



## Efeito de nisina e pediocina sobre culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de carcaças de frango

Helena Reissig Soares Vitola<sup>1</sup>, Eliezer Ávila Gandra<sup>2</sup>, Ana Paula Guedes Frazzon<sup>3</sup>,  
Guilherme da Silva Dannenberg<sup>1</sup> e Amanda de Souza da Motta<sup>3\*</sup>

Recebido: 12 de maio de 2017

Recebido após revisão: 31 de janeiro de 2018

Aceito: 01 de março de 2018

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3990>

**RESUMO:** (Efeito de nisina e pediocina sobre culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de carcaças de frango). *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno relacionado a doenças veiculadas por alimentos, e linhagens resistentes à antibióticos já tem sido observadas. Encontrar substâncias alternativas ao uso dos mesmos torna-se importante para prevenção da proliferação deste microrganismo. Bacteriocinas são metabólitos produzidos por uma diversidade de gêneros bacterianos, incluindo as bactérias lácticas. Estas substâncias possuem propriedades bioativas, destacando-se a atividade antimicrobiana que vêm sendo testada ao longo dos anos, nas mais diferentes áreas. Este estudo teve por objetivo analisar o efeito das bacteriocinas, nisina (1,25% e 2,5%) e pediocina (1%, 5% e 10%), frente a diferentes isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de carcaças de frango. Foram utilizados sete isolados de *S. aureus*, potencialmente formadores de biofilmes. Avaliou-se a ação antimicrobiana das bacteriocinas frente aos isolados e determinou-se a redução da contagem bacteriana em leite UHT pela adição de nisina. A estabilidade térmica das bacteriocinas em leites UHT desnatado e integral foi avaliada. Em relação ao teste da atividade antimicrobiana somente a nisina apresentou efeito frente aos isolados de *S. aureus*, sendo que o isolado F3-3 não foi sensível a esta substância. Na avaliação das unidades arbitrárias, a nisina apresentou atividade maior que 100 UA/mL para dois isolados de *S. aureus* (F4-1 e F5-1). Na avaliação do efeito das bacteriocinas, a nisina (1,25%) mostrou um efeito bacteriostático sobre o crescimento do *S. aureus* F4-1. Em relação à estabilidade térmica de nisina e pediocina, observa-se uma redução da atividade residual de ambas as substâncias, quando tratadas termicamente, mostrando a interferência do maior teor de gordura (aproximadamente 3%). Os resultados mostraram um maior efeito antimicrobiano da nisina, podendo-se prospectar o emprego desta substância no controle do crescimento de *S. aureus* em produtos cárneos.

**Palavras-chave:** atividade antimicrobiana, carcaças de frango, nisina, pediocina, *Staphylococcus aureus*.

**ABSTRACT:** (A study of the effect of nisin and pediocin on cultures of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken carcasses). *Staphylococcus aureus* is an important pathogen associated with foodborne illnesses. Antibiotic-resistant strains have been discovered, and therefore finding alternative substances to control this pathogen has become important to prevent its proliferation. Bacteriocins are metabolites produced by several bacterial genera, including lactic acid bacteria. These substances have been revealed to have bioactive properties, including antimicrobial ones. We aimed to analyze the effect of the bacteriocins nisin (1.25% and 2.5%) and pediocin (1%, 5% and 10%) on different isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from poultry carcasses. Seven strong biofilm-forming isolates of *S. aureus* were used. We evaluated the antimicrobial activity of these bacteriocins on the isolates and also determined the decrease in bacterial count in whole UHT milk upon nisin addition. Thermal stability of the bacteriocins in skimmed and whole UHT milk was also evaluated. In the antimicrobial activity test, only nisin showed an opposing effect on *S. aureus* isolates, except for the F3-3 isolate, which was not sensitive to this substance. In assessing arbitrary units, nisin showed higher activity than 100 AU mL<sup>-1</sup> for two *S. aureus* isolates (F4-1 and F5-1). In evaluating the effect of bacteriocins, nisin (1.25%) showed a bacteriostatic effect on the growth of *S. aureus* F4-1. Regarding the thermal stability of nisin and pediocin, there was a reduction in the residual activity of both substances when heat-treated, which demonstrated the influence of a higher fat content (approximately 3%). The results revealed that the higher antimicrobial effect of nisin may be worth exploring for use in growth control of *S. aureus* in meat products.

**Keywords:** antimicrobial activity, chicken carcasses, nisin, pediocin, *Staphylococcus aureus*.

### INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é frequentemente encontrado como sendo contaminante de produtos cárneos, e a carne de frango é um produto comumente contaminado pela manipulação inadequada dos produtos. Isto ocorre em função desta bactéria ser uma bactéria comensal em aves e em outros animais domésticos e sabe-se também que aproximadamente 30% da população humana é portadora assintomática deste micro-organismo (Tong *et al.* 2015, Lebreton *et al.* 2014). Baseado em dados de literatura

as contagens de *S. aureus* em carne crua de frango tem estado abaixo de 10<sup>2</sup> unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) (Voidarau *et al.* 2011), embora que concentrações de 10<sup>4</sup> UFC/g têm sido observadas em outro estudo (Al-Dughaym & Altabari 2010). Importante destacar que para carcaças de frangos, não há exigências de limites máximos de contagens para este gênero bacteriano. Porém pensando-se no risco das contaminações cruzadas, trabalhar-se para baixas contagens seria sempre o mais desejado (RDC N° 12 2001).

1. Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Brasil.

2. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Brasil.

3. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite 500, sala 216, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

\*Autor para contato. E-mail: [amanda.motta@ufrgs.br](mailto:amanda.motta@ufrgs.br)

Alguns isolados de *Staphylococcus aureus* produzem exotoxinas, mais conhecidas como enterotoxinas, quando se multiplicam em carnes, laticínios ou outros alimentos. Nos casos típicos, o alimento foi recentemente preparado, mas não adequadamente refrigerado (Schelin et al. 2011; Brooks et al. 2012). Além da importância de ser uma bactéria causadora de intoxicação alimentar, tem-se verificado que muitos isolados de *Staphylococcus* podem carrear genes de resistência a antibióticos, levando a um quadro de infecção mais grave e de difícil tratamento (Kroning et al. 2016, Rodrigues et al. 2017).

*Staphylococcus aureus* é um patógeno também associado à formação a biofilmes, apresentando um perfil de persistência nos processos infecciosos nos quais se estabelece, bem como nos ambientes e superfícies. Biofilmes são comunidades de bactérias imersas em uma matriz exopolissacarídica, incluindo proteínas, DNA e ácidos teicóicos, e estas estruturas uma vez estabelecidas em uma determinada superfície, podem causar recontaminações em outros ambientes e processos, sendo esta uma condição indesejada, quando pensa-se em segurança alimentar e controle de qualidade na indústria de alimentos (Gutiérrez et al. 2014, Siala et al. 2014).

O controle microbiano, estejam as bactérias na forma planctônica ou sésil, é de suma importância, pois sabe-se que a persistência dos microrganismos no ambiente, predispõe a troca de material genético entre as bactérias e a potencial aquisição de genes de resistência. Ainda as estruturas formadas em superfícies de alimentos ou ambiente, podem predispor a agregação de outras bactérias que incrementando este biofilme, por exemplo, podem colaborar na dispersão de células ao longo de um processo de produção, levando a re-contaminação por bactérias deteriorantes e ou patogênicas (Okuda et al. 2013).

Pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de buscar-se alternativas ao emprego de produtos químicos e antibióticos, e as bacteriocinas são objeto de estudo, dada a sua natureza peptídica, apresentando efeitos bacteriostáticos e bactericidas frente a outras bactérias. Estas substâncias apresentam propriedades como estabilidade, baixa toxicidade, tendo-se substâncias com estreito e amplo espectro de ação (Cotter et al. 2013).

A atividade antimicrobiana da nisina está bem descrita sobre bactérias gram-positivas, aumentando a permeabilidade da membrana, pela formação de poros, ocasionando a saída do material intracelular, levando a apoptose da célula (Melo et al. 2005). A pediocina é a segunda bacteriocina mais pesquisada depois da nisina; é sintetizada por *Pediococcus acidilactici* e possui um potencial antimicrobiano importante frente a linhagens de *Listeria* spp., o que torna o seu estudo importante considerando o seu potencial de aplicação em alimentos, principalmente em produtos cárneos (Mello et al. 2010).

Neste sentido este trabalho objetivou verificar o efeito de nisina e pediocina sobre diferentes isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos a partir de carcaças de frango, buscando avaliar um possível controle destas

espécies, considerando que são bactérias presentes em amostras de alimentos de origem animal, mesmo em baixas quantidades.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção e caracterização dos isolados de *Staphylococcus aureus*

Foram utilizados sete isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de carcaças de frango resfriadas e congeladas (Tab. 1), previamente identificados por Pinto et al. (2013). Como controle da atividade das bacteriocinas foi utilizada a cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, pois é uma bactéria que já havia mostrado-se sensível a estas substâncias. Estes isolados foram mantidos congelados em glicerol 20% e reativados em Agar BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, UK). As bacteriocinas usadas foram: nisina (Christian Hansen, USA) nas concentrações de 1,25% e 2,5% e pediocina (ALTA 2345, Kerry, USA) nas concentrações de 1%, 5% e 10%. Todas estas concentrações foram empregadas para os testes feitos em placas de Petri. O preparo e solubilização das bacteriocinas foi feito em solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0, e após foram mantidas em refrigeração, até seu emprego nos testes. As soluções foram preparadas imediatamente antes de serem utilizadas.

### Atividade antimicrobiana das bacteriocinas sobre os isolados de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

A metodologia empregada foi proposta por Motta & Brandelli (2002), padronizando-se as suspensões dos isolados de acordo com a Escala 0.5 de McFarland (aproximadamente  $10^8$  unidades formadoras de colônia por mililitro - UFC/mL). Cada suspensão foi inoculada em placa de Agar BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, UK) com swab estéril e posteriormente nisina (1,25% e 2,5%) e pediocina (1%, 5% e 10%) foram aplicadas na forma de gotas de 10 µL. As placas foram incubadas durante 24 horas à temperatura de 37 °C, sendo observadas para

**Tabela 1.** Características dos isolados de *Staphylococcus aureus* de carcaças de frango.

Código	Formadora de biofilme	Produtora de enterotoxinas	Resistência a antibióticos
F2-3	+	+ (sea) coa	+ (PEN/ TEI <sup>RI</sup> )
F2-4	+	+ (sea) coa	+ (PEN/ TEI <sup>RI</sup> )
F3-3	+	+ (sea) coa	+ (PEN)
F4-1	+	+ (sea/sec/sed) coa	-
F5-1	+	+ (sea) coa	+ (PEN)
F5-2	+	+ coa	+ (PEN/ TEI <sup>RI</sup> )
F5-3	+	+ (sea) coa	+ (PEN)

+, positivo; -, negativo.

