

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BACTERIOCINA
CEREÍNA 8A, PRODUZIDA POR UMA LINHAGEM DE *Bacillus cereus*

DELMAR BIZANI

PORTO ALEGRE – RS
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA BACTERIOCINA
CEREÍNA 8A, PRODUZIDA POR UMA LINHAGEM DE *Bacillus cereus*

Autor: DELMAR BIZANI

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Adriano Brandelli
Instituto de Ciências e Tecnologia dos Alimentos - ICTA/UFRGS

PORTO ALEGRE - RS
2004

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela força de vontade, coragem e tranqüilidade em seguir à frente nos momentos que os problemas não mais pareciam ter solução.

Em especial ao meu orientador Adriano Brandelli, que confiante sempre me orientou e sabe ser um grande amigo.

À coordenação, professores e funcionários do PPGCVET, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo uso dos laboratórios e seus equipamentos.

À Florência e Juliana pela disponibilidade e ajuda dedicada no início deste projeto e à Ana Paula, que com muita responsabilidade se dedicou voluntariamente na finalização dos trabalhos.

A todos os colegas do laboratório pela amizade e espírito de equipe.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram na realização dos trabalhos e nas minhas decisões.

À Jaqueline, pela compreensão, incentivo e paciência dedicados ao longo desse tempo.

Ao CNPq pela ajuda financeira.

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério.

Esse é a fonte de toda a arte e das ciências verdadeiras.”

Albert Einstein

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS _____	9
LISTA DE TABELAS _____	11
RESUMO _____	12
ABSTRACT _____	14
1 INTRODUÇÃO _____	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	19
2.1 Definição _____	19
2.2 Classificação _____	20
2.3 Origem e Descoberta das Bacteriocinas _____	21
2.4 Uso das Bacteriocinas na Biopreservação de Alimentos _____	24
2.5 Biossíntese e Mecanismo de Ação das Bacteriocinas _____	29
2.5.1 Biossíntese _____	29
2.5.2 Mecanismo _____	31
2.6 Isolamento e Purificação das Bacteriocinas _____	35
2.7 Bacteriocinas Produzidas por Espécies de Bacillus _____	38
2.7.1 <i>Bacillus cereus</i> _____	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	42
4.1 ARTIGO 1 _____	44
4.1.1 Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated Bacillus sp. Strain 8A. _____	44
4.1.2 Abstract _____	44

4.1.3 Introduction	45
4.1.4 Materials and methods	46
4.1.4.1 Reagents and media	46
4.1.4.2 Bacterial cultures	47
4.1.4.3 Isolation of microorganisms	48
4.1.4.4 Bacterial identification	49
4.1.4.5 Preparation of crude bacteriocin	49
4.1.4.6 Bacteriocin activity assay	49
4.1.4.7 Growth determination	50
4.1.4.8 Effects of proteolytic enzymes, heat and pH on antimicrobial activity	50
4.1.5 Results	51
4.1.5.1 Isolation and identification of bacteriocin-producing strain	51
4.1.5.2 Bacteriocin production	51
4.1.5.3 Inhibitory spectrum of bacteriocin	52
4.1.5.4 Effect of enzymes, heat and pH on antimicrobial activity	54
4.1.6 Discussion	58
4.1.7 Resumo	61
4.1.8 References	62
4.2 ARTIGO 2	65
4.2.1 Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by <i>Bacillus cereus</i> 8A.	65
4.2.2 Abstract	65
4.2.3 Introduction	66
4.2.4 Materials and methods	67
4.2.4.1 Bacterial strains	67
4.2.4.2 Bacteriocin	68
4.2.4.3 Bacteriocin activity assay	68
4.2.4.4 Growth determination	68
4.2.4.5 Effect and mode of action against indicator organisms	69
4.2.4.6 Inhibition of <i>B. cereus</i> spores	69

4.2.4.7 Hemolysis and hemmagglutination	70
4.2.4.8 Hydrolytic activities	71
4.2.4.9 Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy	71
4.2.5 Results	71
4.2.5.1 Effect on <i>Listeria monocytogenes</i>	72
4.2.5.2 Effect on <i>Bacillus cereus</i>	74
4.2.5.3 Effect on Gram-negative bacteria	78
4.2.5.4 Hemolysis, hemagglutination and hydrolytic activities	78
4.2.5.5 Infrared spectroscopy	78
4.2.6 Discussion	80
4.2.7 Resumo	83
4.2.8 References	83
4.3 ARTIGO 3	87
4.3.1 Purification and partial chemical characterization of cerein 8A, a bacteriocin produced by a soil isolate of <i>Bacillus cereus</i> 8A.	87
4.3.2 Abstract	87
4.3.3 Introduction	87
4.3.4 Materials and methods	89
4.3.4.1 Bacteria	89
4.3.4.2 Detection of antimicrobial activity	89
4.3.4.3 Purification protocol	89
4.3.4.4 Gel permeation chromatography	90
4.3.4.5 Direct detection on gels	90
4.3.4.6 Effects of enzymes, heat, pH and chemicals on bacteriocin activity	91
4.3.4.7 Physical methods	91
4.3.5 Results	91
4.3.6 Discussion	97
4.3.7 Resumo	99
4.3.8 References	100

4	DISCUSSÃO GERAL	103
5	CONCLUSÕES	111
6	PERSPECTIVAS	113
7	BIBLIOGRAFIA	114
	ANEXO 1	122
	ANEXO 2	123
	ANEXO 3	124

LISTA DE FIGURAS

	Página
2 Revisão Bibliográfica	
Figura 1. Mecanismo geral de formação do tioéter durante a maturação dos lantibióticos padrão. _____	26
Figura 2. Representação esquemática da estrutura de um modelo de mecanismo de ação de bacteriocinas da Classe IIa e suposta localização de seus domínios de interação com os receptores de membrana celular. _____	33
4.1 Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated <i>Bacillus</i> sp. Strain 8A.	
Figure 1. Production of antimicrobial activity during growth of <i>Bacillus cereus</i> 8A in TSB-modified medium. _____	54
Figure 2. Viable cell counts and pH values during growth of <i>Bacillus cereus</i> 8A in BHI broth. _____	54
Figure 3. Thermal stability of the bacteriocin. _____	57
Figure 4. Effect of pH on the bacteriocin activity. _____	58

4.2 Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus* 8A.

