar BHI (Himedia®, India) foi reinoculada em 5 mL de caldo BHI a 37 °C por 24 h. Após, 1 mL da cultura foi transferida para um microtubo, o qual foi centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min. Após centrifugar, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 40 µL da solução de lise composta por 5% de NaOH 1M, 2,5% de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) e 92,5% de TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8). O *pellet* ressuspenso na solução de lise permaneceu à temperatura de 100 °C durante 15 minutos e, posteriormente, foi diluído em 460 µL de tampão TE 1X, homogeneizado vigorosamente e centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min. Após essa centrifugação, o sobrenadante formado contendo o DNA foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20 °C. O *pellet* foi descartado. A confirmação da extração foi realizada por corrida eletroforética com gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo e analisado em luz ultravioleta.

3.5 Confirmação do gênero *Enterococcus* spp. por PCR

A confirmação do gênero bacteriano foi realizada por caracterização molecular utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *tuf* (Tabela 1).

As reações da PCR foram realizadas segundo Ke et al. (1999), com adaptações, em um volume total de 25 µL, contendo: 1x de tampão de PCR (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os produtos foram amplificados em termociclador Amplitherm Thermal Cyclers nas seguintes condições: 3 min a 95 °C; seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C e 1 min a 72 °C; e 7 min a 72 °C. As cepas *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* SS1274 foram utilizadas como controles positivos. O amplicon esperado com tamanho de 112 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e analisado em luz ultravioleta.

3.6 Identificação das espécies de *Enterococcus* spp. por PCR

Multiplex

Para a confirmação do resultado obtido na série bioquímica, os isolados foram submetidos a uma PCR do tipo Multiplex para identificar quatro espécies mais frequentemente encontradas de enterococos: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*. Os oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos utilizados para as reações estão descritos na Tabela 1.

As reações da PCR foram realizadas em 10 µL de volume total e continham: 1x de tampão de PCR (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1,25 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (IDT® – Integrated DNA Technologies), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 50 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®) (Nachtigall et al., 2013). Os produtos foram amplificados em termociclador Amplitherm Thermal Cyclers nas seguintes condições: 5 min a 94 °C; seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C e 1 min a 72 °C; e 5 min a 72 °C. Cepas ATCC e isolados de referência cedidos pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), foram adotados como controles positivos durante as reações: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* SS1274, *E. casseliflavus* PAD 71 e *E. gallinarum* ATCC RS-64. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo e visualizados em luz ultravioleta.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR gênero-específico (*tuf*) e espécie-específicos.

Oligonucleotídeos Iniciadores ¹	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referências
Tuf-F Tuf-R	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCAACCAACGCGAAC	112	Ke et al. (1999)
EFm_F EFm_R	TATGACAGCGACTCCGATTCC TTGAGGCAGACCAGATTGACG	658	Cheng et al. (1997)
ddl_F ddl_R	CACCTGAAGAAACAGGC ATGGCTACTTCAATTTACAG	475	Depardieu et al. (2004)
CA1 CA2	TCCTGAATTAGGTGAAAAAC GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	288	Jackson et al. (2004)
GA1 GA2	TTACTTGCTGATTTTGATTCCG TGAATTCTTCTTTGAAATCAG	173	Jackson et al. (2004)

¹*Enterococcus faecium* (EFm_F e EFm_R), *Enterococcus faecalis* (ddl_F e ddl_R), *Enterococcus casseliflavus* (CA1 e CA2) e *Enterococcus gallinarum* (GA1 e GA2).

3.7 Triagem das cepas produtoras de substância antagonista

A triagem para se verificar a produção de substância antagonista foi realizada em 40 isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de leite de búfala e em 13 isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de fezes de lobo-marinho. A técnica de dupla camada, segundo Tagg et al. (1971), foi utilizada para se verificar a atividade antimicrobiana desses isolados contra *Listeria monocytogenes* ATCC 35152, que foi escolhida por ser o gênero considerado mais sensível às enterocinas (Kawamoto et al., 2002). Os isolados de *Enterococcus* spp. foram semeados em picada em placas de TSA (Himedia®, India) e incubados em estufa a 35 ± 2 °C por 24 h. Após a incubação é vertida uma segunda camada de ágar TSA semi-sólido (0,7% de ágar) previamente inoculada com a bactéria indicadora (*L. monocytogenes*) na concentração de 10^6 células/mL (utilizando a escala de McFarland). A placa é novamente incubada a 35 ± 2 °C por 24 h e após é verificada a presença de halos de inibição.

Os isolados que não apresentaram atividade contra *L. monocytogenes* foram descartados dos testes de atividade com o sobrenadante livre de células.

3.8 Amplificação dos genes das enterocinas

A amplificação dos genes das enterocinas A, B, P e mundticina KS foram realizadas através de PCR convencional. O DNA total foi extraído conforme o item 3.4. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para *entA* (enterocina A), *entB* (enterocina B), *entP* (enterocina P) e *munKS* (mundticina KS).

Oligonucleotídeos Iniciadores	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referências
EntA_F EntA_R	GGTACCACTCATAGTGG CTGGAATTGCTCCACCTA	134	Park et al. (2003)
EntB_F EntB_R	GTAAGAAGAATTAAGTACG GTATACATTTGCTAACCC	192	Foulquié et al. (2003)
EntP_F EntP_R	ATGAGAAAAAATTATTTAGTTTAGCTTTATTGG TTAATGTCCCATACCTGCCAAACCAG	488	Gutierrez et al. (2005)
MunKS_F MunKS_R	TGAGAGAAGGTTTAAGTTTTGAAGAA TCCACTGAAATCCATGAATGA	380	Zendo et al. (2005)

3.9 Obtenção do sobrenadante livre de células

Os isolados que apresentaram halo de inibição no teste de dupla camada foram utilizados para a preparação do sobrenadante livre de células.

O pré-inóculo foi preparado em Erlenmeyer de vidro de 250 mL contendo 100 mL de TSB (Himedia®) e 1% do volume total (1 mL) de uma suspensão de *Enterococcus* spp. em solução salina 0,85% estéril ajustada na escala 0,5 de McFarland. Os erlenmeyers foram incubados a 35 ± 2 °C por 24 h sob agitação constante de 100 rpm.

Uma alíquota de 20 mL do pré-inóculo foi transferida a um tubo de 15 mL e esse foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C em centrífuga. Após a centrifugação, o pH do sobrenadante foi ajustado a 6.5 com NaOH 1M (Nuclear®) e esterilizado por filtração com membranas de 0,22 µm do tipo PVDF (Chromafil®). Os sobrenadantes foram armazenados a -20 °C para posteriores análises.

3.10 Teste de atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células

A fim de se verificar a atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células foi realizado o seguinte ensaio: em placas contendo TSA (Himedia®, India) de volume definido (20 mL) foi inoculada com suabe, em três direções distintas, uma cultura da bactéria indicadora (*Listeria monocytogenes* ATCC 35152) em uma suspensão salina estéril de 0,85% com aproximadamente 10^6 células/mL. Após aguardar as placas secarem à temperatura ambiente, foi depositado sobre o ágar inoculado com a bactéria indicadora 20 µL do sobrenadante livre de células e deixado secar em câmara de fluxo laminar. As placas foram incubadas em estufa a 35 ± 2 °C por 18 h. Os isolados que apresentaram atividade antimicrobiana foram considerados possíveis produtores de enterocinas e foram realizados os testes de caracterização dos peptídeos produzidos. Esse teste foi realizado em triplicata.

Os micro-organismos que apresentaram atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células (testados no item 3.9) foram utilizados para os testes posteriores.

3.11 Teste de suscetibilidade antimicrobiana

O teste de suscetibilidade foi realizado através do método de disco-difusão conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2013). Os isolados foram cultivados em ágar BHI (Himedia®) a 37 °C por 24 h. Os inóculos foram preparados com a suspensão das colônias em 5 mL de solução salina 0,85% estéril e ajustada para o padrão da escala 0,5 de McFarland. Cada suspensão contendo o inóculo foi semeada

em três direções em placa ágar Müller-Hinton (*Müller-Hinton Agar*, Acumedia®) com o auxílio de suabe. Após, os discos contendo os antimicrobianos foram depositados sobre a placa com o auxílio de pinça bacteriológica previamente esterilizada. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h e o diâmetro das zonas de inibição ao redor dos discos foi medido com o auxílio de um paquímetro e interpretado de acordo com as normas do CLSI (2013).

Os antimicrobianos testados foram (concentração expressa em $\mu\text{g.mL}^{-1}$): ampicilina (10), vancomicina (30), eritromicina (15), tetraciclina (30), ciprofloxacina (5), norfloxacina (10), nitrofurantoína (300), cloranfenicol (30), gentamicina (120) e estreptomina (300) (Sensifar®, Cefar Diagnóstica Ltda).

3.12 Fatores de virulência

A determinação dos fatores de virulência do isolado que apresentou atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células foi realizada em estudo anterior (Santestevan et al., 2014). Os fatores de virulência testados foram: gelatinase (*gelE*), citolisina (*cylA*), adesina de colágeno (*ace*) e substância de agregação (*asa*), através da PCR convencional. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para *gelE* (gelatinase), *cylA* (citolisina), *ace* (adesina de colágeno) e *asa* (substância de agregação).

Oligonucleotídeos Iniciadores	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referências
gelE_F gelE_R	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	402	Eaton & Gasson (2001)
cylA_TE17 cylA_TE18	TGGATGATAGTGATAGGA AGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517	Eaton & Gasson (2001)
ace1_F ace2_R	AAAGTAGAATTAGATCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	320	Mannu et al. (2003)
asa_F asa_R	GATACAAAGCCAATTCGTTCCCT TAAAGAGTCGCCACGTTTCACA	288	Jackson et al. (2004)

3.13 Determinação do espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células

Os micro-organismos indicadores escolhidos para a determinação do espectro de atividade antimicrobiana das enterocinas são prevalentes em amostras de alimentos e amostras clínicas: *Klebsiella* ATCC 300603, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Eschechia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 190506, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 e isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de leite bovino.

Para os testes foram preparadas suspenções das bactérias indicadoras em solução salina estéril 0,85% na concentração de 10^6 células/mL. As bactérias indicadoras foram crescidas em meio de cultura e temperaturas ideais por 24 h. Foi realizado o teste de atividade do sobrenadante livre de células conforme descrito no item 3.9 contra as bactérias indicadoras citadas. Após a incubação por 18 h foram medidos os halos de inibição em milímetros. Esse teste foi realizado em triplicata.

3.14 Quantificação da atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células

A quantificação da atividade antimicrobiana foi determinada através das Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/mL). Em placas de poliestireno de 96 poços foram realizadas diluições sucessivas do sobrenadante na proporção 1:1 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) em PBS. Após foi determinada a atividade utilizando a técnica descrita no item 3.9 com a bactéria indicadora *Listeria*

monocytogenes ATCC 35152 na concentração de 10^6 células/mL. As placas foram incubadas em estufa a 35 ± 2 °C por 18 h e feita a leitura dos halos de inibição. O cálculo das UA baseia-se na última diluição a apresentar halo de inibição. O resultado é calculado através da última diluição a apresentar atividade antimicrobiana, por exemplo, 10^{-4} , multiplicando-se a diluição 4 por 100 e obtendo-se 400 UA/mL.

3.15 Avaliação da estabilidade da substância antimicrobiana

O sobrenadante livre de células (obtido no item 3.8) foi testado quanto a sua estabilidade térmica, sua atividade frente a variações de pH, sua ação em contato com enzimas proteolíticas e frente a solventes orgânicos.

3.15.1 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi testada colocando-se o sobrenadante livre de células sob a ação de diferentes temperaturas em dado tempo. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram incubadas às temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C por 30 minutos em banho-maria e a 121 °C por 15 minutos em autoclave. Após, a atividade foi determinada conforme o estabelecido no item 3.9 com a bactéria indicadora *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 na concentração de 10^6 células/mL. Foi utilizado um controle do sobrenadante livre de células sem o tratamento térmico. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 18 h e os halos de inibição foram medidos em milímetros. O experimento foi realizado em triplicata com três sobrenadantes diferentes.

3.15.2 Manutenção da atividade antimicrobiana sob congelamento

A atividade do sobrenadante livre de células foi avaliada em 10, 20 e 30 dias de congelamento à -20 °C e a atividade antimicrobiana determinada através dos tamanhos dos halos de inibição formados frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 35152.