Abreviaturas: sea, gene da enterotoxina A; sec, gene da enterotoxina C; sed, gene da enterotoxina D; coa, gene da coagulase; PEN, penicilina; TEI<sup>RI</sup>, teicoplanina.

Segundo Pinto et al. (2013).

verificação da formação de halos de inibição, expressos em milímetros (mm). O experimento foi realizado em triplicata.

#### *Determinação das unidades arbitrárias de nisina e pediocina sobre Staphylococcus aureus e Listeria monocytogenes ATCC 7644*

O teste seguiu a metodologia proposta por Kimura *et al.* (1998). A solução de nisina foi preparada à 1,25 % e diluída sucessivamente em placas de microtitulação com solução salina estéril (0,85 %), sendo as diluições aplicadas na forma de gotas de 10 µL sobre as placas de ágar BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, UK) previamente inoculadas com os isolados de *Staphylococcus aureus* em uma concentração celular aproximada de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Incubou-se por 24 horas à 37 °C para leitura dos resultados. O título designado de unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL) foi definido como sendo a recíproca da última diluição que apresentou halo de inibição (Mayr-Harting *et al.* 1972). Repetiu-se o mesmo procedimento para as placas inoculadas com a cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, porém além da nisina à 1,25%, foi utilizada também pediocina à 1%. As determinações foram realizadas em triplicata.

#### *Efeito da nisina sobre o desenvolvimento de Staphylococcus aureus em leite UHT desnatado*

O teste seguiu a metodologia proposta por Santiago (2009), com adaptações, onde se objetivou avaliar a interferência da matéria-orgânica no efeito da bacteriocina. Em um tubo tipo Falcon estéril com 10 mL de leite UHT desnatado, foram depositados 500 µL do isolado *Staphylococcus aureus* F4-1 padronizado em 10<sup>4</sup> UFC/mL mais 1 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7 (grupo controle). No segundo tubo, com 10 mL de leite UHT desnatado foram depositados 500 µL do mesmo isolado mais 1 mL de nisina (grupo tratado). Este experimento incubado à 37 °C por 33 horas, realizando-se coletas nos tempos de 3, 6, 9, 24, 27, 30 e 33 h. Para a avaliação das unidades formadoras de colônias por mililitro UFC/mL foi empregado o método da microdiluição (Miles & Misra 1938).

#### *Avaliação da estabilidade térmica das bacteriocinas em leite UHT desnatado e integral*

O teste seguiu a metodologia proposta por Motta & Brandelli (2002), com adaptações. Em tubos tipo *ependorf* foram depositados 500 µL de bacteriocina (nisina 1,25%/pediocina 1%) e 500 µL dos leites UHT (desnatado e integral), totalizando em 6 preparados para cada bacteriocina. Ambos os tipos de leite foram empregados, para avaliar o impacto do teor de gordura na atividade das bacteriocinas. As amostras foram submetidas a diferentes temperaturas em banho-seco, sendo estas 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C, por 30 minutos, e em autoclave, à 121 °C, por 15 minutos. Como controle, foram empregadas

as bacteriocinas sem tratamento térmico. Após o aquecimento as amostras foram, imediatamente, resfriadas em banho de gelo e os preparados contendo bacteriocinas foram aplicados em forma de gotas de 10 µL sobre placas de TSA (Trypticase Soja Agar, Himedia) previamente inoculadas com *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (10<sup>8</sup> UFC/ml). As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas e a verificação do diâmetro dos halos de inibição foi realizada. O experimento foi feito em triplicata e os resultados expresso em atividade residual (AR %).

#### *Análise Estatística*

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ), com o auxílio do *software* STATISTICA versão 6.1 (StatSoft, França).

## RESULTADOS

#### *Avaliação da atividade antimicrobiana das bacteriocinas sobre Staphylococcus aureus e Listeria monocytogenes ATCC 7644*

Nesta avaliação pode-se observar que em seis dos sete isolados estudados, com as diferentes concentrações de nisina (1,25% e 2,5%), observaram-se halos de inibição que variaram de 3,17 mm e 9,67 mm. O isolado F3-3 não mostrou-se sensível às concentrações de nisina testadas. Em relação à aplicação da pediocina (1%, 5% e 10%), em nenhuma das concentrações foi observada atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Staphylococcus aureus* testados (Tab. 2). Importante ressaltar que as linhagens estudadas possuem resistência a alguns antibióticos como penicilina (Tab. 1) (Pinto *et al.* 2013). As duas concentrações de nisina testadas não demonstraram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) nos halos de inibição formados, exceto para o isolado F2-3 onde a concentração de 2,5% de nisina conferiu halo de inibição significativamente maior ( $p < 0,05$ ). Quando comparados os halos de inibição entre os isolados, verificou-se que não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre eles, exceto o isolado F4-1 que quando submetido a menor concentração de nisina expressou halo estatisticamente inferior aos demais nesta mesma concentração. Quanto aos resultados dos halos de inibição evidenciados para a *L. monocytogenes* ATCC 7644, observou-se que com ambas as bacteriocinas testadas, a cultura mostrou-se sensível. Observou-se que com o aumento das concentrações de ambas as substâncias, teve-se um aumento das medidas dos halos, tendo-se para a nisina, nas concentrações de 1,25% e 2,5%, as medidas de 13,33 e 15,00 mm, respectivamente. Para a pediocina, nas concentrações de 1%, 5% e 10%, observou-se aumento nas medidas dos halos que foram de 17,00 19,0 e 20,67 mm respectivamente.