Figure 1. Effect of cerein 8A concentration on survival of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Bacillus cereus</i> . _____	72
Figure 2. Effect of cerein 8 on the growth of <i>Listeria monocytogenes</i> . _____	73
Figure 3. Effect of cerein 8 on the growth of <i>Bacillus cereus</i> . _____	75
Figure 4. Sporecidal effect of cerein 8A. _____	76
Figure 5. Effect of cerein 8A on gram-negative bacteria. _____	77
Figure 6. FTIR spectrum of treated and control cells of <i>Listeria monocytogenes</i> . _____	80

4.3 Purification and partial chemical characterization of cerein 8A, a bacteriocin produced by a soil isolate of *Bacillus cereus* 8A.

Figure 1. Purification of cerein 8A by ion exchange chromatography on Q-Sepharose. _____	94
Figure 2. SDS-PAGE and activity of cerein 8A. _____	94
Figure 3. Gel filtration chromatography analysis of cerein 8A. _____	95
Figure 4. UV absorption spectrum of cerein 8A. _____	95
Figure 5. FTIR spectrum of cerein 8A. _____	96

LISTA DE TABELAS

	Página
2 Revisão Bibliográfica	
Tabela 1. Características das principais colicinas. _____	23
4.1 Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated <i>Bacillus</i> sp. Strain 8A.	
Table 1. Antimicrobial activity spectrum of bacteriocin. _____	47
Table 2. Effect of enzymes on bacteriocin activity. _____	55
Table 3. Thermal stability of bacteriocin on different conditions. _____	55
Table 4. Effect of chemicals on bacteriocin activity. _____	57
4.2 Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by <i>Bacillus cereus</i> 8A.	
Table 1. FTIR absorption bands of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Bacillus cereus</i> . _____	80
4.3 Purification and partial chemical characterization of cerein 8A, a bacteriocin produced by a soil isolate of <i>Bacillus cereus</i> 8A.	
Table 1. Purification of cerein 8A. _____	94
Table 2. Properties of the purified cerein 8A. _____	97

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BACTERIOCINA CERÉINA 8A, PRODUZIDA POR UMA LINHAGEM DE *Bacillus cereus*

Autor: Delmar Bizani

Orientador: Prof. Adriano Brandelli

RESUMO

Foi estudada uma bacteriocina produzida por uma linhagem de *B. cereus* 8A, isolado de solo da região Sul do Brasil. Na primeira etapa de estudo determinaram-se as condições básicas de produção de bacteriocina com amplo espectro de ação denominada de Cereína 8A. Observou-se que durante a fase estacionária ocorre o máximo da sua produção, iniciando sua síntese no final da fase exponencial. As condições de maior produção foram a 30° C, agitação e contínua e numa faixa de pH de 7,0-8,5. A bacteriocina bruta inibiu várias bactérias indicadoras, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus*. O teste de termoestabilidade mostrou a perda de atividade quando submetida a uma temperatura a partir de 87° C. Verificou-se a resistência da bacteriocina bruta frente à tripsina e papaína, mas não frente à proteinase K e pronase E. *B. cereus* e *L. monocytogenes* foram utilizadas como bactérias indicadoras para a determinação do modo de ação, após a determinação da dose bactericida de 200 UA mL⁻¹ e 400 UA mL⁻¹ respectivamente. A Cereína 8A demonstrou uma ação inibidora em culturas de *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis, quando tratadas com EDTA. A atividade esporicida foi observada contra esporos de *B. cereus* após tratamento com 400 UA ml⁻¹. A análise da biomassa de *L. monocytogenes* e *B. cereus* após tratamento com a Cereína 8A, através da espectrofotometria de infravermelho determinou alteração no perfil, correspondente à fração dos ácidos graxos da membrana celular bacteriana. A substância peptídica foi separada por meio da precipitação com sulfato de amônio, extração com 1-butanol e aplicação em coluna de cromatografia por troca iônica tipo Q-Sepharose. A Cereína 8A purificada mostrou maior sensibilidade a proteases e ao calor e um peso molecular de aproximadamente 26 kDa. O espectro ultravioleta foi típico de um polipeptídeo e o espectro de infravermelho indica presença de grupamentos NH, acil e ligações peptídicas na sua estrutura. Uma hipótese do mecanismo de ação seria a desestruturação da membrana celular pela abertura de poros.

1/ Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, março, 2004. (141p).

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE BACTERIOCIN CEREIN 8A PRODUCED BY A STRAIN OF *Bacillus cereus*

Author: Delmar Bizani

Advisor: Prof. Adriano Brandelli

ABSTRACT

A bacteriocin produced by a strain of *B. cereus* 8A, isolated from soil of South of Brazil, has been studied. At the first phase of the study, the basic conditions for producing Cerein 8A – which is a bacteriocin with a wide range of action - have been established. It has been observed that the maximum of its production occurs during the stationary-phase, beginning its synthesis at the late exponential phase. It has reached its maximum of production under the following conditions: 30° C, continuous agitation and aeration, pH 7.0-8.5. The raw bacteriocin inhibited standard indicator bacteria such as: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus*. The thermostability test has shown the loss of activity at 87° C or higher. It has been verified that raw bacteriocin is resistant to trypsin and papain but not to proteinase K and pronase E. *B. cereus* and *L. monocytogenes* have been used to determine the mode of action after setting the bactericidal dose of 200 AU mL⁻¹ and 400 AU mL⁻¹ respectively. The Cerein 8A developed an inhibitory action against cultures of *Escherichia coli* and *S. Enteridis* when treated with EDTA. The sporicidal activity against *B. cereus* was observed after treated with 400 AU mL⁻¹. The analysis of the cultures of *L. monocytogenes* and *B. cereus* after being treated with Cerein 8A, using infrared spectrophotometry, established a change in its profile that corresponds to a fraction of the fatty acids of the bacterial biomass. The peptide substance was separated by the following step: precipitation with ammonium sulphate, extraction with 1-butanol and ion exchange chromatography on Q-Sepharose ionic exchanges. Purified Cerein 8A has shown higher sensitivity to heat and proteases and molecular weight of about 26 kDa. The ultraviolet spectrum was typical of a polypeptide and the infrared spectrum indicates the presence of NH group, acil and peptide bond in its structure. One of the hypotheses for the mechanism of action would be the disintegration of the cellular membrane by the opening of pores.