3.15.3 Estabilidade frente à variação do pH

O sobrenadante livre de células foi incubado em uma faixa de pH entre 1 e 12. Para a verificação da atividade do sobrenadante, não foi ajustado o pH desse, permanecendo entre 4.5 e 5.0 para a realização do teste. Em tubos estéreis foram adicionados 500 µL de sobrenadante livre de células e 500 µL de tampão e foram homogeneizados em vórtex e incubados em estufa a 35 ±2 °C por 30 minutos. Os tampões utilizados foram: tampão citrato de sódio para pH de 1 a 5; tampão fosfato para pH de 6 a 8 e tampão TRIS para pH de 9 a 12, todos na concentração final de 0,1M. Após o período de incubação foi realizado o teste de atividade antimicrobiana, descrito o item 3.9 com os sobrenadantes nos diferentes pHs com a bactéria indicadora *L. monocytogenes* ATCC 35152. Foram preparados controles dos tampões, em microtubos contendo apenas 500 µL do tampão, e o controle do sobrenadante, em microtubo contendo 500 µL de PBS e 500µL do sobrenadante livre de células. As placas foram incubadas a 35 ±2 °C por 18 h e após foi realizada a leitura dos halos de inibição em milímetros. Esse teste foi realizado em triplicata com três sobrenadantes livres de células diferentes.

3.15.4 Suscetibilidade a Enzimas Proteolíticas

A suscetibilidade do peptídeo a enzimas proteolíticas foi realizada com uma alíquota de 1 mL do sobrenadante livre de células e tratada com as enzimas: papaína (MERCK®), proteinase K (Macherey-Nagel) e tripsina (Sigma Chemical Company) nas concentrações finais de 2 mg/mL. Os pHs dos sobrenadantes foram ajustados conforme o pH ótimo para a ação de cada enzima (5.0 para papaína e 8.0 para proteinase K e tripsina). Foram preparados controles das enzimas com tampão PBS e controle do sobrenadante com e sem tratamento térmico. Os tubos foram incubados em estufa por 1 h na temperatura ideal para cada protease. Após a incubação os tubos foram submetidos ao aquecimento de 100 °C por 3 min, para a inativação das proteases, sendo um tubo controle sem tratamento térmico. As alíquotas, após chegarem a temperatura ambiente, foram submetidas ao teste de atividade antimicrobiana (item 3.9) tendo *L. monocytogenes* como indicadora. Esse teste foi realizado em triplicata, assim como a leitura dos halos de inibição após a incubação a 35 ±2 °C por 24 h.

3.15.5 Suscetibilidade a Solventes Orgânicos

A verificação da atividade da enterocina frente a diferentes solventes orgânicos foi realizada adicionando-se 50 µL de solvente orgânico em 100 µL de sobrenadante livre de células. Foram utilizados seis solventes orgânicos: butanol (Vetec®), etanol 95% (Vetec®), acetona (Dinâmica®), clorofórmio (Vetec®), metanol (Vetec®) e DMSO (Nuclear®). Esses microtubos foram homogeneizados em vórtex e incubados em estufa a 35 ±2 °C por 1 h. Após a incubação foi realizado o teste de atividade antimicrobiana descrito no item 3.9

com a bactéria indicadora *L. monocytogenes* ATCC 35152. Foram realizados controles dos solventes, contendo 100 µL de PBS e 50 µL do solvente orgânico, e controles do sobrenadante livre de células, contendo 100 µL do sobrenadante e 50 µL de PBS. Após, as placas foram incubadas a 35 ±2 °C por 18 h e realizada a leitura dos halos de inibição em milímetros. Esse teste foi realizado em triplicata com três sobrenadantes livres de células diferentes.

3.16 Análise da atividade com Tween 80

Para se analisar a atividade da enterocina com o detergente Tween 80 (Vetec®) foi adicionada uma alíquota de 180 µL de sobrenadante livre de células e 20 µL de Tween 80 em microtubos, sendo que também foi testado o detergente com tratamento térmico a 100 °C por 3 minutos. Os controles do Tween 80 com e sem tratamento térmico foram preparados contendo 180 µL de PBS e 20 µL de Tween 80. Os microtubos foram homogeneizados em vórtex e incubados a 35 ±2 °C por 1 h. Após foi realizado o teste de atividade antimicrobiana conforme o item 3.9 com a bactéria indicadora *L. monocytogenes* ATCC 35152. Após as placas foram incubadas a 35 ±2 °C por 18 h e realizada a leitura dos halos de inibição em milímetros. Esse teste foi realizado em triplicata com três sobrenadantes livres de células diferentes.

3.17 Curva de produção da enterocina

O isolado produtor de enterocina que apresentou uma melhor atividade antimicrobiana foi escolhido para a realização da curva de crescimento microbiano e produção de enterocinas.

3.17.1 Preparação do pré-inóculo

O isolado foi semeado em TSA (Himedia®, India) e incubado em estufa a 35 ± 2 °C por 24 h. Através desse crescimento foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% esterilizada na concentração de 10^7 células/mL.

3.17.2 Realização da curva de produção

Uma alíquota de 1% da solução salina foi inoculada em um erlenmeyer com 100 mL de TSB (Himedia®, India) acrescido de 1% de glicose (Vetec®), esse foi considerado o ponto zero da curva de produção. Assim, foi realizada a incubação em estufa a 35 ± 2 °C sob agitação constante de 100 rpm. Foram retiradas seis alíquotas durante 48 h de incubação. O crescimento microbiano foi verificado através da densidade óptica em espectrofotômetro a 620nm e a contagem em unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), através de diluições seriadas até 10^{-6} . A atividade antimicrobiana foi testada em cada ponto da curva através do teste de atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células descrito no item 3.9. Os halos de inibição formados foram medidos em milímetros.

3.18 Verificação da presença de plasmídeo

Para extração de DNA plasmidial foi utilizada a bactéria crescida em caldo BHI por um período de 12 a 24 h, colocada em microtubos com volume de 1,5 mL e centrifugadas em 14.000 rpm por 13 segundos. Após a centrifugação, o precipitado foi recuperado, desprezando-se o sobrenadante e o processo de centrifugação foi repetido mais duas vezes. Adicionou-se 100 µl da solução I (EDTA 10 Mm, TRIS-base 25 mM, glicose 50 mM) e essa foi

homogeneizada no vórtex. Após, 200 µl da solução II (NaOH 0,2 mM, SDS 1%) foi adicionada. O tubo foi invertido vigorosamente algumas vezes e foi adicionado 150 µl da solução III (60 % de acetato de potássio 5M, 11,5 % de ácido acético glacial, 28,5 % de água destilada). Centrifugou-se por 5 minutos em 14.000 rpm e a parte líquida foi recuperada em outro microtubo, desprezando o precipitado. Então, adicionou-se um volume de 1 mL de etanol 100%. Após outra centrifugação de 5 minutos o sobrenadante foi descartado e retirou-se todo resquício de etanol com ajuda de uma ponteira. O precipitado foi ressuspenso em 49 µl de tampão TE pH 8,0 (EDTA 1 Mm, TRIS-base 10 Mm) e 1 µl de RNase. Para observar a presença de plasmídeo utilizou-se eletroforese em gel de agarose 0,7%.

3.19 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com os dados obtidos em milímetros nos testes de manutenção da atividade antimicrobiana em diferentes pHs e diferentes temperaturas. Para os testes foram utilizados os dados em triplicata e realizou-se o teste ANOVA seguido de Tukey com nível de confiança de 95% através do software Statistica na versão 12.

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento e identificação das espécies de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras de leite cru de búfala.

4.1.1 Isolamento de *Enterococcus* spp. a partir de amostras de leite cru de búfala

Das 4 amostras de leite cru de búfala, foram isoladas 40 colônias aleatórias que apresentaram crescimento satisfatório em meio BHI contendo 6,5 % de NaCl, hidrolisando a esculina na presença de sais biliares e crescendo à 45 °C, além de apresentarem resultado negativo para o teste da catalase. Todos os isolados apresentaram morfologia de diplococos Gram-positivos através da coloração de Gram.

4.1.2 Confirmação do gênero pela detecção do gene *tuf*

Todos os 40 isolados avaliados foram positivos quanto à presença do gene *tuf*. O resultado positivo foi observado para todos os isolados testados através da visualização de um fragmento de DNA de 112 pares de base (pb).

4.1.3 Identificação das espécies por PCR Multiplex e provas bioquímicas

Dos 40 isolados submetidos ao PCR Multiplex utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para as espécies *E. faecium*,

E. faecalis, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, 32 (80%) apresentaram amplificação compatível com a espécie *E. faecalis*. Esses isolados amplificaram o fragmento de DNA de 475 pb esperado para a espécie *E. faecalis*.

Os oito isolados negativos para a PCR Multiplex foram submetidos aos testes bioquímicos convencionais, de acordo com Teixeira et al. (2011) (Tabela 4). Todos os isolados foram identificados como *E. faecalis*.

Tabela 4. Características fenotípicas de *Enterococcus* spp. isolados de amostras de leite cru de búfala.

		Características Fenotípicas¹								
Espécie	n*	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	SAC	PIR	MGP
<i>E. faecalis</i>	8	+	-	+	-	+	-	+	+	-

*número de isolados com o perfil bioquímico. ¹MAN, manitol; SOR, sorbose; ARG, arginina; ARA, arabinose; SBL, sorbitol; RAF, rafinose; SAC, sacarose; PIR, piruvato; MGP, metil- α -D-glicopiranosídeo.

4.2 Triagem dos isolados produtores de substância antagonista

O ensaio de identificação de isolados produtores de substâncias antagônicas foi realizado com os 40 *E. faecalis* provenientes do leite cru de búfala e mais 13 enterococos isolados de fezes de lobo-marinho. Destes, 21 enterococos isolados de leite cru de búfala e 5 de fezes de lobos-marinhos apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria indicadora *L. monocytogenes* ATCC 35153 (Figuras 1 e 2). Os isolados produtores apresentaram halo de inibição e continuaram no estudo para a realização dos ensaios seguintes, sendo os isolados não produtores descartados.

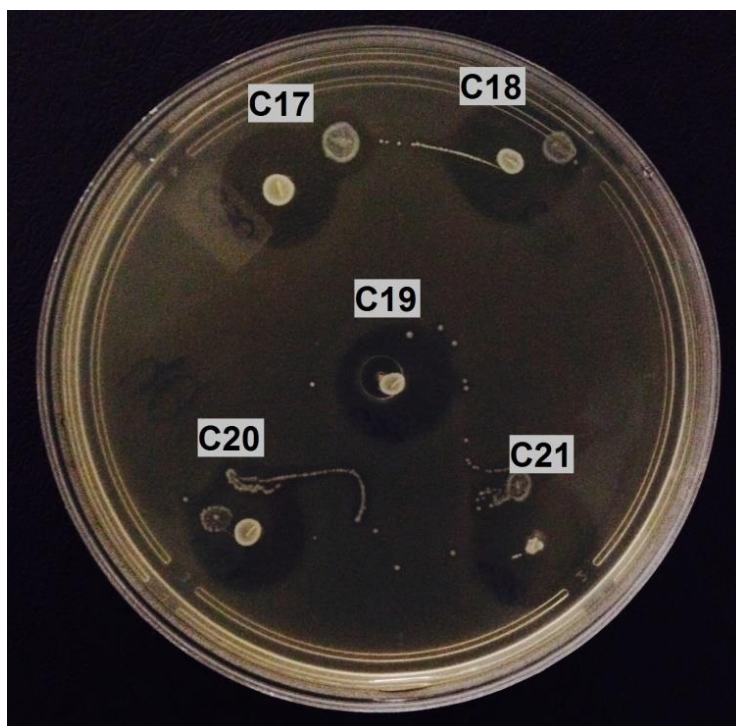


Figura1. Ensaio de dupla camada com halos de inibição formados *Enterococcus faecalis* provenientes do leite cru de búfala (C17, C18, C19, C20 e C21) contra *L. monocytogenes* ATCC 35153. Fonte: Arquivo Pessoal.