Determinação das unidades arbitrárias das bacteriocinas sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes* ATCC 7644

A partir da sensibilidade apresentada pelos isolados de *S. aureus* ao teste descrito no item anterior, foram

**Tabela 2.** Diâmetros dos halos de inibição formados por diferentes concentrações de nisina e pediocina sobre isolados de *Staphylococcus aureus*.

Isolado	Halo de inibição (mm)				
	Nisina (1,25%)	Nisina (2,5%)	Pediocina (1%)	Pediocina (5%)	Pediocina (10%)
F2-3	6,50 ± 2,26 aA	9,67 ± 0,52 bA	ND	ND	ND
F2-4	9,33 ± 0,52 aA	9,00 ± 0,63 aA	ND	ND	ND
F3-3	ND	ND	ND	ND	ND
F4-1	3,17 ± 2,56 aB	8,50 ± 1,38 bA	ND	ND	ND
F5-1	8,00 ± 1,10 aA	9,00 ± 1,10 bA	ND	ND	ND
F5-2	7,33 ± 1,37 aA	8,83 ± 1,17 bA	ND	ND	ND
F5-3	7,17 ± 2,48 aA	8,00 ± 1,67 bA	ND	ND	ND

Resultados expressos em médias ± o desvio padrão; letras minúsculas diferentes na coluna, e maiúsculas diferentes na linha, representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias pelo teste de Tukey. ND, não detectado.

selecionados seis isolados e optou-se por trabalhar com a nisina. O isolado F3-3 foi excluído das análises, pois não se mostrou sensível as bacteriocinas testadas. Com exceção dos isolados F4-1 e F5-1, os demais apresentaram sensibilidades iguais, com valor de 100 UA/mL. A nisina apresentou atividade média de 233 UA/mL sobre o isolado F4-1 e de 133 UA/mL sobre o isolado F5-1. Estes resultados de unidades arbitrarias maior sugerem uma maior sensibilidade à esta bacteriocina, nas condições estudadas.

#### Avaliação do desenvolvimento de *S. aureus* em leite UHT desnatado tratado com nisina

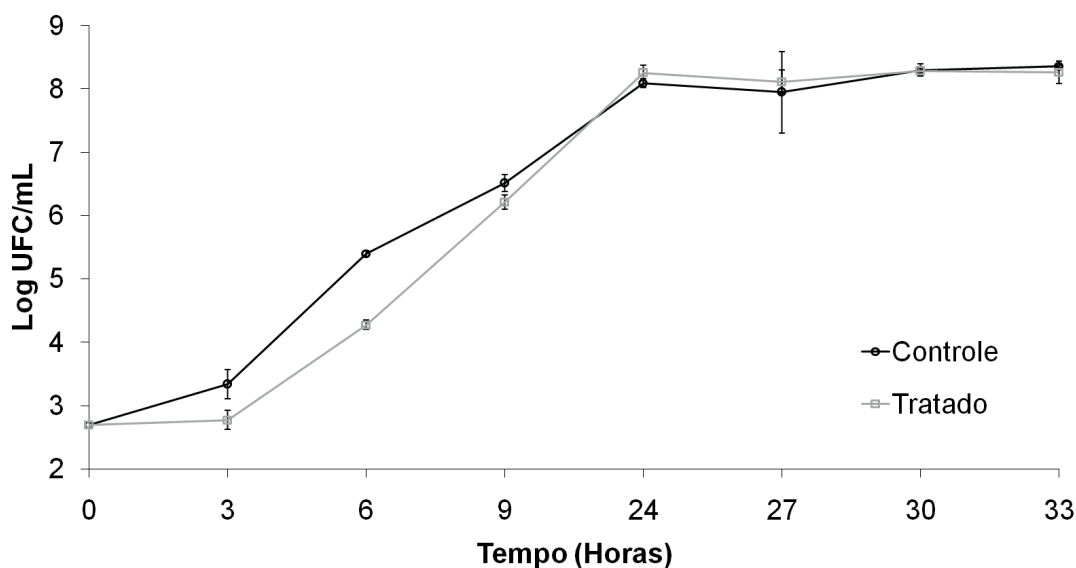
Para este teste foi selecionado *Staphylococcus aureus* F4-1, pois no teste das unidades arbitrarias, foi o isolado contra o qual foi observada a maior quantidade de unidades arbitrarias por mililitro. Pode-se observar a curva de crescimento do *Staphylococcus aureus* F4-1 com e sem a adição de nisina (1,25%) por um período de 33 horas (Fig. 1). Nota-se que antes de 24 horas, o crescimento do grupo tratado permaneceu menor que o crescimento do grupo controle, e após esse tempo o crescimento do isolado, nas duas condições foram semelhantes, revelando que a