1/ Thesis of Doctor in Veterinary Science, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande Sul. Porto Alegre, march, 2004. (141p)

1 INTRODUÇÃO

O século 20 foi marcado pelo desenvolvimento da Biotecnologia, ciência que surge como inovadora, vigorosa e promissora para todos os setores, tanto no meio acadêmico, como no meio industrial. Além de ampliar os horizontes, ela também determina novos rumos para a pesquisa sobre alimentos.

O crescimento na atividade econômica e a exigência dos mercados consumidores por produtos de qualidade foram decisivos para o aumento na oferta e no consumo de novos produtos. A indústria de alimentos buscou e busca, continuamente, adaptar e desenvolver novas formulações que visem à melhoria na qualidade e, principalmente, à segurança dos produtos alimentares. O desenvolvimento de novos produtos e a conotação de alimentos seguros à saúde do consumidor num mercado mundialmente mais exigente e competitivo provocou um crescimento nas indústrias de ingredientes e aditivos, que têm colocado à disposição um número crescente destes produtos nas últimas décadas.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, por meio da Resolução nº 23 de 15 de março de 2000, definiu ingrediente como “qualquer substância, incluídos os aditivos alimentares, empregados na fabricação ou preparação de um alimento e que permanece até o produto final, ainda que de forma modificada” e

aditivo alimentar como “qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento”.

Conjuntamente, à proporção que as necessidades aparecem, pesquisas são levadas para o campo dos alimentos industrializados com objetivo de obtê-los de forma a serem minimamente processados e com maior tempo de prateleira. Para tanto, é necessária a adição de substâncias conservadoras. Evitando ou retardando o efeito direto ou indireto dos microrganismos se torna possível manter por mais tempo as características desejáveis dos alimentos.

De todas as substâncias antimicrobianas produzidas por microrganismos, as bacteriocinas têm despertado interesse dos pesquisadores. Apresenta um potencial uso na indústria de alimentos, além de estudos indicarem seu uso no controle de infecções em humanos, animais e vegetais. Essas substâncias constituem um grupo heterogêneo de proteínas que variam muito quanto ao seu espectro antimicrobiano, propriedades bioquímicas, mecanismo de ação e características genéticas. A atividade antimicrobiana e a sua estrutura protéica, provavelmente, sejam as únicas características comuns a todas bacteriocinas.

É notório que alimentos, industrializados ou não, possam conter uma ampla variedade e quantidade de microrganismos, que podem interferir em sua vida útil ou causarem doenças. Existem inúmeros recursos para eliminar esses microrganismos ou controlar o seu desenvolvimento nos alimentos, incluindo tratamento térmico, adição de

conservantes químicos, uso de baixa temperatura durante o armazenamento, entre outros. No entanto, a cada dia aumenta a procura por alimentos naturais, que não tenham sido submetidos a nenhum tipo de processamento industrial ou que sejam minimamente processados, e que não sejam adicionados de produtos químicos. Muitos consumidores consideram que esses procedimentos interferem na qualidade nutricional dos alimentos, além de acreditar que os conservantes químicos são perigosos para a saúde, até mais perigosos que os próprios microrganismos que esses produtos pretendem controlar.

Existe ainda o interesse de pesquisa sobre bacteriocinas devido sua potencial aplicação como estratégia para prevenção de certas doenças infecciosas. O desenvolvimento de novos antibióticos é assunto de interesse devido ao aumento de prevalência de bactérias resistentes, resultante do extensivo uso de antibióticos.

São necessários, portanto, mais estudos e pesquisas para determinar a eficácia de microrganismos produtores de bacteriocinas e, principalmente, das bacteriocinas purificadas em alimentos ou como antibióticos, sob condições normais de comercialização, assim como a avaliação de sua potencialidade farmacológica.

Dentro deste contexto, este trabalho propõe a purificação de uma bacteriocina com um grande potencial antibiótico e/ou biopreservativo sobre alimentos. Este estudo se desenvolveu em duas frentes: a separação e purificação da Cereína 8A e avaliação do modo de ação e sua caracterização.

Mais especificamente, os objetivos deste trabalho foram:

1. Estudar a produção de uma substância antibiótica produzida por uma linhagem de *B. cereus* 8A isolada de solo da Região Sul do Brasil;
2. Determinar as propriedades biológicas da bacteriocina;
3. Purificar e caracterizar a bacteriocina Cereína 8A.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definição

As bacteriocinas são definidas como substâncias bactericidas, antibióticos de natureza protéica altamente específicos, não multiplicáveis, sintetizados por algumas linhagens bacterianas com ação contra isolados das mesmas espécies, ou sobre outros organismos estritamente relacionadas com a espécie produtora (TAGG *et al.*, 1976; SANTOS *et al.*, 1994; RILEY, 1998; RILEY, GORDON, 1999; MARINGONI, KUROZAWA, 2002).

O termo substância tipo-bacteriocina (*bacteriocin-like*) aplica-se apenas aos compostos antimicrobianos de natureza protéica, que ainda não estão completamente definidos ou não cumprem com todas as características das bacteriocinas. Essas substâncias, geralmente, possuem um maior espectro de ação do que a definição clássica de bacteriocinas, atuando contra uma variedade de bactérias gram-positivas, algumas gram-negativas e até contra alguns fungos (DE VUYST, VANDAMME, 1994).