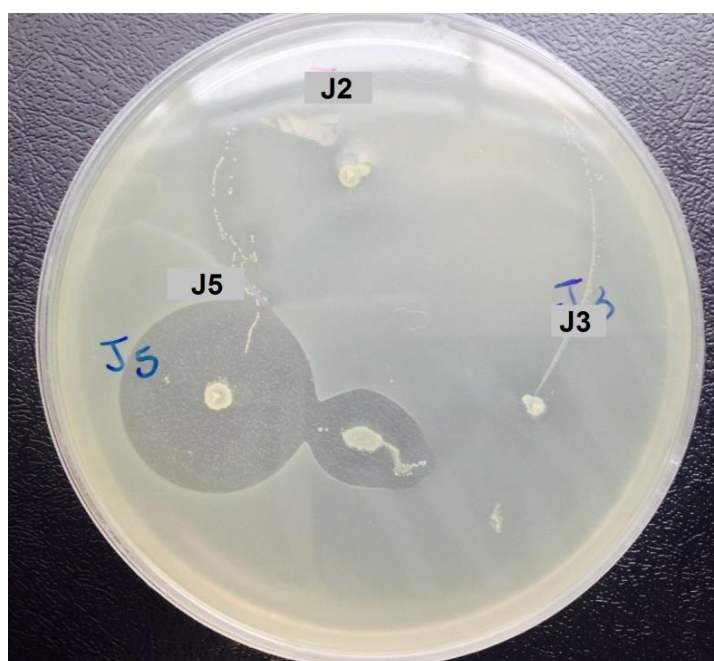


Figura 2. Ensaio de dupla camada com halo de inibição (25 mm) do isolado *Enterococcus mundtii* J5 proveniente de fezes de lobo-marinho *L. monocytogenes* ATCC 35153. Fonte: Arquivo Pessoal.

4.3 Amplificação dos genes das enterocinas

A amplificação dos genes das enterocinas foi realizada em todos os isolados que apresentaram atividade antimicrobiana no teste da dupla camada. Dos 26 isolados testados, 10 apresentaram o gene correspondente a enterocina B (192 pb), um da mundticina (308 pb) e nenhum para as enterocina A (134 pb) e P (488 pb).

Tabela 5. Resultados da amplificação dos genes das enterocinas por PCR em todos isolados positivos no teste de dupla camada.

Resultado da PCR para os genes das enterocinas						
Espécie	isolado	entA	entB	entP	munKS	
Leite cru de búfala						
<i>E. faecalis</i>	C17	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C18	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C19	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C20	-	+	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C21	-	+	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C22	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C23	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C24	-	+	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C25	-	+	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C26	-	+	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C27	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C28	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C29	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C30	-	+	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C31	-	+	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C32	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C33	-	+	-	-	
<i>E. faecalis</i>	C34	-	+	-	-	
<i>E. faecalis</i>	D35	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	D37	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i>	D38	-	-	-	-	
Fezes de lobo-marinho						
<i>E. gallinarum</i>	F1	-	-	-	-	
<i>E. hirae</i>	F2	-	+	-	-	
<i>E. gallinarum</i>	F3	-	-	-	-	
<i>E. hirae</i>	F5	-	-	-	-	
<i>E. mundtii</i>	J5	-	-	-	+	

+ resultado positivo para a PCR e – resultado negativo para a PCR.

O *E. mundtii* J5 isolado de fezes de lobo-marinho foi o único que mostrou-se positivo para o gene da mundticina KS (Figura 3).

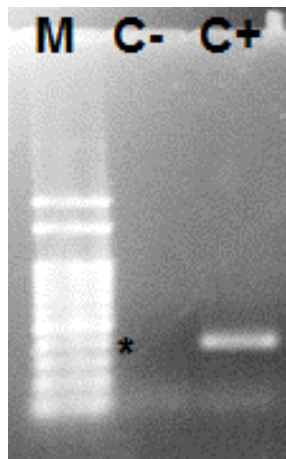


Figura 3. Fragmento de DNA do gene da Mundticina KS do isolado de *E. mundtii* em gel de agarose 1,0 % com marcador molecular KAPA Universal Ladder (canaleta 1), controle negativo (canaleta 2), e isolado de *E. mundtii* (canaleta 3). M marcador; C- controle negativo; C+ controle positivo; * 308pb. Fonte: Arquivo Pessoal.

4.4 Teste de atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células

No teste com o sobrenadante livre de células, dos 26 enterococos que apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC 35153, somente o isolado *E. mundtii* J5 apresentou atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células. Os isolados que não apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante foram descartados do estudo, pois, possivelmente produziram outras substâncias antimicrobianas que não as enterocinas.

O isolado *E. mundtii* J5 foi selecionado para os ensaios de determinação do espectro de atividade, quantificação da atividade antimicrobiana, estabilidade química e física do sobrenadante livre de células,

pois apresentava o gene da mundticina, além de ter sido previamente avaliado quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (Tabela 6) e genes de virulência, sendo negativo para os genes *cylA*, *ace* e *asa* e positivo para *gelE* (Santestevan et al., 2014).

Tabela 6. Distribuição do padrão de resistência antimicrobiana do isolado *E. mundtii* obtido de amostra fecal de lobos-marinhos (OTARIIDAE: Arctocephalus spp.). Resultados do diâmetro do halo de inibição em milímetros.

Espécie	AMP*	CIP*	CLO*	ERI*	EST*	GEN*	NIT*	NOR*	TET*	VAN*
<i>E. mundtii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Antimicrobianos: ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), eritromicina (ERI), estreptomicina (EST), gentamicina (GEN), nitrofurantoína (NIT), norfloxacina (NOR), tetraciclina (TET) e vancomicina (VAN).

4.5 Determinação do espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células

Para avaliar o espectro de atividade do sobrenadante livre de células do *E. mundtii* J5, esse foi testado contra micro-organismos indicadores que pertencem ao grupo das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

O sobrenadante livre de células apresentou atividade frente a todos os isolados de *L. monocytogenes* com halos de inibição que variaram de 45 a 15,8 mm (Tabela 7). Os isolados de *L. monocytogenes* de leite de vaca se mostraram sensíveis, produzindo halos de inibição, sendo a *L. monocytogenes* sorotipo 1c a que apresentou o maior halo de inibição sendo, portanto, o mais sensível à substância antagonista; e o sorotipo 4b o menor halo e o mais resistente. Para as cepas de *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 14579, *S. aureus* ATCC 190506, *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. agalactiae* ATCC 13813 não foi verificado a presença de halo de inibição.

Tabela 7. Resultados do espectro de atividade do sobrenadante livre de célula proveniente do isolado de *E. mundtii* J5 contra micro-organismos indicadores.

Espécies	Sorotipo	Halo (mm)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	0
<i>Eschechia coli</i> ATCC 25922	-	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 190506	-	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	0
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	-	0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	1/2c	30
<i>Listeria monocytogenes</i> *	1/2a	25,5
<i>Listeria monocytogenes</i> *	1/2b	24,3
<i>Listeria monocytogenes</i> *	4b	15,8
<i>Listeria monocytogenes</i> *	1c	45

**Listeria monocytogenes* provenientes de leite de vaca.

4.6 Quantificação da atividade antimicrobiana do sobrenadante

livre de células

Foram realizadas diluições com os sobrenadantes livre de células do isolado *E. mundtii* J5, para determinar a atividade antimicrobiana em Unidades Arbitrárias (UA/mL). A UA foi definida como a recíproca da maior diluição com halo de inibição maior que 2 mm. A atividade antimicrobiana do isolado de *E. mundtii* J5 foi de 400 UA/mL contra *L. monocytogenes* ATCC 35153.

4.7 Avaliação da estabilidade da substância antimicrobiana

4.7.1 Estabilidade térmica

O sobrenadante livre de células do *E. mundtii* J5 manteve a sua atividade nas temperaturas testadas, com intervalos de 10 °C, entre 30 e 100 °C. Após 15 min na autoclave o sobrenadante manteve, aproximadamente, 70% da sua atividade quando comparada com o controle (sem tratamento

térmico). Portanto, pode-se afirmar que a substância antagonista produzida por esse micro-organismo é considerada estável ao aquecimento (Figura 4).

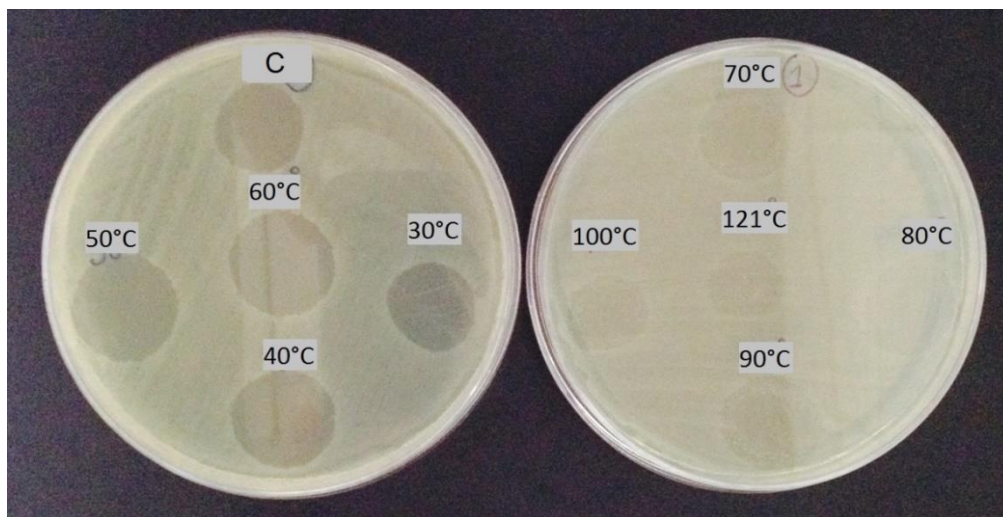


Figura 4. Halos de inibição formados com o sobrenadante livre de células do *Enterococcus mundtii* J5 contra *L. monocytogenes* ATCC 35153 com os devidos tratamentos térmicos. C controle sem tratamento térmico; 30 a 121 °C temperaturas as quais os sobrenadantes foram tratados. Fonte: Arquivo Pessoal.

A figura 5 mostra o diâmetro dos halos de inibição (em triplicata) no controle sem tratamento (0) e com as diferentes temperaturas testadas. A atividade se manteve estável até os 100 °C, observando-se a maior queda à 121 °C (autoclave).

Foi verificada uma diferença significativa entre os tratamentos testados ($p < 0,05$).

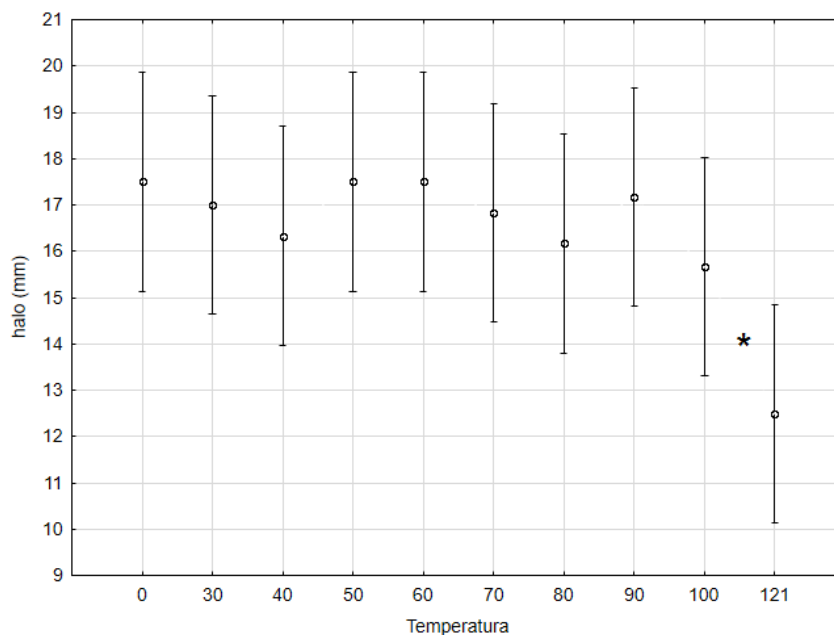


Figura 5. Resultado da análise de variância utilizando os halos de inibição (mm) obtidos no teste de manutenção da atividade antimicrobiana após tratamento térmico, com um índice de confiança de 95%. Cada ponto representa a média dos halos de inibição do sobrenadante testado em triplicata e (0) é o controle sem tratamento. *Diferença significativa entre os tratamentos de 0 a 100 °C em relação a 121 °C (p: 0,03).