adição da nisina causou um efeito bacteriostático e não bactericida. A partir da análise estatística pode-se afirmar que apenas nos tempos 3, 6 e 9 horas houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre a curva de crescimento do controle e do tratado, nos demais tempos não há diferença significativa ao avaliar os tratamentos. O número de células viáveis de *S. aureus* F4-1, no tratamento controle e tratado (com adição de nisina) partiu do valor de 2,69 log UFC/mL, alcançando valores finais 8,36 log UFC/mL e 8,27 log UFC/mL respectivamente, às 33 horas de acompanhamento.

#### Avaliação da estabilidade térmica das bacteriocinas em leite UHT integral e desnatado

Os resultados para avaliação da estabilidade térmica da nisina e pediocina foram representados na forma de atividade residual (AR %). A 25 °C tem-se as duas bacteriocinas representando 100% de atividade, onde não houve a exposição destas substâncias em nenhuma das suas concentrações, a nenhum tratamento em diferentes temperaturas.

Nota-se que, com o aumento gradual da temperatura, há uma redução na atividade residual de nisina, quando



**Figura 1.** Avaliação do efeito da nisina (1,25%) sobre a cultura de *Staphylococcus aureus* F4-1 em leite UHT desnatado. Os resultados estão expressos em Log UFC/ml.

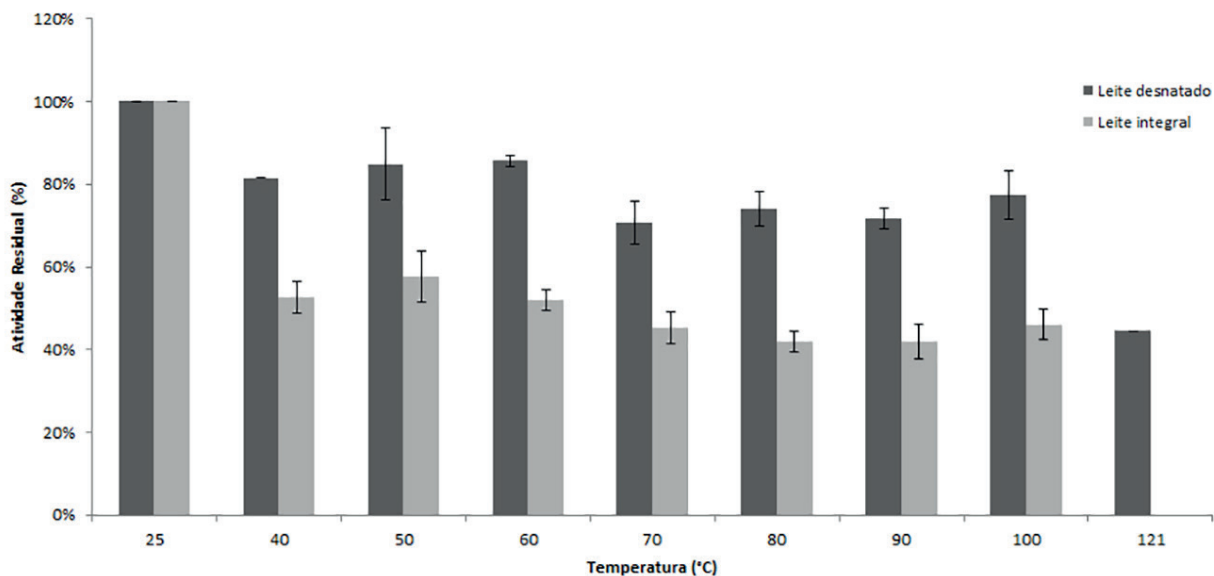


Figura 2. Atividade residual de nisina em leite desnatado e integral submetidos a diferentes intensidades de tratamento térmico.

comparada ao controle, tanto no leite desnatado quanto no leite integral, porém esta atividade foi significativamente ( $p \leq 0,05$ ) maior no leite desnatado em todas as temperaturas testadas, revelando que a concentração de gordura presente no meio influencia, de forma negativa, na atividade residual do peptídeo antimicrobiano (Fig. 2). Quando o tratamento térmico foi feito a 121 °C, a nisina manteve a sua atividade residual apenas no leite desnatado.

Em relação à atividade residual da pediocina, conclui-se que, com o aumento gradual da temperatura, há uma queda de atividade quando comparada ao controle, sendo que esta também manteve sua atividade residual significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superior no leite desnatado

em todas as temperaturas avaliadas, quando comparado ao leite integral e que não houve atividade da pediocina, em ambos os leites, na temperatura de 121 °C (Fig. 3).