Dessa forma, toda bacteriocina ou substância tipo-bacteriocina, tem uma proteína ou um peptídeo que é essencial para sua função bactericida. A maioria das bacteriocinas

descritas até o momento tem um baixo peso molecular e são estáveis ao calor. Estas características, essencialmente, as diferenciam de alguns antibióticos, considerados metabólitos secundários, que são inibidores de crescimento bacteriano, quando presentes em relativamente baixas concentrações (REEVES, 1965).

2.2 Classificação

São descritas as seguintes classes de bacteriocinas produzidas por diferentes bactérias e, principalmente, pelas ácido-láticas, com base na seqüência de peptídeos e pré-peptídeos: a) Classe I: lantibióticos, como a nisina, são bacteriocinas que contêm o aminoácido lantionina. Possuem um peso molecular menor que 5 kDa. b) Classe II: não-lantibióticos, são pequenos, compostos por 10-30 aminoácidos, apresentam um peso molecular até 10 kDa e são resistentes ao calor (leucocina A). Esta categoria se subdivide em três outras classes, bem distintas, sendo principalmente produzidas pelas bactérias láticas. IIa) bacteriocinas tipo a pediocina, com forte atividade anti-listéri;. IIb) bacteriocinas constituídas por dois peptídeos com atividade (ex.: lactococina G e lacticina); IIc) bacteriocinas de secreção *sec*-dependente como a acidocina B; e IId) bacteriocinas que não foram incluídas em nenhum dos subgrupos anteriormente citados. c) Classe III: proteínas grandes e sensíveis ao calor e de peso molecular acima de 30 kDa. d) Classe IV: inclui as composições indefinidas de bacteriocinas, envolvendo proteínas associadas a lipídeos e/ou carboidratos (DE VUYST, VANDAMME, 1994; MCAULIFFE *et al.*, 2001).

2.3 Origem e Descoberta das Bacteriocinas

Pasteur e Joubert por volta do ano de 1877 foram os primeiros a reportar uma interação antagonista entre bactérias, ao observar que uma “bactéria comum”, provavelmente *E. coli*, podia interferir no crescimento de *Bacillus anthracis*, quando inoculados conjuntamente. Em decorrência disso, houve uma intensa procura por uma bactéria de baixa patogenicidade que pudesse ser usada na prevenção contra outros patógenos. Vários antagonistas do crescimento de *Bacillus anthracis* foram reportados no início do século (REEVES, 1965).

Também nesta época surgiram várias propostas de terapias de reposição para modificar a microbiota intestinal. Diversas tentativas foram realizadas com o uso de bactérias produtoras de ácido lático e de algumas linhagens de *E. coli* capazes de destruir especialmente *Salmonella Typhi*. Em meados do ano de 1916, chegou-se a distribuir comercialmente uma linhagem de *E. coli* (Mutaflor) para o tratamento da disenteria, porém sem apresentar a efetividade esperada e sobretudo, sem uma identificação da natureza da substância envolvida, esse tratamento foi imediatamente descartado (JACOB *et al*, 1953).

Em 1925, o cientista belga Andrei Gratia observou que algumas linhagens de *Escherichia coli* liberavam uma substância que aparentava um estado de antagonismo sobre outras colônias do mesmo organismo. Estudos posteriores definiram uma série de 20 proteínas com efeito inibidor, que foram denominadas de colicinas. Ele demonstrou que a linhagem V de *E. coli* produzia em meio líquido uma substância dialisável e

resistente ao calor capaz de inibir o crescimento de outros coliformes. Esta substância foi posteriormente denominada de *colicina V*. Nos anos seguintes, surgiram novas observações de que antimicrobianos do tipo colicina também podiam ser produzidos por outras bactérias, e não exclusivamente pelos coliformes. Assim, em 1953, Jacob *et al.* introduziram o termo mais genérico de bacteriocinas para as proteínas antibióticas do tipo colicina.

As colicinas são codificadas por genes plasmidiais ou transposons, com peso molecular entre de 30 e 70 kDa e denominadas, em geral, segundo letras do alfabeto e classificadas em grupos baseados no receptor da superfície celular a qual se liga e no seu modo de ação (REEVES, 1965; RILEY, 1998).

Até há pouco tempo, a maioria das pesquisas das bacteriocinas limitavam-se às investigações das colicinas (bacteriocinas produzidas por vários membros da família *Enterobacteriaceae*). Atualmente, tem havido uma intensa atividade de pesquisa das bacteriocinas e das substâncias tipo-bacteriocina de bactérias gram-positivas, sobre tudo das bactérias ácido-láticas (REEVES, 1965; DE VUYST, VANDAMME, 1994; RILEY, GORDON, 1999).

À medida que mais detalhes da estrutura e função das bacteriocinas produzidas por essas bactérias vão se acumulando, fica mais evidente que tais substâncias diferem consideravelmente da clássica colicina, usada como modelo-base para as bacteriocinas.

Já foram descritos trinta e quatro tipos de colicinas, das quais vinte e uma têm sido bem estudadas (Tabela 1). Esses estudos mostram uma diversidade de proteínas com características intrigantes: são produzidas sob condições de estresse, como a ausência de nutrientes, e exposição à radiação ultravioleta. Esse grupo de bacteriocinas,

porém, se destaca pela diversidade de mecanismo de ação, que varia desde, atividade de enzima sobre ácidos nucleicos, inibição da síntese protéica, de peptidoglicano e de lipopolissacarídeos e principalmente sobre a membrana, promovendo a formação de poros (BABA, SCHNEEWIND, 1998).

Tabela 1. Características das principais colicinas.

Tipo de Colicina	Grupo	Atividade
E2,E7, E8, E9	A	Dnase
E3, E6	A	Rnase
DF13	A	Poros
E1	A	Poros
A	A	Poros
N	A	Poros
K	A	Poros
Col5	A	Poros
Col10	B	Poros
Ia,Ib	B	Poros
B	B	Poros
D	B	Inibição da síntese protéica
M	B	Inibição da síntese da parede e LPS

Fonte: Baba, Schneewind (1998)

Somente uma fração das bactérias colicinogênicas é induzida a produzir a proteína. A liberação é geralmente letal somente a para as espécies não colicinogênicas. Já as produtoras são protegidas contra as colicinas que produzem pelas proteínas de imunidade expressas constitutivamente (RILEY, WERTZ, 2002).