4.7.2 Manutenção da atividade antimicrobiana sob congelamento

O sobrenadante da espécie *E. mundtii*, armazenado sob refrigeração a -20 °C, não apresentou alteração na atividade antimicrobiana em 10, 20 e 30 dias de congelamento, sendo mantido os 100 % de atividade em relação ao controle sem o congelamento.

4.7.3 Estabilidade frente à variação do pH

O sobrenadante não perdeu a atividade em nenhum dos pHs testados. Os menores halos de inibição foram apresentados em pHs ácidos (1, 2 e 3), mantendo 53% da atividade; e pHs básicos (8 a 12), mantendo 64% da atividade (Tabela 8). A faixa de pH na qual foi desenvolvida a maior atividade

antimicrobiana foi entre 4 e 7, com a atividade máxima observada em pH 6 (Figura 6). Verificou-se diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

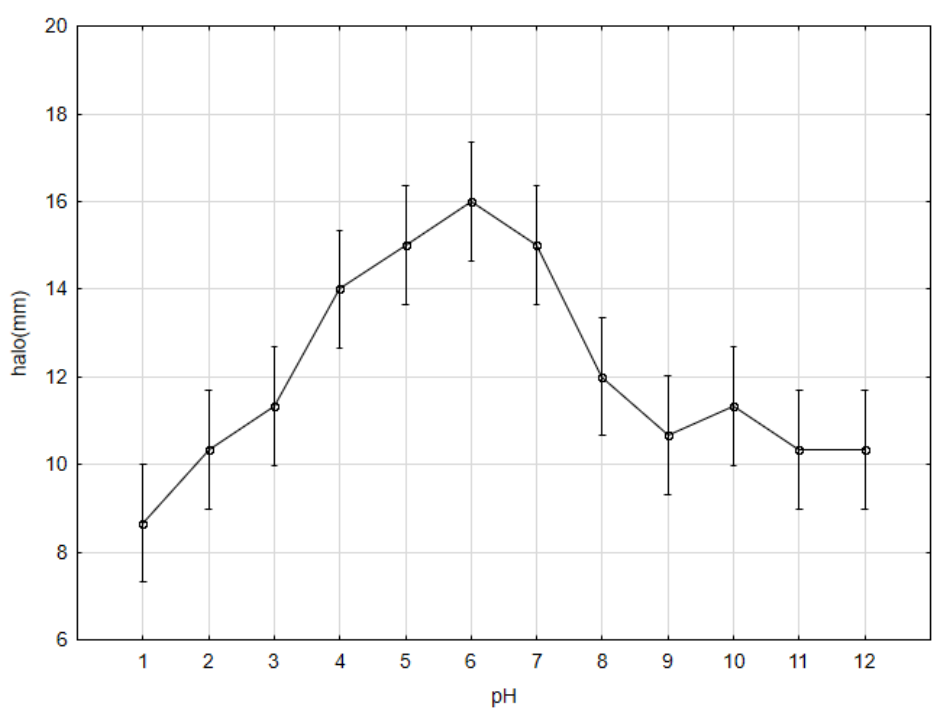


Figura 6. Resultado da análise de variância utilizando os halos de inibição (mm) obtidos no teste de manutenção da atividade antimicrobiana após tratamento com diferentes pHs, com um índice de confiança de 95%. Cada ponto representa a média dos halos de inibição do sobrenadante testado em triplicata.

4.7.4 Suscetibilidade a Enzimas Proteolíticas

As proteases papaína, proteinase K e tripsina, nas concentrações de 2 mg/mL inativaram a substância antagonista produzida pelo *E. mundtii* J5 confirmando a natureza proteica do agente antimicrobiano (Figura 7).

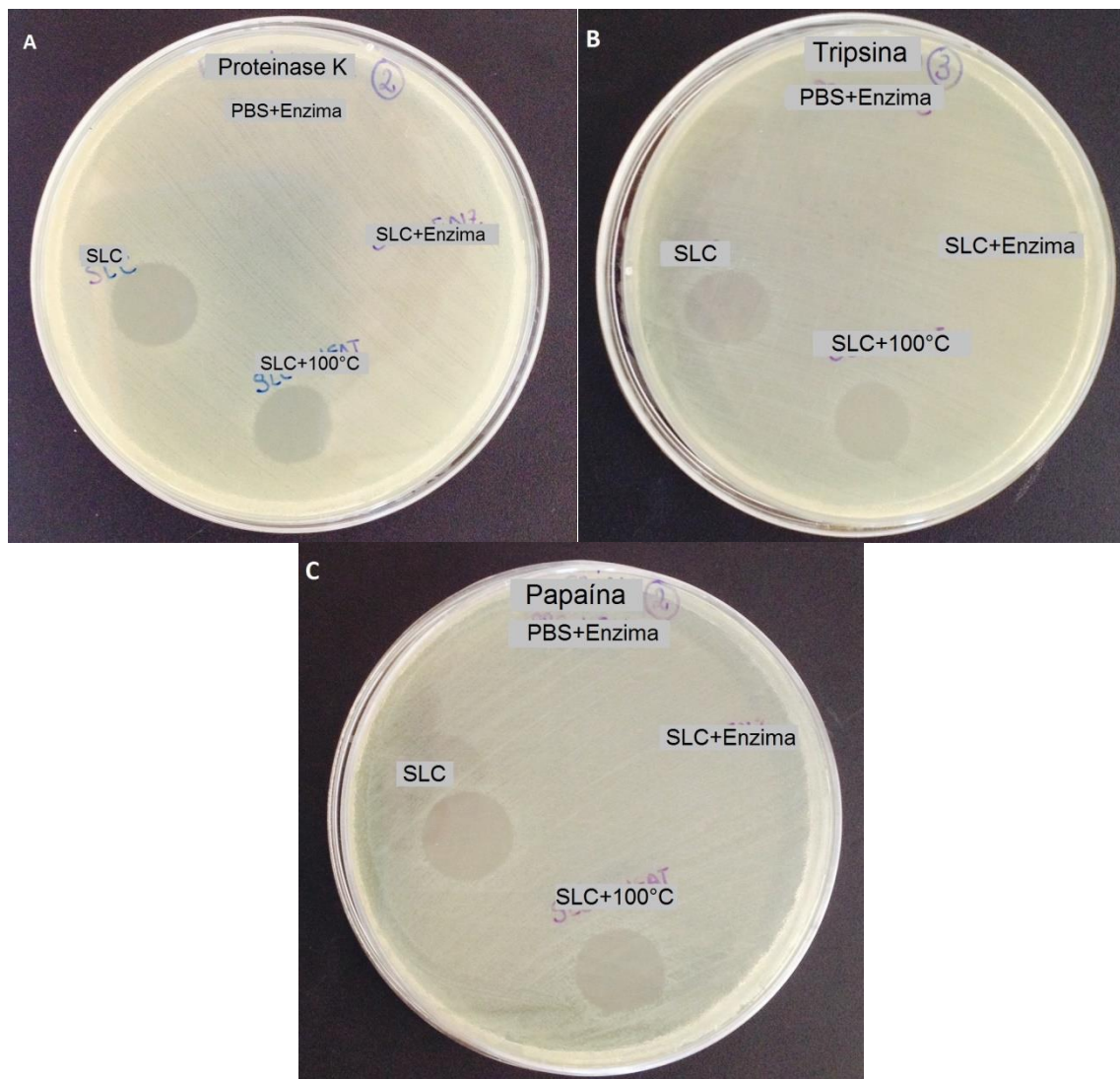


Figura 7. Halos de inibição do sobrenadante livre de células de *E. mundtii* J5 após o tratamento com as enzimas proteolíticas contra *L. monocytogenes* ATCC 35153. A) sobrenadante tratado com proteinase K; B) com tripsina; C) com papaína. PBS+Enzima: controle da enzima; SLC: controle do sobrenadante livre de células; SLC+Enzima: sobrenadante mais enzima; SLC+100 °C: sobrenadante tratado a 100 °C/3min. Fonte: Arquivo Pessoal.

4.7.5 Suscetibilidade a Solventes Orgânicos

Houve formação de halo de inibição com os controles dos solventes butanol e clorofórmio, sendo esses solventes ativos contra a bactéria indicadora *L. monocytogenes* ATCC 35153. Portanto, o halo de inibição do

sobrenadante formado com esses dois solventes deve ser desconsiderado, já que a resistência não pode ser representativa da ação do peptídeo.

Os solventes, etanol 95 %, acetona, metanol e DMSO não apresentaram resistência à formação do halo de inibição e o sobrenadante manteve, aproximadamente, 87 % da atividade junto a esses solventes (Figura 8).

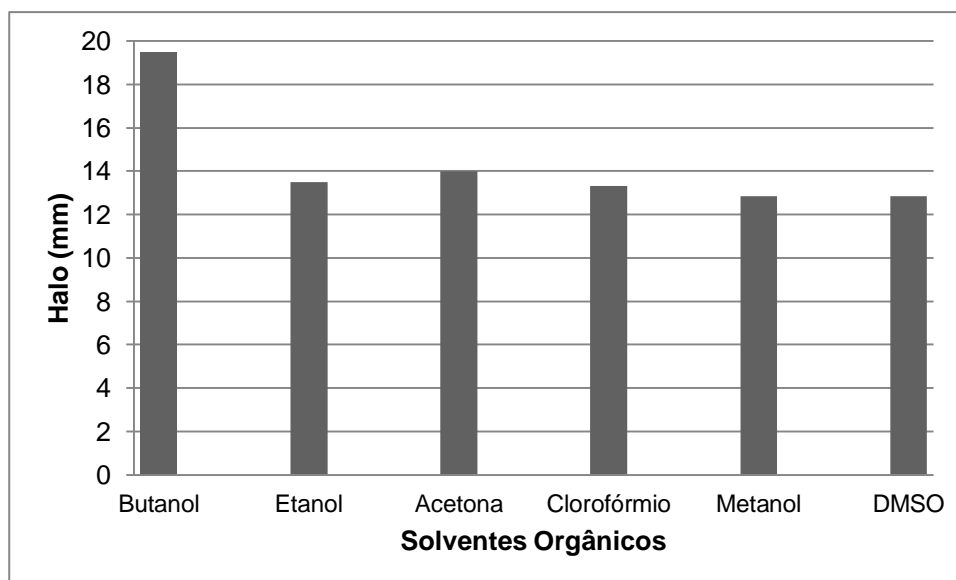


Figura 8. Resultados utilizando os halos de inibição (mm) obtidos no teste de manutenção da atividade antimicrobiana após tratamento com diferentes solventes orgânicos, com um índice de confiança de 95%. Cada ponto representa a média dos halos de inibição do sobrenadante testado em triplicata.

4.8 Análise da atividade com Tween 80

O sobrenadante quando testado, após a adição de 10% de Tween 80, obteve uma atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC 35153 em média 35% superior ao sobrenadante sem a adição do detergente. O sobrenadante com Tween 80 e aquecimento a 100 °C também obteve uma

atividade antimicrobiana 35% superior comparada com o controle, não havendo diferença de atividade com o aquecimento.

4.9 Curva de produção de enterocinas

O isolado J5 começou a produzir a mundticina na fase logarítmica de crescimento, apresentando cinética de metabólito primário. Na Figura 9, o primeiro ponto é representado pelas primeiras seis horas, na qual a atividade antimicrobiana foi a menor observada ao longo da curva. O início da fase estacionária de crescimento começou a partir das 10 h de incubação. Os maiores halos de inibição estão presentes entre 12 e 36 h, ou seja, a partir do início da fase estacionária, mostrando atividade máxima até 36 h.