## DISCUSSÃO

A contaminação de carcaças de frango tem importantes implicações para a segurança e inocuidade alimentar e na vida de prateleira do produto (Capita *et al.* 2001). A carne de frango (com elevado teor protéico) tem sido implicada em vários casos de intoxicação alimentar, inclusive por *Staphylococcus aureus* (Zhao *et al.* 2017). Também, abordagens sobre a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* em carne de frango, como veiculadoras de genes de resistência, tem preocupado

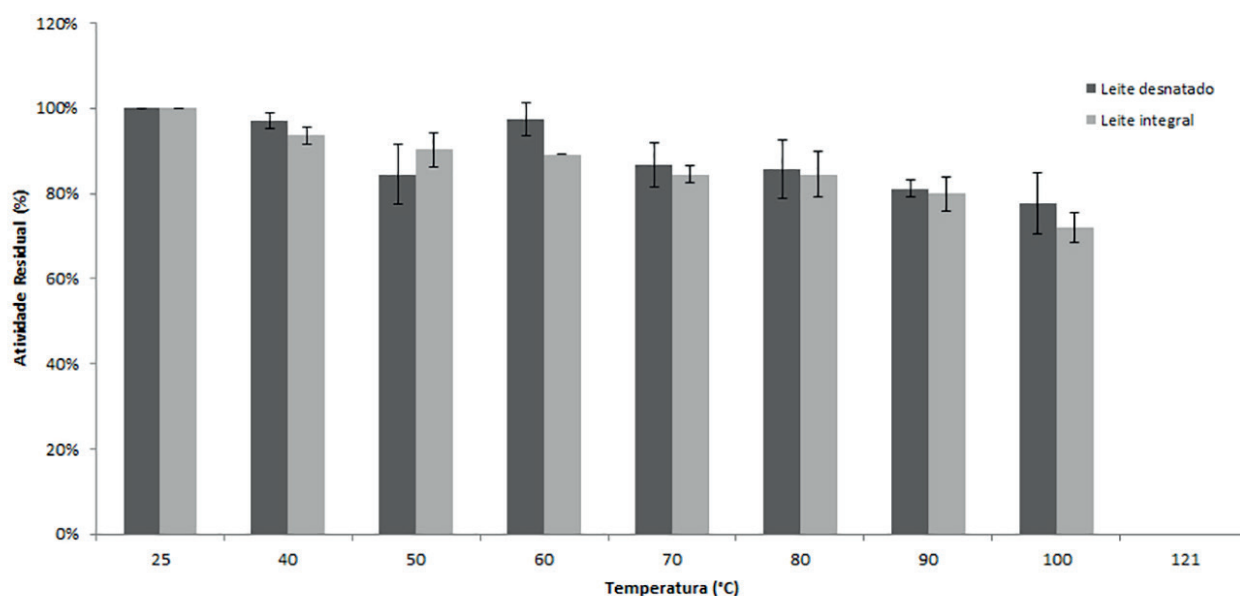


Figura 3. Atividade residual de pediocina em leite desnatado e integral submetidos a diferentes intensidades de tratamento térmico.

a comunidade científica (Bortolaia *et al.* 2015, Osman *et al.* 2016). Neste sentido, a associação de compostos antimicrobianos naturais juntamente com os métodos de preservação convencionais vem sendo explorados na inibição do crescimento de patógenos alimentares (Pattanayaiying *et al.* 2015).

Em estudo realizado por Nascimento *et al.* (2008) que testou a atividade antimicrobiana de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 e de nisina (produzida pela bactéria) sobre patógenos gram-positivos, foi observado que 100% dos isolados indicadores avaliados apresentaram sensibilidade à nisina, diferente deste estudo onde tivemos 1 isolado (F3-3) que não mostrou-se sensível aos compostos estudados. Na pesquisa de Okuda *et al.* (2013) observaram que nisina A apresentou uma alta atividade bactericida frente a células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus*; já a bacteriocina lacticina Q também foi efetiva frente a esta espécie bacteriana, mas em proporção inferior a nisin A. Zhao e colaboradores (2017), trabalharam com nisina associada com ácido cítrico, obtendo resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, com inibição de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

As medidas dos halos de inibição, formados pelas diferentes concentrações de nisina e pediocina sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, mostram serem bacteriocinas eficazes contra esta bactéria. Ressalta-se ainda que à medida que se aumenta as concentrações dos peptídeos antimicrobianos, maiores são os diâmetros dos halos formados, e que a pediocina apresentou melhores resultados frente a esta bactéria, fato este confirmado por Kaur *et al.* (2013), que demonstra a eficácia da pediocina frente a *L. monocytogenes*, quando comparada a nisina. Ressalta-se ainda que a bacteriocina pediocina, pertencente à classe II de peptídeos antimicrobianos, e possui uma alta atividade anti-listerial, o que a torna um peptídeo de grande interesse. A cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi empregada neste trabalho, pois trata-se de uma bactéria sensível a ambas as bacteriocinas estudadas, tendo sido usada como controle do efeito antimicrobiano positivo de nisina e pediocina.

Nascimento *et al.* (2008) realizaram o estudo das unidades arbitrarias por mililitro, onde observaram a atividade da nisina de 150 a 200 UA/mL sobre *Staphylococcus aureus*, enquanto o presente trabalho apresentou uma faixa maior de atividade, entre 100 e 233 UA/mL. Quando nisina e pediocina foram avaliadas sobre a cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, pode-se observar que esta apresentou maior sensibilidade se comparada aos isolados de *Staphylococcus* testados.