2.4 Uso das Bacteriocinas na Biopreservação de Alimentos

Os microrganismos mais adequados para uso como bioconservadores são as bactérias láticas, devido a suas características antagonistas e sua grande tradição de uso como bactérias grau-alimento, em alimentos fermentados (SCHILLINGER *et al.*, 1996; SCHILLINGER, HOLZAPFEL, 1996; DE MARTINIS, FREITAS, 2003).

Muitas bactérias ácido-láticas têm um importante papel na produção de alimentos fermentados e, também, na biopreservação de alimentos, particularmente nos laticínios (SCHILLINGER, HOLZAPFEL, 1996). Nesse sentido, o exemplo clássico de bacteriocina com uma aplicação comercial bem sucedida é a nisina.

A nisina, conhecida desde 1928, foi a primeira bacteriocina que se mostrou promissora para o uso prático na preservação de alimentos, principalmente nos derivados do leite. Seu uso em escala comercial ocorre há quase 50 anos pela indústria alimentícia, e até hoje é a única bacteriocina produzida por bactérias ácido-láticas (particularmente por *Lactococcus lactis*) usada, comercialmente com este propósito. Considerada como uma substância *GRAS* (*Generally Regarded as Safe*), sua utilização está aprovada pela *Food and Drugs Administration (FDA)*, órgão norte-americano, e licenciada também em outros 40 países (APHA, 1992; CODEX ALIMENTARIUS, 1995).

No Brasil o uso do NISAPLIN^{®1}, produto comercialmente liberado pelo Ministério da Saúde através do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de

¹ Aplin and Barret, Towsbriges, UK, na concentração de 10^6 UI g⁻¹, de nisina.

Produtos de Origem Animal da Secretaria de Vigilância Sanitária, aprovado pela portaria Nº 29, de 22 de janeiro de 1996, está regulamentado como conservante e biopreservativo em alimentos com ou sem combinação gasosa de até 20% CO₂ (BRASIL, 2000a; 2000b).

Em meados da década de 50, uma empresa de laticínios no nordeste da Inglaterra, APLIN & BARRET Ltda; teve sérios problemas na linha de produção, onde 30% dos queijos fabricados apresentavam uma contaminação clostridiana. Este problema foi resolvido, alguns meses após, pela adição de leite em pó suplementado com nisina. Com esse sucesso e com a ação protetora sobre queijo em vários países europeus, a companhia desenvolveu um produto à base de leite seco, contendo nisina (0,2 mg/g). Posteriormente, a empresa desenvolveu um produto comercial, na época com uma concentração de 25 mg/g, com o qual obtiveram uma substancial eficácia nos anos seguintes, sendo adotado para a conservação de alimentos até os tempos atuais.

Cabo *et al.* (2001) utilizaram o NISAPLIN[®] em alimentos industrializados e obtiveram um aumento de vida de prateleira. Em experimentos com pizzas semiprontas embaladas à vácuo, numa atmosfera variável de CO₂ e com até 100 mg Kg⁻¹ de NISAPLIN[®], estes autores obtiveram a ampliação do tempo de conservação de 11 para 24 dias. Scannell *et al.* (2000) fizeram uso do NISAPLIN[®] em embalagens de celulose e de polietileno para queijo tipo Cheddar, obtendo efeito inibitório sobre *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* experimentalmente inoculados.

A nisina é caracterizada estruturalmente como um peptídeo contendo 20 aminoácidos, entre eles a lantionina, um aminoácido não muito comum. A lantionina classifica como a principal bacteriocina da classe I, a dos lantibióticos, cujo nome deriva

da presença de aminoácidos com anéis de tioéter intramoleculares do tipo *meso*-lantionina e *threo*- β -lantionina, como mostra a Figura 1 (DE VUYST, VANDAMME, 1994; McAULIFFE *et al.*, 2001).

Embora várias bacteriocinas da classe II também tenham se mostradas efetivas na biopreservação de alimentos, nenhuma ainda foi licenciada ou comercializada como aditivo de alimentos, numa forma parcialmente purificada (FIELDS, 1996). Para Muriana, (1996) e Siragusa *et al.* (1999), o uso de outras bacteriocinas, além da nisina, na indústria tem despertado o interesse do setor.

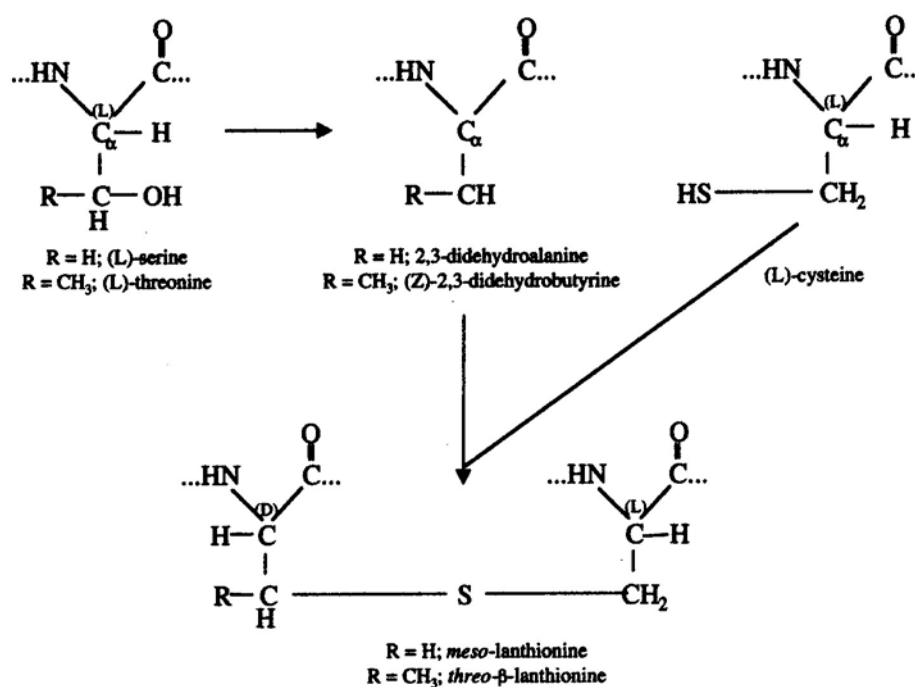


Figura 1. Mecanismo geral de formação do tioéter, durante a maturação dos lantibióticos padrão. (Fonte: McAULIFFE *et al.*, 2001).