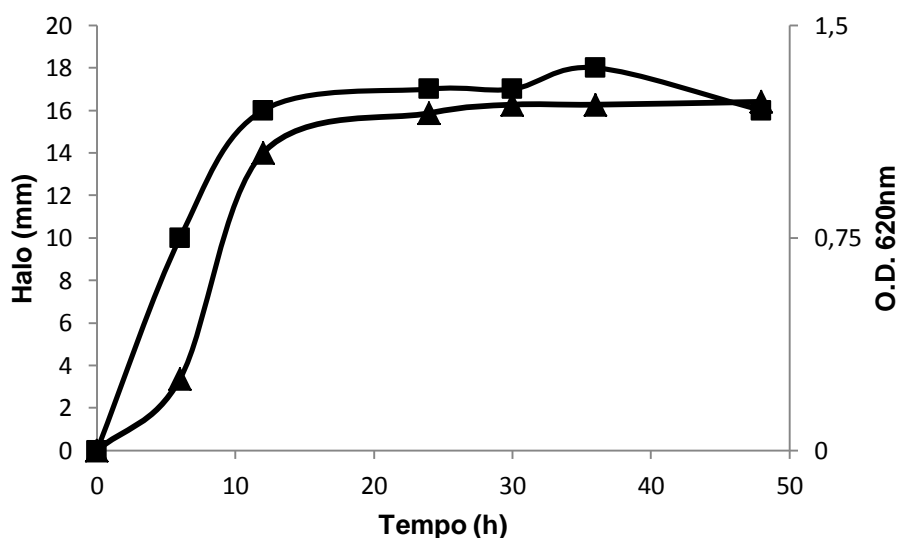


Figura 9. Curva de produção da mundticina KS. Crescimento bacteriano (triângulos) e atividade antimicrobiana (quadrados), monitorados durante 48 h em meio TSB a 35 °C.

O pH inicial da cultura era de 6,5, após 12 h passou para 5,0, chegando até 4,0 em 48 h de crescimento. Sendo assim, o pH do sobrenadante livre de células era ajustado para a verificação do halo de

inibição para que a ação de ácidos orgânicos não interferissem na leitura do diâmetro do halo.

4.10 Verificação da presença de plasmídeo

Não foi verificada a presença de plasmídeo no isolado *E. mundtii* J5. A utilização do DNA cromossomal do *E. mundtii* J5 foi necessária para tornar visível a diferença do peso molecular do DNA plasmidial (Figura 9). Como controle positivo foi utilizado um isolado de *Escherichia coli*.

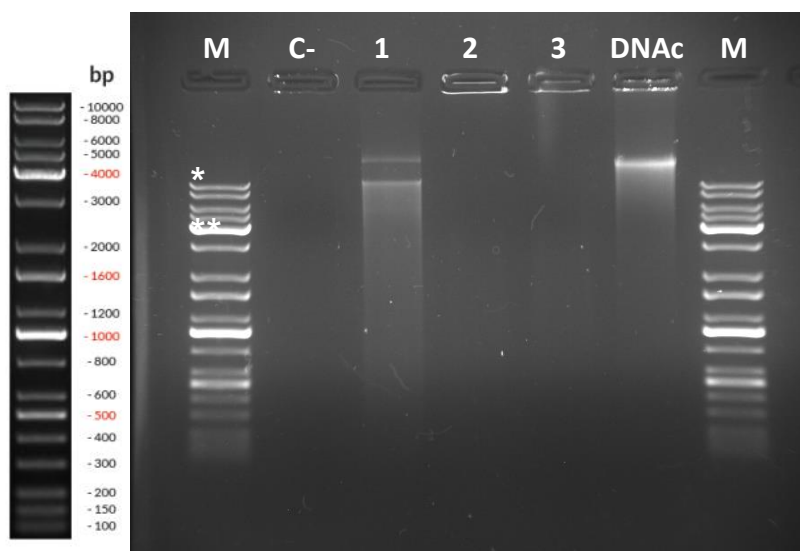


Figura 10. Verificação da presença de plasmídeo do isolado de *E. mundtii* em gel de agarose 1,0% com marcador molecular KAPA Universal Ladder (canaleta 1 e 7), controle negativo (canaleta 2), controle positivo com isolado de *E. coli* (canaleta 3), isolado de *E. mundtii* (canaleta 4), DNAC do *E. mundtii* J5 (canaleta 6). *10Kb **4Kb. Fonte: Arquivo Pessoal.

5. DISCUSSÃO

5.1 *Enterococcus* spp. em amostras de leite cru de búfala e amostras fecais de lobos-marinhos

Existe uma escassez de estudos que avaliam a microbiota de mamíferos como animais marinhos e búfalos, no entanto, esses animais possuem particularidades. Lebreton et al. (2014), descreveram uma série de investigações em diferentes partes do mundo a fim de categorizar a prevalência dos enterococos em animais selvagens dos mais variados habitats, e também assinalar outros aspectos destes micro-organismos. Os lobos-marinhos costumam habitar zonas heterotérmicas em que as temperaturas são variáveis, já os búfalos, apresentam uma rusticidade que adere resistência a ectoparasitoses, apresentam menor frequência de infecções e são menos exigentes quanto à qualidade das pastagens e gramíneas. Esses fatores expõem a sobrevivência dos enterococos, e mesmo assim estes micro-organismos parecem resistir a essas variações e se disseminar (Teboldi et al., 2008; Lebreton et al., 2014).

Enterococcus spp. isolados de diferentes fontes, incluindo alimentos, tem sua origem, normalmente, da microbiota intestinal de humanos e animais, sendo o trato gastrointestinal o maior reservatório de enterococos. Quanto à composição da microbiota dos lobos-marinhos ela pode estar relacionada às

dietas específicas que alguns destes animais fazem e isso determina a capacidade de sobrevivência dos enterococos em seus aparelhos gatrointestinais (Lebreton et al., 2014).

Devriese et al. em 1987, descreveram as espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans* como sendo as mais comumente encontradas no intestino de mamíferos, enquanto outras espécies pareciam ser ocasionais. No entanto, à medida que novos estudos foram sendo realizados e novas espécies foram descritas, suas associações com os hospedeiros foram sendo desvendadas, e ainda atualmente pode-se observar a identificação de novas espécies de *Enterococcus* spp. em diversos ambientes (Euzéby, 2014).

Os lobos-marinhos parecem apresentar *E. faecalis* como espécie predominante do trato gastrointestinal. Em estudo realizado por Santestevan, 2014, a espécie *E. mundtii*, foi isolada de fezes de lobo-marinho e se encontrava na mesma amostra em que prevaleceu uma colonização por *E. casseliflavus*. No estudo de Fisher & Phillips (2009) foram encontradas as espécies de *E. casseliflavus* e *E. mundtii* isoladas de fontes vegetais marinhas.

A microbiota predominante no leite cru é bastante diversificada e rica, geralmente inclui espécies de bactérias ácido-lácticas, *Pseudomonas* spp., bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae* e leveduras. Outros grupos microbianos presentes no leite cru incluem *Bacillus* sp., *Clostridium* sp, *Listeria* spp. e enterobactérias (Lafarge et al., 2004). Quanto a maior prevalência de espécies de *Enterococcus* spp. encontrada no leite cru de búfala, pode-se verificar, em outros estudos, que as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais prevalentes (Cortés et al., 2006; Tebaldi et al., 2008; Riboldi et al., 2008;

Ruzauskas, et al., 2009). A razão da prevalência de enterococos nessas amostras se deve também às condições higiênico-sanitárias durante o processamento do leite. A predominância de *E. faecalis* em amostras de leite também já foi relatada em outros trabalhos que avaliaram leite bovino pasteurizado (Fracalanza et al., 2007), leite bovino cru proveniente de tanques de refrigeração (Tebaldi et al., 2008) e amostras de leite bovino e produtos lácteos em Portugal (Lopes et al., 2005). No entanto, a presença de *E. faecalis* apareceu em um estudo de 2001 de Andrighetto e colaboradores onde 66% dos isolados dessa espécie foram encontrados em queijos de búfala. Em estudo recente, oitenta enterococos foram isoladas do leite bubalino cru, sendo 63,75% *E. faecalis* (Prichula et al., 2012). Os trabalhos que relatem a diversidade de enterococos em leite de búfala são escassos para que se possa comparar com os resultados desse estudo.

5.2 Peptídeos antimicrobianos em amostras de animais marinhos e leite cru de búfala

Existem poucos estudos associados a peptídeos antimicrobianos em enterococos isolados de amostras de leite cru de búfala e de fezes de animais marinhos. Na literatura, estudos com queijo mussarela (queijo de búfala) são mais prevalentes. A enterocina 226NWC produzida por *E. faecalis* 226 foi encontrada em leite cru de búfala com atividade contra *L. monocytogenes*, sendo essa espécie amplamente utilizada na indústria de alimentos como cultura “starter” (Villani et al., 1993).

Bactérias bacteriocinogênicas no TGI de animais marinhos é um assunto escasso na literatura, porém, as bacteriocinas de bactérias marinhas

são abordadas com maior frequência. Wilson et al. (2008) isolaram oito bactérias marinhas produtoras de substâncias antagonistas oriundas de diferentes espécies de invertebrados marinhos (ostras, cracas, esponjas, ouriço-do-mar, algas). A perda da atividade com tratamento de enzimas proteolíticas sugeriu que essas substâncias fossem de origem proteica. Quanto à produção de bacteriocinas por micro-organismos provenientes do TGI de animais marinhos, a literatura apresenta somente estudos de isolados provenientes de intestino de peixes (Sugita et al., 1997; Gatesoupe, 2008).

5.3 Triagem dos isolados produtores de substância antagonista

Nesse estudo, dos 53 isolados testados para a triagem, 26 produziram substância antagonista, ou seja, 49%. Resultados similares foram encontrados por Del Campo et al. (2001), onde 218 isolados de enterococos de diversas origens foram testados contra 33 bactérias indicadoras e 102 (46,8%) inibiram pelo menos uma das bactérias testadas, sendo a maioria *E. faecalis* (80%) e *E. faecium* (20%). O trabalho de Fliss et al. (2014) também encontraram um número de isolados bacteriocinogênicos semelhante a esse estudo. De 98 isolados de leite fermentado, 44 (44,8%) apresentaram produção de substância antagonista através da técnica de dupla camada contra pelo menos uma das bactérias indicadoras *Listeria innocua* HPB13, *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *Lactis* ATCC 4797 e *Escherichia coli* MC4100.

As bacteriocinas têm sido consideradas como inibidoras de várias bactérias (Ogunbanwo et al., 2003; Flythe et al., 2004; Molhada et al., 2006; Karthikeyan and Santosh, 2009), todavia, a inibição causada pelo enterococos pode não estar relacionada com as bacteriocinas e sim com outras substâncias

inibitórias como ácidos orgânicos resultante do seu metabolismo (Deegan et al., 2006; Galvez et al., 2008). Por esse motivo há a necessidade da verificação da ação inibitória através do sobrenadante livre de células.

5.4 Amplificação dos genes das enterocinas

Do total de isolados (26), 10 foram positivos para enterocina B e nenhum para enterocina A. A enterocina A foi identificada pela primeira vez por Aymerich et al. (1996) sendo produzida pela cepa *E. faecium* CTC 492 e o gene dessa enterocina foi encontrado no DNA cromossomal. A enterocina B foi identificada por Casaus et al. (1997) sendo produzida por *E. faecium* T136 e seu gene também foi localizado no DNA cromossomal. As enterocinas A e B são, portanto, encontradas mais facilmente em espécies de *E. faecium* e *E. faecalis* e dificilmente encontradas em outras espécies de enterococos.

Alguns isolados de *E. faecalis*, provenientes do leite cru de búfala, positivos para enterocina B, não obtiveram atividade no teste do sobrenadante livre de células. A não expressão do gene pode estar vinculada às condições de crescimento. De Vuyst et al. em 2002, testaram 122 isolados de enterococos para a presença dos genes de enterocinas A, B, P, 31, AS-48, L50-A, L-50B e citolisina. As enterocinas A e B só ocorreram em *E. faecium*, sendo que 46 isolados apresentaram o gene da enterocina A e 10 de ambas as enterocinas.

Os enterococos possuem a capacidade genética de produzir mais de uma enterocina, assim como outras bactérias ácido-láticas. A enterocina B é geralmente co-expressa com a enterocina A e esses agem sinergicamente (Zendo, Sonomoto, & Ishizaki, 2001). Provavelmente devido ao fato de que

nenhum gene de transporte foi encontrado para translocação do gene da enterocina B, a secreção desse peptídeo depende de outros, como a enterocina A (Campos, & Thonart, 2011). Nesse trabalho, os isolados apresentaram somente a presença do gene da enterocina B, isso pode indicar que a expressão desse gene seja dependente da presença e expressão do gene da enterocina A.