Neto (2007) avaliou a redução do número de unidades formadoras de colônias da bactéria *Listeria monocytogenes* com e sem a adição de pediocina 1% durante 30 dias, onde obteve que no tempo 1 (4 horas) a contagem de células foi de aproximadamente  $2,1 \times 10^6$  UFC/mL sem adição da bacteriocina e  $2,9 \times 10^3$  UFC/mL com a presença da substância, observando-se uma redução parcial do microrganismo. Estes resultados vão ao encontro do que

podemos observar, mostrando o efeito bacteriostático destes compostos, frente às bactérias estudadas, pois não foi possível observar redução ou eliminação no desenvolvimento do *S. aureus* avaliado (Fig 1.); nem todas as células microbianas foram eliminadas. Segundo Sobrino-López *et al.* (2008) a atividade da bacteriocina nisina é dependente do conteúdo de gordura presente no leite, sendo que a interação entre os lipídios do leite e a nisina pode limitar a aplicação deste peptídeo antimicrobiano em produtos lácteos gordurosos. Estudos comprovam que a nisina permanece estável após o aquecimento a 121°C, em condições ácidas. Hurst (1981) relata que não ocorre perda da atividade da bacteriocina após 15 minutos na temperatura de 121 °C a pH 2, mas que a medida que o pH aumenta a perda começa a ser evidenciada. Em pH 5, ocorre uma perda de 40% da atividade e em pH 6,8 a perda é de 90%. A queda de atividade da nisina com aumento da temperatura pode ter sido influenciada pelo pH do meio onde a bacteriocina se encontrava, neste caso 7.0. Em relação à atividade residual da pediocina, conclui-se a partir da figura 1C que com o aumento gradual da temperatura há, uma queda de atividade quando comparada ao controle, sendo que esta também manteve sua atividade residual significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superior no leite desnatado em todas as temperaturas avaliadas. Quando comparadas as duas bacteriocinas, nota-se que até a temperatura de 90 °C a pediocina é termicamente mais estável que a nisina, tanto no leite integral como no leite desnatado, porém a partir dos 100 °C a nisina, em leite desnatado, passa a apresentar uma maior atividade residual.

Considerando os fatores que têm interferência na eficácia das bacteriocinas, vários estudos hoje têm sido feitos no sentido de elucidar questões, principalmente quanto a estrutura e estabilidade destas substâncias levando-se em consideração também a necessidade dos tratamentos físico-químicos combinados (teoria dos obtáculos), no sentido de assegurar a redução da carga microbiana presente, seja de bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus*) como de bactérias deteriorantes (Alvarez-Sieiro *et al.* 2016, Zhao *et al.* 2017).

Esta pesquisa permitiu avaliar que das duas bacteriocinas testadas apenas a nisina, em suas diferentes concentrações, apresentou atividade antimicrobiana contra seis dos sete isolados de *Staphylococcus aureus* estudados. Devido às características singulares das bacteriocinas, como, por exemplo, seu espectro antimicrobiano estas têm-se tornado atrativas à indústria alimentícia, como bioconservantes de alimentos, e também à indústria farmacêutica, como uma alternativa aos antibióticos de uso médico (devido à ação antimicrobiana em sítios-alvo específicos, o que as distingue dos antibióticos comumente usados). Consequentemente, tais aplicações acarretam grandes investimentos na área de pesquisa em busca de isolados que sejam potencialmente produtores e também por novas bacteriocinas, que tenham aplicação biotecnológica em diversas áreas.