Com esta finalidade, uma série de bactérias ácido-láticas, reconhecidas como microrganismos *GRAS* pelo *FDA*, têm sido utilizadas na elaboração de produtos probióticos para consumo humano e animal (SOARES *et al.*, 2003).

A aplicação de bacteriocinas, no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos foi demonstrada por De Vuyst e Vandamme (1994), principalmente sobre *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus* e *Staphylococcus aureus*. Para esses autores, a bacteriocina pode inibir patógenos de importância em carnes refrigeradas, minimamente processadas, na qual, a acidez elevada se torna indesejável, restando somente a refrigeração como forma de conservação.

A *L. monocytogenes* tem sido reconhecida, nos últimos anos, como um dos agentes mais problemáticos em higiene e inocuidade alimentar. Na Europa segundo Guerra e Bernardo (2001), esse microrganismo tem sido encontrado com elevada frequência em derivados de leite em geral, queijos semi-frescos (sem maturação), em carnes e em pescados. A presença da *L. monocytogenes* no queijo é atribuída ao fato desses serem, muitas vezes fabricados com leite cru ou leite submetido a um tratamento térmico equivalente a uma pasteurização baixa, permitindo a sobrevivência de microrganismos, ou ainda, a contaminação pós-pasteurização (CAPLICE, FITZGERALD, 1999; ISLAN *et al.*, 2002).

Por outro lado, o controle obrigatório dessas contaminações acarreta elevado prejuízo sanitário e econômico, pelo que, segundo Lücke (2000), é imprescindível investigar outras formas de controle dessas contaminações, tipicamente as que decorrem de interações bióticas.

É conhecido que as bactérias lácticas e os *Enterococcus* produzem vários compostos bactericidas, incluindo os ácidos orgânicos, que diminuem o pH, o peróxido de hidrogênio, enzimas bacteriolíticas e as bacteriocinas. Alguns destes compostos

também são responsáveis pelas características organolépticas dos queijos e, ao mesmo tempo, inibem parte dos microrganismos da microbiota indesejável (BAREFOOT; NETTLES, 1993; URUKU, SHELEF, 1997; GIRAFFA *et al.* 1997).

A afirmação da nisina como *GRAS*, o aumento do interesse sobre os microrganismos patogênicos em alimentos e o isolamento das bactérias lácticas produtoras de substâncias listericidas têm contribuído para que se ampliem os estudos das bacteriocinas como potenciais antimicrobianos em alimentos, contra *L. monocytogenes* e outros patógenos.

De acordo com Muriana (1996), El-Ziney *et al.* (1999), Lücke (2000) e Islan *et al.* (2002), o uso das bacteriocinas em carnes frescas ou semiprocessadas, as quais possuem bactérias lácticas, como parte da sua microbiota, tem como objetivo prevenir a deterioração, assim como evitar o crescimento de microrganismos psicrotróficos patogênicos.

É de fundamental importância, antes que uma bacteriocina seja considerada para utilização em alimentos, obter informações sobre seu espectro antimicrobiano, bem como o conhecimento das características bioquímicas e genéticas e sua efetividade nos sistemas alimentares.

2.5 Biossíntese e Mecanismo de Ação das Bacteriocinas

2.5.1 Biossíntese

As bacteriocinas produzidas por bactérias gram-positivas, em geral, são sintetizadas na forma de pró-peptídeos, dos quais o peptídeo líder é posteriormente separado para formar a molécula protéica biologicamente ativa (JACK *et al.*, 1995). Hoflack *et al.* (1999) evidenciam que, em alguns casos, como nos lantibióticos, modificações pós-transcricionais são introduzidas no peptídeo antes de ocorrer esta clivagem. A molécula protéica biologicamente ativa é excretada pela célula produtora através de um mecanismo de transporte ativo na membrana ou através de mecanismo *sec-dependente*.

Estes compostos bioativos podem ser um metabólito primário, quando sua síntese ocorre durante a fase exponencial do crescimento bacteriano, tomando um papel vital no desenvolvimento desse organismo. Já o metabólito secundário pode ser descrito como um composto que é produzido após a fase ativa do crescimento e tido como um mantenedor da “performance” do microrganismo naquele ecossistema, porém não é vital, segundo De Vuyst, Callewaert e Crabé (1996).

A biossíntese ocorre tanto na fase logarítmica, quanto na fase final do crescimento bacteriano e, no caso, guarda uma relação com a biomassa produzida (DYKES, 1995; BABA, SCHNEEWIND, 1998).

Para a produção de bacteriocinas são necessários genes estruturais, genes para a secreção/modificação e ainda genes para proteínas imunológicas específicas, cuja função é proteger as células produtoras contra o efeito de suas próprias bacteriocinas. Além disso, em muitas bacteriocinas de classe II (não-lantibióticos) pode haver um indutor da produção, geralmente também um peptídeo, porém sem nenhuma atividade bactericida (KLAENHAMMER, 1993).

A produção de bacteriocinas é geralmente controlada por um plasmídeo chamado bacteriocinogênico (DE VUYST, VANDAMME, 1994). Segundo Marrec *et al.* (2000), embora na maioria das vezes esteja reprimido, em alguns casos o plasmídeo bacteriocinogênico escapa da repressão e induz a síntese de sua bacteriocina, um exemplo é o que ocorre com a Coagulina, produzida pelo *Bacillus coagulans* I₄, regulado pelo opéron *pI*₄ DNA.