No isolado de *E. mundtii* (J5) foi encontrado o gene da mundticina KS que, assim como o gene da enterocina B, não foi encontrado os genes para a codificação dos transportadores ABC (Campos, & Thonart, 2011). Sendo assim, é provável que alguma outra enterocina, que não foi detectada nesse estudo, esteja auxiliando no transporte da mundticina para fora da célula microbiana.

5.5 Teste de atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células

Nesse estudo somente o isolado de *E. mundtii* (J5) obteve atividade antimicrobiana com o sobrenadante livre de células, ou seja, 1,88% do total de 53 isolados produziram atividade antimicrobiana com o sobrenadante.

O baixo número de isolados de enterococos com atividade no sobrenadante livre de células no presente estudo está em conformidade com valores encontrados em outros estudos. Du Toit et al. (2000), testaram o sobrenadante de 92 isolados de enterococos, destes, 7 (7,6%) eram produtores de enterocinas. No trabalho realizado por De Vuyst et al. (2002) para 122 isolados selecionados na triagem foram preparados o sobrenadante livre de células e testados contra 52 bactérias indicadoras. Dessas, 50 isolados não

produziram enterocina e 62 apresentaram atividade antimicrobiana correspondendo, assim, a 14% dos 426 isolados que foram utilizados nesse estudo.

Birri et al. (2010) trabalharam com o sobrenadante de 104 bactérias ácido-láticas provenientes do trato gastrointestinal de crianças, sendo que somente um isolado de *E. avium* (0,96%) se mostrou produtor de substância antagonista.

5.6 Determinação dos fatores de virulência

Os mecanismos moleculares de virulência no gênero *Enterococcus* spp. possuem uma ampla capacidade de transferência genética e os diferentes mecanismos que permitem a eles carrear esses determinantes podem contribuir para o aumento da virulência (Poeta et al., 2005). Eaton & Gasson (2001), encontraram genes relacionados à virulência em enterococos utilizados como culturas “starter” em alimentos, o que não necessariamente indica risco ou certeza de que ocorrerá alguma enfermidade.

Nesse estudo, o isolado de *E. mundtii* (J5) apresentou os genes de virulência *cyIA*, *ace* e *asa* negativos e o gene *gelE* positivo, sendo que quanto menor o número de fatores de virulência encontrados, melhor para o uso na indústria alimentícia. O baixo número de fatores de virulência em conjunto com o perfil de suscetibilidade sensível, torna o micro-organismo mais próximo do ideal para ser utilizado como um probiótico ou bioconservante de alimentos. Segundo a Associação Científica Internacional de probióticos e prebióticos recomenda-se que os micro-organismos vivos sejam seguros, bem definidos e

com uma expectativa razoável de benefícios para o consumidor (Hill et al., 2014).

Apesar do maior número de genes de virulência estar associado com a espécie *E. Faecalis* isolados a partir de amostras de animais selvagens, como avaliado por Poeta et al. (2005), mais estudos devem ser realizados para avaliar a evolução de enterococos abrigoando determinantes de virulência em diferentes ecossistemas.

5.7 Determinação do espectro de atividade antimicrobiana e quantificação do sobrenadante livre de células

As bacteriocinas da classe IIa se caracterizam pela sua forte atividade anti-listeriana e grande parte das enterocinas caracterizadas até o momento pertencem a essa classe. Essa atividade anti-listeriana pode ser explicada pelo fato de os enterococos e as listerias serem filogeneticamente relacionados (Scallan et al., 2011). A bibliografia mostra diversos trabalhos em que as bacteriocinas possuem atividade contra o gênero *Listeria* (Kawamoto et al., 2002; García et al., 2004; Fliss et al., 2014), mas o espectro de atividade contra outros gêneros bacterianos é variável.

Mareková et al. (2003) caracterizaram uma enterocina produzida por *E. faecium* EK13, isolado do ambiente, que inibiu todos os isolados de *Listeria spp.* testados e cinco isolados de *Lactobacillus spp.*

As enterocinas se caracterizam por inibirem espécies intimamente relacionadas, por esse motivo, muitas vezes não apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas. Poucas enterocinas caraterizadas até o momento possuem atividade contra esse grupo de bactérias. Autores como Dal Bello et

al. (2010) e Paschoalin et al. (2011), também relataram atividade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. pela produção de enterocinas capazes de inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, além de inibir bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Salmonella Paratyphi*. Trabalhos realizados por Lauková (2000, 2004) caracterizam enterocinas que apresentam atividade antimicrobiana contra *Salmonella* sp.. A bacteriocina produzida por *Bacillus licheniformis* P40 apresentou um amplo espectro de atividade incluindo bactérias Gram-negativas como *Salmonella gallinarum* (Cladera-Oliveira et al., 2004).

Em estudo realizado por Kawamoto et al. (2002) foi detectado o espectro de atividade da enterocina mundticina KS produzida por *E. mundtii* NFRI 7393 que apresentou as bactérias indicadoras das espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. mundtii* como as mais sensíveis à atividade da mundticina. Nesse estudo, também foi testada como bactéria indicadora a *L. monocytogenes* que apresentou sensibilidade à enterocina testada.

As bacteriocinas produzidas por BAL, geralmente, possuem atividades antimicrobianas em UA/ml baixas. Uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis subsp. lactis*, isolada de leite de cabra, apresentou uma quantificação de 320 UA/m (Taheri et al., 2012).

Todavia, o baixo valor da quantificação da enterocina mundticina KS (400 UA/mL) encontrada nesse estudo se deve a técnicas de determinação dessa atividade. Alguns trabalhos realizados com enterocinas mostram a produção sendo realizada em fermentadores e condições controladas, como o pH, por exemplo, que é um fator importante na produção dos peptídeos. Isso

pode interferir na atividade antimicrobiana obtida em UA/mL e determinar qual a enterocina vai ser produzida. Nessas condições, geralmente, os valores de atividade antimicrobiana obtidos são bem superiores ao encontrado nesse trabalho. Sabia et al. (2004) caracterizaram duas enterocinas produzidas por *E. casseliflavus* e *E. faecalis* isolados de salame italiano fermentado, onde as atividades antimicrobianas determinadas em UA/ml, foram de 1280 e 620 UA/mL, respectivamente. A mundticina apresentou uma atividade de 6.400 a 12.800 UA/mL quando produzida em fermentador (Kawamoto et al., 2002).

5.8 Avaliação da estabilidade da substância antimicrobiana

Vários fatores físico-químicos parecem afetar a produção de bacteriocinas assim como a sua atividade. A produção de bacteriocinas é dependente do crescimento e da atividade fisiológica da bactéria produtora (Cui et al., 2012). Portanto, composição do meio de cultura, a temperatura e o pH são fatores que influenciam na produção dos peptídeos (Leroy & De Vuyst, 2002).

5.8.1 Estabilidade térmica e manutenção da atividade antimicrobiana sob congelamento

A estabilidade térmica da mundticina foi confirmada nesse estudo pela conservação da atividade do peptídeo tanto em altas quanto em baixas temperaturas. A estabilidade ao tratamento térmico é uma característica já identificada em muitas enterocinas (Sabia et al., 2004; Richard et al., 2006). A maioria das bacteriocinas de classe II apresentam uma ponte disulfeto entre duas cisteínas. Na região C-terminal de algumas bacteriocinas de classe IIa existe uma ponte disulfeto adicional, tais como a pediocina PA1/AcH, a

enterocina A, a plantaracina 423, entre outras. A segunda ponte dissulfeto não só possui um importante papel na estabilidade da estrutura 3D do domínio C-terminal, mas também está relacionada ao amplo espectro de atividade antimicrobiana bem como a resistência a elevadas temperaturas (Fimland et al., 2005; Drider et al., 2006; Richard et al., 2006). Por esse motivo a estabilidade térmica e resistência a temperaturas de 121 °C da mundticina testada pode ser explicada.

Zendo et al. (2005) isolaram uma mundticina de *E. mundtii* QU 2 proveniente de grãos de soja que foi tratada a 110 °C por 10 minutos e manteve sua atividade antimicrobiana intacta. Segundo Kawamoto et al. (2002) a mundticina mantém 50% da sua atividade antimicrobiana quando exposta a 100 °C. Além da temperatura em que as enterocinas são expostas deve-se levar em consideração o tempo de exposição para a manutenção da atividade antimicrobiana.

5.8.2 Estabilidade frente à variação do pH

Vários trabalhos de caracterização das enterocinas determinaram que elas são estáveis a amplas faixas de pH (Kawamoto et al., 2002; Sabia et al., 2004; Richard et al., 2006; Fliss et al., 2014). A manutenção da atividade antimicrobiana em uma ampla faixa de pH é uma vantagem para a preservação de alimentos quando o produto é acidificado ou quando o pH do produto diminui com a proliferação natural de BAL, em geral em alimentos fermentados. Além disso, a estabilidade das bacteriocinas em temperaturas elevadas é uma característica importante para a utilização desses peptídeos como

conservantes em alguns tipos de alimentos devido ao processamento térmico envolvido na produção dos mesmos (Batdorj et al., 2006).

A molécula nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, apresenta caráter ácido, o que explica a sua completa estabilidade em pH 2,0, podendo ser estocada durante longos períodos a temperaturas de 2 a 7 °C. No entanto, a nisina é inativada em pH superior a 7, inclusive em temperatura ambiente (Gálvez et al., 2007). A mundticina isolada de *E. mundtii* QU2 se manteve ativa em uma faixa de pH de 2 a 11 com atividade maior que 12.800 UA/mL contra a bactéria indicadora *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. Mesmo em pH 12, a bacteriocina mostrou atividade a 800 UA/mL.

A faixa de pH na qual a atividade antimicrobiana do *E. mundtii* do presente estudo se apresentou mais elevada foi entre 4 e 7. A atividade máxima de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus acidophilus*, proveniente de intestino de camarão marinho, foi notada em pH 6,0, temperatura a 30 °C e 1,5% de NaCl em trabalho publicado por Karthikeyan & Santosh, 2009.

5.8.3 Suscetibilidade a Enzimas Proteolíticas

Quando as substâncias antimicrobianas produzidas apresentam sensibilidade a alguma protease, a natureza proteica é confirmada e essas substâncias podem ser classificadas como bacteriocinas (Moraes et.al., 2010). Outros estudos mostraram a inativação das enterocinas frente a enzimas proteolíticas como a proteinase K, tripsina e papaína (Kawamoto et al., 2002; Park et al., 2003; Zendo et al., 2005).

No estudo de Zendo et al. (2005) a mundticina foi completamente inativada por todas as enzimas proteolíticas usadas: tripsina, quimotripsina, actinase E, papaína e proteinase K. Esse resultado, assim como o encontrado nesse trabalho, confirma a natureza proteica da enterocina.

A sensibilidade a mais de uma enzima proteolítica sugere a produção simultânea de diferentes bacteriocinas. No entanto, apenas avaliando-se o perfil de sensibilidade às proteases, não é possível determinar qual bacteriocina é produzida pelo isolado, tendo em vista que as diferentes bacteriocinas podem ser sensíveis a uma ou mais enzimas proteolíticas (Arauz et al., 2009).

5.8.4 Suscetibilidade a solventes orgânicos e análise da atividade com Tween 80

Os maiores halos de inibição encontrados no presente estudo foram com os tratamentos de acetona e butanol. Porém, o controle do butanol também apresentou halo de inibição mostrando a eficiência desse solvente contra a *L. monocytogenes*. Sendo assim, somente o tratamento com acetona mostrou a resistência do peptídeo a esse solvente, já que não houve interferência do solvente no tamanho do halo, e a maior atividade do mesmo contra a bactéria indicadora.

Em trabalho realizado por Motta et al. (2007) a atividade antimicrobiana de uma bacteriocina produzida por *Bacillus* spp. contra *L. monocytogenes* ATCC 7644, somente foi afetada pelo butanol e em menor escala pela acetona e metanol.

A estabilidade das enterocinas frente a tratamento com agentes químicos possui grande importância do ponto de vista tecnológico, uma vez que diversos compostos orgânicos e inorgânicos são utilizados para o processamento de alimentos, através da incorporação de ingredientes.