## CONCLUSÕES

Frente ao exposto, foi possível concluir que a nisina promoveu uma redução no número de células viáveis dos isolados de *Staphylococcus aureus*, o que não pode ser observado para pediocina. Através destes resultados pode-se inferir uma possível aplicação da nisina em carcaças de frango, juntamente com outros métodos de conservação, visando o controle deste patógeno nestes produtos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Amanda de Souza Motta, pela recepção e auxílio durante todo projeto, e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo suporte dado à pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- AL-DUGHAYM, A.M. & ALTABARI, G.F. 2010. Safety and quality of some chicken meat products in Al-Ahsa markets-Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Science*, 17:37-42
- ALVAREZ-SIEIRO, P., MONTALBÁN-LÓPEZ, M., MU, D. & KUIPERS, O. P. 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 2939–2951, DOI 10.1007/s00253-016-7343-9.
- BORTOLAIA, V., ESPINOSA-GONGORA, C. & GUARDABASSI, L. 2015. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22: 130–140
- BROOKS, G.F., CARROLL, K.C., BUTEL, J.S., MORSE, S.A. & MIETZNER, T.A. 2012. *Microbiologia Médica de Jawerz, Melnick e Adelberg*. 25nd ed. Porto Alegre: AMGH Editora LTDA. 813 p.
- CAPITA, R., CALLEJA, A.C., FERNÁNDEZ, G.M.D. & MORENO, B. 2001. Microbiological quality of retail poultry carcasses in Spain. *Journal of Food Protection*, 64(12): 1961-1966.
- COTTER, P.D., ROSS, R.P. & HILL, C. 2013. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11: 95–105.
- GUTIÉRREZ, D., DELGADO, S., VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D., MARTÍNEZ, B., CABO, M.L., RODRÍGUEZ, A., HERRERA, J.J. & GARCÍA, P. 2014. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11): 6385–6397.
- HURTS, A. 1981. Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, 27: 85-123.
- KAUR, G., SINGH, T.P. & MALIK, R.K. 2013. Antibacterial efficacy of Nisin, Pediocin 34 and Enterocin FH99 against *Listeria monocytogenes* and cross resistance of its bacteriocin resistant variants to common food preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1): 63-71.
- KIMURA, H., SASHIHARA, T., MATSUSAKI, H., SONOMOTO, K. & ISHKAZI, A. 1998. Novel bacteriocin of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. *Annals of New York Academy of Science*, 864: 345-348.
- KRONING, I.S., IGLESIAS, M.A., SEHN, C.P., GANDRA, T.K.V., MATA, M.M. & SILVA, W.P. 2016. *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. *Food Microbiology*, 58: 105-111.
- LEBRETON, F., WILLEMS, R.J. & GILMORE, M.S. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: Gilmore MS, editor. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p. 3–44.
- MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, C.W. 1972. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W. (Ed.). *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press Inc. p. 315–422.
- MELLO, M.B., SILVA, G.P.F., SANT'ANNA, V., JANTZEN, M.M. & MOTTA, A.S. 2010. Avaliação da inativação térmica da pediocina *in vitro* e no alimento. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19, 2010, Pelotas, RS. Anais... Pelotas: UFPEL 1 CD-ROM
- MELO, N.R., SOARES, N.F.F. & GONÇALVES, M.P.J.C. 2005. Nisina: um conservante natural para alimentos. *Revista Ceres*, 52(303): 921-938.
- MILES, A.A. & MISRA, S.S. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 45: 57-65.
- MOTTA, A.S. & BRANDELLI, A. 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 63-71.
- NASCIMENTO, M.S., FINATTI, D.P., MORENO, I. & KUAYE, A.I. 2008. Atividade antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 produtor de nisina sobre patógenos Gram-positivos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11(4): 322-328.
- NETO, H.P. 2007. *Utilização de pediocina em produto cárneo tipo linguiça frescal toscana para controle de Listeria monocytogenes*. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- OKUDA, K., ZENDO, T., SUGIMOTO, S., IWASE, T., TAJIMA, A., YAMADA, S., SONOMOTO, K. & MIZUNOEA, Y. 2013. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11): 5572–5579
- OSMAN, K., BADR, J., AL-MAARY, K., MOUSSA, I.M.I., HESSAIN, A.M., GIRAH, Z.M.S.A., ABO-SHAMA, U.H., ORABI, A. & SAAD, A. 2016. Prevalence of the antibiotic resistance genes in coagulase-positive and negative-*Staphylococcus* in chicken meat retailed to consumers. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1846, DOI: 10.3389/fmicb.2016.01846.
- PATTANAYAIYING, R., KITTIKUN A.H. & CUTTER, C.N. 2015. Incorporation of nisin Z and lauric arginate into pullulan films to inhibit foodborne pathogens associated with fresh and ready-to-eat muscle foods. *International Journal of Food Microbiology*, 207(17): 77–82.
- PINTO, J.B. 2013. *Expressão e caracterização do polimorfismo genético do sistema quorum sensing agr; suscetibilidade aos antimicrobianos e fatores de virulência em isolado clínicos e alimentares de Staphylococcus aureus*. 137f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- RDC, 12, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA DE COLEGIADO Nº 12, de 2 de janeiro de 2001, Agência Nacional da Vigilância Sanitária.
- RODRIGUES, M.X., SILVA, N.C.C., TREVILIN, J.H., CRUZADO, M.M.B., MUI, T.S., DUARTE, F.R.S., CASTILLO, C.J.C., CANNIATTI-BRAZACA, S.G. & PORTO, E. 2017. Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*, 100: 1-9.
- SANTIAGO, L.B., CHAPAVAL, L., ALVES, F.S.S., BRITO, I.F., SOUZA F.G.C. & PINHEIRO, R.R. 2009. Determinação da curva de crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: 46º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2009, Maringá: UEM.
- SCHELIN, J., WALLIN-CARLQUIST, N., COHN, M.T., LINDQVIST, R., BARKER, G.C. & RADSTROM, P. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2(6): 580-592.
- SIALA, W., MINGEOT-LECLERCQ, M.P., TULKENS, P.M., HALLIN, M., DENIS, O. & BAMBEKEA, F.V. 2014. Comparison of the antibiotic activities of daptomycin, vancomycin, and the investigational fluoroquinolone delafloxacin against biofilms from *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11): 6385–6397.
- SOBRINO-LÓPEZ, A.S. & BELLOSO, O.M. 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18: 329-343.
- TONG, S.Y., DAVIS, J.S., EICHENBERGER, E., HOLLAND, T.L. & FOWLER, V.G. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28: 603–661.
- VOIDAROU, C., VASSOS, D., ROZOS, G., ALEXOPOULOS, A., PLESSAS, S., TSINAS, A., SKOUFOU, M., STAVROPOULOU, E. & BEZIRTZOGLU, E. 2011. Microbial challenges of poultry meat production. *Anaerobe*, 17:341–343.
- ZHAO, X., ZHEN, Z., WANG, X. & GUO, N. 2017. Synergy of a combination of nisin and citric acid against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Additives & Contaminants*, 34(12): 2058-2068.