Jack *et al.* (1995) afirmam que algumas bactérias gram-positivas produtoras de bacteriocina, possuem genes plasmidiais codificadores desta propriedade. Um exemplo típico é a nisina, produzida pelo *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*, que para expressão, há necessidade de um gene adicional, cuja função vai além da regulação da transcrição, como modificações pós-translocacionais (ex.: o lantibiótico lactocina S, produzida pelo *Lactobacillus sake*), processamento, transporte para o exterior da célula e produção de compostos para sua própria proteção (imunidade).

De todos os genes codificadores, o *sec-dependente* é o único responsável pela produção e liberação de uma subclasse específica de bacteriocina, presente na maioria das bactérias produtoras e, principalmente, nas ácido-láticas (HOFLACK *et al.* 1999).

Um forte indutor desses genes produtores são as radiações ultravioletas, que podem induzir a formação e a liberação da bacteriocina (BLACK, 2002).

A produção de bacteriocinas pelas bactérias ácido-láticas está intimamente relacionada com a fase de crescimento das linhagens produtoras. Usualmente, a produção ocorre na fase de crescimento e cessa no final da fase exponencial, onde, geralmente encontram-se as maiores concentrações de bacteriocina no meio de cultura. Após esta fase, acontece normalmente uma diminuição na concentração de bacteriocina. Tem sido sugerido que essa diminuição ocorra devido à aderência de bacteriocina às células produtoras, ou ainda pela degradação das mesmas por ação de proteases (DE VUYST, VANDAMME, 1994).

Vários outros fatores também podem influenciar profundamente produção de bacteriocinas, tais como linhagens bacterianas, fatores de estresse, composição do meio de cultura utilizado e as condições de incubação como pH, temperatura, agitação, entre outros (SCOTT, TAYLOR, 1981; MITEVA *et al.*, 1998; MATARAGAS *et al.*, 2003).

2.5.2 Mecanismo

Para o melhor entendimento do mecanismo de algumas bacteriocinas, é necessário que se discuta os componentes da parede celular bacteriana, a estrutura global que envolve a célula. A mureína (lat: *murus*, significa parede, muralha) ou peptidoglicana, é uma estrutura macromolecular de natureza híbrida (esqueleto de carboidrato e cadeias de tetrapeptídeos), semi-rígida e se apresenta de forma contínua ao

redor da toda célula bacteriana. Há uma diferença: ao redor das bactérias gram-positivas existem várias camadas concêntricas de peptidoglicana, interpostas com outros componentes macromoleculares e fixas por pontes cruzadas peptídicas (presente também nas gram-negativas), consistindo de uma cadeia curta de aminoácido. Já nas bactérias gram-negativas, a rede de peptidoglicana é envolvida por uma capa rica em lipoproteínas (lipídeos unidos covalentemente a proteínas hidrofóbicas). Toda a atividade fisiológica da célula bacteriana com o meio, bem como a sua manutenção, crescimento e defesa, dependem da integridade dessa estrutura e, da membrana plasmática que reveste o seu citoplasma (BLACK, 2002).

Tipicamente, as bacteriocinas somente inibem o crescimento de outras linhagens da mesma espécie ou de espécies intimamente relacionadas (HURST, 1973).

Apesar de ainda não estar completamente esclarecido, parece que as bacteriocinas de baixo peso molecular, produzidas por bactérias gram-positivas, atuam sobre a membrana celular dos microrganismos susceptíveis através de um mecanismo ativo não dependente de receptores, conferindo uma baixa seletividade, e portanto maior espectro de ação. O mecanismo de ação resultante parece ser a promoção de poros na membrana celular (JACK *et al.*, 1995; ENNAHAR *et al.*, 2000; HÉCHARD, SAHL, 2002) e o conseqüente extravasamento de íons, seguidos de perda da força motiva protônica e, finalmente, a morte da célula atacada pela bacteriocina (OSCÁRIZ *et al.*, 1999).

Para algumas bacteriocinas, o sítio de ação é a membrana celular através de seus receptores específicos. Resultados de pesquisas mostram que as moléculas de bacteriocinas, com conformação α -hélice e β -sheet, possam formar poros na membrana

celular, resultando na perda do potencial de membrana e saída dos constituintes celulares, como mostra a seqüência na Figura 2.