Utilizando-se o tratamento com Tween 80, um aumento na atividade antimicrobiana foi observado. Isso se deve a ação do detergente na membrana plasmática das células causando a desnaturação da estrutura proteica. A lise celular libera um maior número de peptídeos que ainda não foram liberados no meio extracelular, aumentando, assim, a atividade antimicrobiana (Carrilo et al., 2003). Resultados semelhantes foram observados para a bacteriocina ST15, produzida por *E. mundtii* ST15. Essa bacteriocina, além de se manter ativa a ação de Tween 20 e Tween 80, aumentou a sua atividade frente a *L. monocytogenes* (Kwaadsteniet et al., 2005).

5.9 Curva de produção de enterocinas

A diminuição da atividade antimicrobiana pode ser observada pela diminuição do pH, já que esse fator está relacionado com a absorção da enterocina pela superfície da célula produtora. Nesse trabalho observou-se uma maior atividade antimicrobiana do peptídeo a partir das 12 h de crescimento (fase estacionária), a partir das 48 h de crescimento (última incubação) houve uma pequena diminuição da atividade, sendo que o pH se manteve em 4,0 nos dois últimos pontos da curva (36 e 48 h). Portanto, a diminuição da atividade não está relacionada ao baixo pH e sim com aceleração da morte celular (Arauz et al., 2009).

A maior atividade antimicrobiana foi observada no final da fase estacionária, assim, pode-se concluir que nessa fase as células microbianas estão sob forte estresse provocado pela falta de nutrientes do meio de cultura. A alta competitividade provocada pelo grande número de células instiga a necessidade de produção das enterocinas como forma de proteção e necessidades de sobrevivência.

Mareková et al. (2003) realizaram a curva de produção de enterocinas do isolado *E. faecium* EK 13 sem ajuste de pH, em fermentador. A produção de bacteriocina iniciou-se com uma hora de incubação, assim como nesse trabalho, e teve sua atividade máxima a partir de 7 h de incubação, sendo que o início da fase estacionária foi em 6 h. O pH final, após 25 h, foi de 4,4. Resultados semelhantes foram encontrados na curva de produção do isolado *E. faecium* P21, onde a atividade máxima foi encontrada a partir de 12 h de incubação, na fase estacionária, e o pH final também foi de 4,4 (Herranz et al., 2001).

5.10 Verificação da presença de plasmídeo

Nesse trabalho, a verificação da presença de plasmídeo foi realizada em duplicata e se obteve resultados negativos. Sendo assim, pode-se considerar que o peptídeo deve estar relacionado com o DNA cromossomal da bactéria. A mundticina, em alguns trabalhos, vem sendo caracterizada geneticamente como sendo codificada por um plasmídeo de aproximadamente 50 Kb (Eguchi et al., 2001).

A síntese das bacteriocinas é determinada pela estrutura genética de 4 genes, que codificam funções básicas requeridas para a produção da

atividade antimicrobiana extracelular. Esses genes podem estar localizados em cromossomo, plasmídeo ou transposons (Ishibashi et al., 2014). A mundticina KS é um peptídeo que pertence a classe IIa das bacteriocinas e é produzido pela espécie *E. mundtii*. Embora as bacteriocinas, geralmente, estejam relacionadas com a presença de plasmídeos, algumas da classe IIa foram localizadas sobre fragmentos cromossomais (Perry et al., 2009).

Em trabalho realizado por Franz et al. (1999) observou-se a presença da enterocina B proveniente de *E. faecium* BFE 900 localizado em um fragmento cromossomal (EcoRI, 12Kb). Contudo, a maquinaria de transporte e genes associados à produção dessa enterocina não estão presentes no fragmento de DNA cromossomal desse peptídeo. A enterocina AS-48 de *E. faecium* RJ 16 também mostrou sua localização cromossomal através de hibridização. Sendo essas enterocinas, até o momento, descritas como pertencentes a um fragmento plasmidial.

6. CONCLUSÕES

1. Foi possível isolar enterococos de amostras de leite cru de búfala através das técnicas convencionais de isolamento, sendo confirmado por PCR gênero-específico.

2. As técnicas de PCR multiplex empregando oligonucleotídeos espécie-específicos em conjunto com as provas bioquímicas permitiu a identificação de todos os isolados.

3. A identificação mostrou a prevalência de *E. faecalis* no leite cru de búfala. A baixa diversidade pode estar associada a algum comportamento determinante das búfalas.

4. Foram identificados enterococos produtores de peptídeos antimicrobianos dos isolados de leite cru de búfala e fezes de lobo-marinho, através da triagem em dupla camada.

5. Na verificação dos genes das enterocinas, foram detectados os genes para enterocina B e mundticina (J5) e não foram detectados os genes para as enterocinas A e P.

6. Somente o isolado *E. mundtii* J5, apresentou atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células.

7. O isolado J5 apresentou perfil de suscetibilidade sensível para todos antimicrobianos testados além de não apresentar a maioria dos genes de virulência testados.

8. O espectro de atividade antimicrobiana do isolado J5 foi restrito mostrando somente ação contra *Listeria monocytogenes*. O isolado de *L. monocytogenes* sorotipo 1c foi o que apresentou o maior halo de inibição, sendo, portanto, o mais sensível ao peptídeo.

9. A mundticina apresentou uma boa estabilidade térmica frente a diferentes temperaturas, resistindo à autoclave e ao congelamento. Além disso, manteve sua atividade em uma ampla faixa de pH (1-12), na qual a maior atividade manteve-se na faixa de 4 a 7. O sobrenadante livre de células desse peptídeo foi sensível à proteinase K, tripsina e papaína, confirmando sua natureza proteica. Todos os solventes orgânicos testados com o sobrenadante livre de células não afetaram a atividade do peptídeo a ponto de inativá-lo. Somente os solventes butanol e clorofórmio apresentaram seus solventes positivos, portanto, deve-se desconsiderar o resultado dos mesmos.

10. O sobrenadante quando testado com Tween 80 obteve uma atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* superior ao teste sem a adição do detergente, sendo que o aquecimento a 100 °C manteve essa atividade.

11. O isolado J5 iniciou a produção da mundticina na fase estacionária da curva de produção. Não foi verificada a presença de plasmídeo no isolado *E. mundtii* J5.

12. Com base nos resultados obtidos, essa enterocina possui potencial para novos estudos como biopreservante de alimentos, considerando a sua estabilidade e sua capacidade de inibir *L. monocytogenes*, um patógeno importante vinculado à alimentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIGHETTO, C; KNIJFF, E; LOMBARDI, A; TORRIANI, S; VANCANNEYT, M; KERSTERS, K; SWINGS, J; DELLAGLIO, F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. **Journal of Dairy Research**, v.68, n.2, p.303-316, 2001.

AMARAL, FR. Fatores que interferem na contagem de células somáticas e constituintes do leite de búfalas. 46f. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2005.

ARAUZ, LJ; JOZALA, AF; MAZZOLA, PG; PENNA, TCV. Nisin biotechnological production and application: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v.20, n.4, p.146-154, 2009.

BEGLEY, M; HILL, C; ROSS, RP. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to cell envelope-acting antimicrobial agents is dependent on SigB. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, p.2231-2234, 2006.

BENNIK, MHJ; VANLOO, B; BRASSEUR, R; GORRIS, LGM; SMID, EJ. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1373, p.47-58, 1998.

BERNARDES, O. Buffalos breeding in Brasil. **Italian Journal Animal Science**, v.6, n.2, p.162-167, 2007.

BIERBAUM, G; SAHL, HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.10, n.1, p.2-18, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Seção 1, p.13-22, 20 set. 2002.

CARRILO, C; TERUEL, JA; ARANDA, FJ; ORTIZ, A. Molecular mechanism of action of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.16, n.11, p.91-97, 2003.

CECLIMAR – Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos. Instituto de Biociências, UFRGS. Imbé, Rio Grande do Sul. Disponível em <<http://www.ufrgs.br/ceclimar/mortalidade-de-pinguins-no-litoral-do-rs>>. Acesso em 12 janeiro 2015.

CHALÓN, MC; ACUÑA, L; MORERO, RD; MINAHK, CJ; BELLOMIO, A. Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods: Are they the definite hurdle?. **Food Research International**, v.45, n.2, p.735-744, 2011.

CLAVERYS, JP; HÅVARSTEIN, LS. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.7, p.219–229, 2007.

COLLINS, MD; FARROW, JAE; JONES, D. *Enterococcus mundtii* sp. nov.. **International journal of systematic bacteriology**, v.36, n.1, p.8–12, 1986.

COLLINS M D, ASH C, FARROW J A; WALLBANKS, S; WILLIAMS, AM. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. **Journal of Applied Bacteriology**, v.67, n.4, p.453–460, 1989.

COLLINS, B; CURTIS, N; COTTER, P; HILL, C; ROSS, RP. The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, bacitracin and various beta-lactam antibiotics. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v.54, n.10, p.4416-4423, 2010.

COOPERBÚFALO. *Cooperativa Sulriograndense de Bubalinocultores Ind. Com. Ltda*, 2012. Disponível em <<http://www.cooperbufalo-rs.com.br/>>. Acesso em: 2 dez. 2014.

COTTER, PD; HILL, C; ROSS, RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.2, p.777–788, 2005.

CUI, Y; ZHANG, C; WANG, Y; SHI, J; ZHANG, L; DING, Z; QU, X; CUI, H. Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.12, p.16668-16707, 2012.

CUNHA NETO, O. C. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. Dissertação (Mestrado). 71f. Universidade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de São Paulo, SP, Brasil, 2003.

DABOUR, N; ZIHLER, A; KHEADR, E; LACROIX, C; FLISS, I. In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, n.3, p.225-233, 2009.

DAL BELLO, B; RANTSIOU, K. BELLIO, A; ZEPPA, G; AMBROSOLI, R; CIVERA, T; COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **Food Science and Technology**, v.43, n.1, p.1151-1159, 2010.

DEEGAN, LH; COTTER, PD; HILL, C; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v.16, n.3, p.1058-1071, 2006.

DEVRIESE, LA; POT, B; COLLINS, MD. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species groups. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, n.2, p.339-408, 1993.

DRIDER, D; FIMLAND, G; HÉCHARD, Y; MCMULLEN, LM; PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, n.1, p.564–582, 2006.

EATON, TJ; GASSON, MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p.1628-1635, 2001.

EGUCHI, T; KAMINAKA, K; SHIMA, J; KAWAMOTO, S; MORI, K; CHOI, SH; DOI, K; OHMOMO, S; OGATA, S. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci. *Enterococcus faecalis* K-4. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.65, n.11, p.247–253, 2001.

EIJSINK, V; AXELSSON, L; DIEP, DB; HAVARSTEIN, LS; HOLO, H; NES, IF. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, n.12, p.639-654, 2002.

ESPECHE, MC; OTERO, MC; SESMA, F; NADER-MACIAS, ME. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. **Veterinary Microbiology**, v.135, n.3–4, p.346–357, 2009.

FACKLAM RR. Comparison of several laboratory media for presumptive identification of enterococci and group D streptococci. **Journal of Applied Bacteriology**, v.26, n.2, p.138–145, 1973.

FACKLAM, RR; CARVALHO, MG; TEIXEIRA, LM. *Enterococcus*. In MS, Gilmore; DB, Clewell; P, Courvalin; GM, Dunny; BE, Murray; LB, Rice. The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance, **ASM Press**, p.1-54, 2002.

FIMLAND, G; JOHNSEN, L; DALHUS, B; NISSEN-MEYER, J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. **Journal of Peptide Science**, v.11, n.11, p.688–696, 2005.

FLYTHE, MD; RUSSELL, JB. The effect of pH and a bacteriocin (bovicinHC5) on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. **FEMS Microbiology Ecology**, v.47, n.5, p.215-222, 2004.

FOULQUIÉ, M; CALLEWAERT, R; DEVREESE, B; VAN BEEUMEN, J; VUYST, L. Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. **Journal of Applied Bacteriology**, v.94, n.3, p.214-229, 2003.

GABRIELSEN, C; BREDE, DA; HERNÁNDEZ, PE; NES, IF; DIEP, DB. The Maltose ABC Transporter in *Lactococcus lactis* Facilitates High-Level Sensitivity to the Circular Bacteriocin Garvicin ML. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.6, p.2908–2915, 2012.

GALVEZ, A; LOPEZ, RL; ABRIOUEL, H; VALDIVIA, E; OMAR, NB. Application of bacteriocins in the control of food borne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.28, n.2, p.125-152, 2008.

GATESOUBE, FJ. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.14, n.1-3, p.107-114, 2008.

GELSOMINO, R; VANCANNEYT, M; CONDON, S; SWINGS, J; COGAN, TM. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, n.3, p.177–188, 2001.

GILLOR, O; NIGRO, LM; RILEY, MA. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, n.8, p.1067-1075, 2005.

GILLOR, O; ETZION, A; RILEY, MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, n.4, p.591-606, 2008.

GIRAFFA, G. Funcionalidad de enterococos en productos lácteos **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.3, p.215-222, 2003.

GRANGER, M; VAN REENEN, CA; DICKS, LM. Effect of gastro-intestinal conditions on the growth of *Enterococcus mundtii* ST4SA, and production of bacteriocin ST4SA recorded by real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, n.3, p.277-280, 2008.

GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. **Société de Biologie**, v.12, n.93, p.1040-1041, 1925.

GRAUDAL, H. The classification of motile streptococci within the *Enterococcus* group. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica**, v.41, n.4, p.403-410, 1957.

GUTIERREZ, J; CRIADO, R; CITTI, R; MARTÍN, M; HERRANZ, C; NES, I; CINTAS, L; HERNÁNDEZ, P. Cloning, production, and functional expression of enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, n.12, p.239-250, 2005.

HENG, NCK; WESCOMBE, PA; BURTON, JP; JACK, RW; TAGG, JR. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: RILEY, MA; CHAVAN, MA. Bacteriocins: ecology and evolution. ed.1, Berlín, p.45-83, 2007.

HERRANZ, C; CASAUS, P; MUKHOPADHYAY, S; MARTÍNEZ, JM; RODRÍGUEZ, JM; NES, IF; HERNÁNDEZ, PE; CINTAS, LM. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. **Food Microbiology**, v.18, n.2, p.115-131, 2001.

HILL, C; GUARNER, F; REID, G; GIBSON, GR; MERENSTEIN, DJ; POT, B; MORELLI, L; CANANI, RB; FLINT, HJ; SALMINEN, S; CALDER, PC; SANDERS, ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, n.4, p.506-514, 2014.

HUGAS, M; GARRIGA, M; AYMERICH, MT. Functionality of enterococci in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.2-3, p.223–233, 2003.

ISHIBASHI, N; HIMENO, K; MASUDA, Y; PEREZ, RH; IWATANI, S; ZENDO, T; WILAI PUN, P; LEELAWATCHARAMAS, V; NAKAYAMA, J; SONOMOTO, K. Gene cluster responsible for secretion of and immunity to multiple bacteriocins, the NKR-5-3 enterocins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.21, p.6647-6655, 2014.

JAC, RW; TAGG, JR; RAY, B. Bacteriocin of gram positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v.59, n.14, p.171–200, 1995.

JACKSON, CR; FEDORKA-CRAY, PJ; BARRETT, JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.3558-3565, 2004.

JAVED, I; AHMED, S; MANAM, S; RIAZ, M; AHMAD, B; ALI, MI; HAMEED, A; CHAUDRY, GJ. Production, characterization, and antimicrobial activity of a bacteriocin from newly isolated *Enterococcus faecium* IJ-31. **Journal of Food Protection**, v.73, n.5, p.44–52, 2010.

JAYARAO, BM; PILLAI, SR; SAWANT, AA; WOLFGANG, DR; HEGDE, NV. Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts. **Journal Dairy Science**, v.87, n.10, p.3561-3573, 2004.

JEEVARATNAM, K; JAMUNA, M; BAWA, AS. Biological preservation of foods- Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology**, v.4, n.1, p. 446-454, 2005.

KARTHIKEYAN, V; SANTOSH, SW. Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. **African Journal of Microbiology Research**, v.3, n.5, p.233-239, 2009.

KAWAMOTO, S; SHIMA, J; SATO, R; EGUCHI, T; OHMOMO, S; SHIBATO, J; HORIKOSHI, N; TAKESHITA, K. Biochemical and genetic characterization of mundtacin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFR1 7393. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.12, p.3830–3840, 2002.

KJOS, M; NES, IF; DIEP, DB. Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.10, p.3335-3342, 2011.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastrointestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.2-3, p.123–131, 2003.

KWAADSTENIET, MD; TODOROV, SD; KNOETZE, H; DICKS, LMT. Characterization of a 3944Da bacteriocina, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, n.20, p.433-444, 2005.

LAFARGE, V; OGIER, JC; GIRARD, V; MALADEN, V; LEVEAU, JY; GRUSS, A; DELACROIX-BUCHET, A. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.9, p.5644-5650, 2004.

LEE, HE; KIM, HY. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, n.3, p.229-235, 2011.

LEROY, F; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, n.7, p.155–164, 2002.

LOHANS, CT; VEDERAS, JC. Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n.12, p.1-13, 2012.

MANNU, L; PABA, A; DAGA, E; COMUNIAN, R; ZANETTI, S; DUPRÈ, I; SECHI, LA. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.12, p.291-304, 2003.

MAQUEDA, M; SÁNCHEZ-HIDALGO, M; FERNÁNDEZ, M; MONTALBÁN-LÓPEZ, M; VALDIVIA, E. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology**, v.32, n.3, p.2–22, 2008.

MARTINEZ-MURCIA, AJ; COLLINS, MD. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. **FEMS Microbiology**, v.80, n.1, p.69–74, 1991.

MESQUITA, AJ. Qualidade físico-química e microbiológica do leite cru bubalino. 77f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, GO, Brasil, 2001.

MOGHADDAM, MZ; SATTARI, M; MOBAREZ, AM; DOCTORZADEH, F. Inhibitory effect of yogurt Lactobacilli bacteriocins on growth and verotoxins production of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.9, n.11, p.2112-2116, 2006.

MOLLOY, EM; FIELD, D; O'CONNOR, PM; COTTER, PD; HILL, C; ROSS, RP. Saturation Mutagenesis of Lysine 12 Leads to the Identification of Derivatives of Nisin A with Enhanced Antimicrobial Activity. Ed. Willem van Schaik. **PLoS ONE**, v.8, n.3, p.58-53, 2014.

MULLER, T; ULRICH, A; OTT, EM; MULLER, M. Identification of plant-associated enterococci. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.5, p.268–278, 2001.

MUNDT JO. Enterococci. In Holt, JG; Sneath, PH; Krieg, NR. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.2, n.3, p.1063-1065, 1986.

MURRAY, BE. The Life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, n.1, p. 46-65, 1990.

NES, IF; YOON, SS; DIEP, DB. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food Science and Technology**, v.16, n.5, p.675–690, 2007.

NISHIE, M; NAGAO, J; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. **Biocontrol Science**, v.17, n.1, p.1-16, 2012.

OGUNBANWO, ST; SANNI, AI; ONILUDE, AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. **African Journal of Microbiology Research**, v.2, n.8, p.219-227, 2003.

OLIVEIRA, VM. Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, análises bacteriológicas e sensoriais. 78f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil, 2006.

PARK, S; ITOH, K; FUJISAWA, T. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.4, p.294-300, 2003.

PASCHOALIN, VMF; BELLEI, B; MIGUEL, M; MERE DEL AGUILA, EM; SILVA, JT. Purification of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* and its effectiveness for preservation of fresh-cut lettuce. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v.3, n.5, p.119-125, 2011.

PEREIRA, CS; AMORIM, SD; SANTOS, AFM; SICILIANO, S; MORENO, IB; OTT, PH; RODRIGUES, DP. *Plesiomonas shigelloides* and Aeromonadaceae family pathogens isolated from marine mammals of southern and southeastern brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.749-755, 2008.

PERRY, JA; JONES, MB; PETERSON, SN; CVITKOVITCH, DG; LÉVESQUE, CM. Peptide alarmone signalling triggers an auto-active bacteriocin necessary for genetic competence. **Molecular Microbiology**, v.72, n.4, p.905–917, 2009.

POETA, P; COSTA, D; SÁENZ, Y; KLIBI, N; RUIZ-LARREA, F; RODRIGUES, J; TORRES, C. Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal Enterococci of Wild Animals in Portugal. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.52, p.396-402, 2005.

RAHKILA, R; JOHANSSON, P; SÄDE, E; BJÖRKROTH, J. Identification of enterococci from broiler products and a broiler processing plant and description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.4, p.1193–1203, 2011.

RAJARAM, G; MANIVASAGAN, P; THILAGAVATHI, A. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.2, n.2, p.138-144, 2010.

RICHARD, C; CAÑON, R; NAGHMOUCHI, K; BERTRAND, D; PRÉVOSTA, H; DRIDER, D. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. **Food Microbiology**, v.23, n.13, p.175–183, 2006.

ROCHA-CAMPOS, CC; CÂMARA, IG. Plano de ação nacional para conservação dos mamíferos aquáticos: grandes cetáceos e pinípedes: versão III / ROCHA-CAMPOS, CC; MORENO, IB; ROCHA, JM; JUNIOR, JTP; GROCH, KR. 156f. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, Brasil, 2011.

SAAVEDRA, L; MINAHK, C; DE RUIZ HOLGADO, AP; SESMA, F. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH₂-terminal sequence. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.48, n.5, p.2778–2781, 2004.

SANTESTEVAN, NA. Isolamento e avaliação de *Enterococcus spp.* obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus spp.*) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. 2014. 161f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil, 2014.

SCALLAN, E; HOEKSTRA, RM; ANGULO, FJ; TAUXE, RV; WIDDOWSON, MA; ROY, SL; JONES, JL; GRIFFIN, PM. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging Infectious Diseases journal**, v.17, n.3, p.7–15, 2011.

SETTANNI, L; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, n.2, p. 123-138, 2008.

SHERMAN, JM. The streptococci. **Bacteriological Reviews**, v.1, n.2, p.3–97, 1937.

STEWART, JR; TOWNSEND, FI; LANE, SM; DYAR, E; HOHN, AA; ROWLES, TK; STAGGS, LA; WELLS, RS; BALMER, BC; SCHWACKE, LH. Survey of antibiotic-resistant bacteria isolated from bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the southeastern USA. **Diseases of Aquatic Organisms.**, v.108, n.4, p.91-102, 2014.

SUGITA, H; MATSUO, N; HIROSE, Y; IWATO, M; DEGUCHI, Y. *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.12, p.4986-4989, 1997.

SVEC P, VANCANNEYT M, SEDLÁČEK I, NASER SM, SNAUWAERT C, LEFEBVRE K. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary**, v.56, n.3, p.577–581, 2006.

TAHERI, P; SAMADI, N; EHSANI, MR; KHOSHAYAND, MR; JAMALIFAR, H. An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp lactis* st1 isolated from goat milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.76, p.1452-1462, 2012.

TESSEMA, G. T.; MORETRO, T.; KOHLER, A. Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa

bacteriocin sakacin P. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.22, p.6973-6980, 2009.

THIERCELIN ME, JOUHAUD L. Sur un diplococque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. **Société de Biologie**, v.5, n.4, p.269–271, 1899.

THIERCELIN, ME. Morphologie et modes de reproduction de l'enterocoque. **Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales**, v.11, n.6, p.551–553, 1899.

TOMITA, H; FUJIMOTO, S; TANIMOTO, K; IKE, Y. Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.3, p.7843–7855, 1997.

VALEEVA, JG; MEUWISSEN, MP; LANSINK, AG; HUIRNE, RB. Improving Food Safety Within the Dairy Chain: An Application of Conjoint Analysis. **Journal Dairy Science**, v.88, n.4, p.1601-1612, 2005.

VILLANI, F; SALZANO, G; SORRENTINO, E; PEPE, O; MARINO, P; COPPOLA, S. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v.74, n.4, p.380-387, 1993.

WILSON, GS; RAFTOS, DA; CORRIGAN, SL; NAIR, SV. Diversity and antimicrobial activities of surface-attached marine bacteria from Sydney Harbour, Australia. **Microbiological Research**, v.34, n.2, p.456-461, 2009.

YANG, Y; TAO, WY; LIU, YJ; ZHU, F. Inhibition of *Bacillus cereus* by lactic acid bacteria starter cultures in rice fermentation. **Food Control**, v.19, n.10, p.159-161, 2008.

ZENDO, T; EUNGRUTTANAGORN, N; FUJIOKA, S; TASHIRO, Y; NOMURA, K; SERA, Y; KOBAYASHI, G; NAKAYAMA, J; ISHIZAKI, A; SONOMOTO, K. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.12, p.1181-1190, 2005.