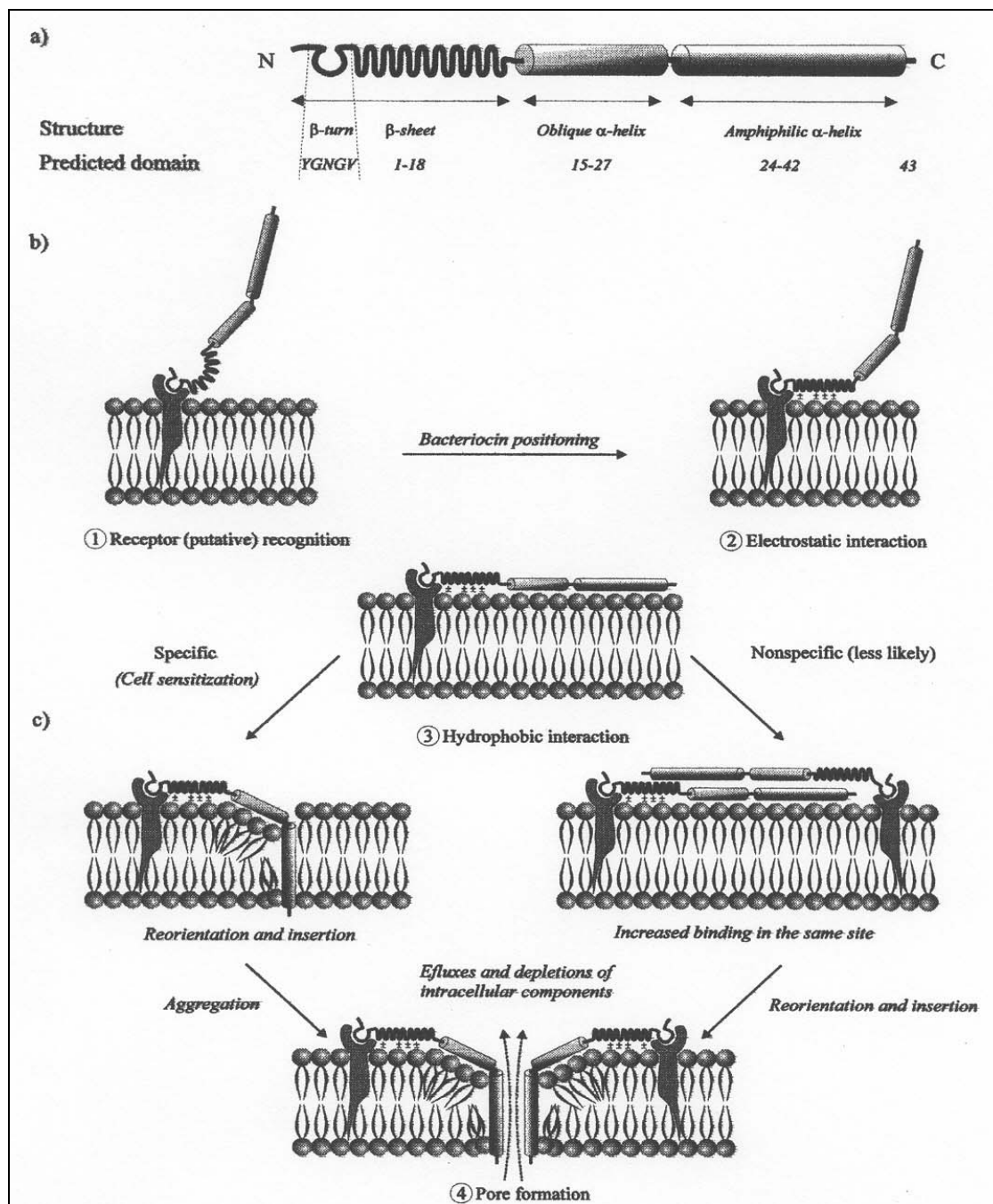


Figura 2. Representação esquemática da estrutura de um modelo de mecanismo de ação de bacteriocinas da Classe IIa e suposta localização de seus domínios de interação com os receptores de membrana celular: (a) domínios da bacteriocina; (b) possível

interação de cada domínio com a superfície da membrana; (c) inserção da bacteriocina e formação de poros. (Fonte: ENNAHAR *et al.*, 2000).

Em função da composição estrutural das bactérias gram-negativas, a atividade de algumas bacteriocinas fica reduzida. Algumas estratégias, com o objetivo de aumentar esta atividade, têm sido o uso de agentes quelantes como EDTA, sensibilizador das bactérias gram-negativas à ação das bacteriocinas, bem como o uso de outras proteínas destinadas a promover suas melhores solubilidade e estabilidade, ou, até mesmo, a aplicação combinada de diferentes bacteriocinas (MULET-PAWEL *et al.*, 1998; SCANNELL *et al.*, 2000).

Santos *et al.* (1994) conseguiram maior atividade de bacteriocinas da classe I quando submeteram a cultura bacteriana a ser testada a um choque osmótico, promovendo a formação de vesículas na membrana citoplasmática, com posterior abertura de poros.

A força próton-motriz está relacionada com um grande número de processos de membranas que envolvem dispêndio energético pelo mecanismo de regeneração após a formação de poros. Este colapso da célula vegetativa ocorre em duas fases. Observa-se na primeira fase, reversível, que a bacteriocina adsorve-se fisicamente a receptores na superfície celular do microrganismo sensível, porém nenhum dano fisiológico é produzido e a célula sensível não é afetada. A segunda fase, considerada irreversível, culmina com a morte da célula devido aos efeitos bioquímicos específicos e alterações celulares gerados, de acordo com cada tipo de bacteriocina (DALMAU *et al.*, 2002).

Alguns autores sugerem diferentes formas de atuação da maioria das bacteriocinas, produzidas, por bactérias ácido-láticas, sobre as bactérias gram-positivas,

pois elas não são adsorvidas. Nesse caso a ação resultaria de uma adsorção inespecífica de natureza hidrofóbica e a imunidade de linhagens resistentes à bacteriocina se deve mais à produção de uma enzima implicada na metabolização, do que à alteração ou bloqueio de receptores (TAGG *et al.*, 1976; BHUNIA *et al.*, 1991; ENNAHAR *et al.*, 2000 e McAULIFFE *et al.*, 2001).

2.6 Isolamento e Purificação das Bacteriocinas

A detecção de bacteriocinas em laboratório nem sempre é um processo simples e barato. Depende antes de tudo da criação ou simulação de condições ambientais ideais como pH, temperatura, meios quimicamente modificados, etc; para facilitar a interação com o microrganismo susceptível (RILEY; WERTZ, 2002).

Para Yang *et al.* (1992); Crupper e Iandiolo (1996); Venema *et al.* (1997) e Janes *et al.* (1998), os protocolos de recuperação e purificação laboratoriais geralmente são bastante complexos e incluem a precipitação com sulfato de amônio (na concentração variável de 0-80%), seguida por várias combinações de cromatografia líquida de troca iônica, interação hidrofóbica ou cromatografia de fase reversa. Apesar destes procedimentos poderem levar a bons resultados em termos de purificação, tornam-se geralmente inviáveis para serem empregados numa escala maior de recuperação, devido ao alto custo e complexidade envolvidos.

Para Caplice, Fitzgerald (1999) e Fields (1996) vários são os fatores que interferem na produção e recuperação de bacteriocinas para o uso comercial. Segundo

estes autores existem muitas particularidades para cada tipo e/ou classe de bacteriocina, mesmo para aquelas bastante similares, que praticamente impossibilitam a aplicação de um protocolo universal. Esta teoria é confirmada pelos levantamentos de De Vuyst e Vandamme (1994), onde concluem que para cada bacteriocina deve ser desenvolvido um protocolo particularizado, ideal para o isolamento e purificação da mesma.

A maioria dos pesquisadores primeiro submete o sobrenadante da cultura produtora à precipitação com sais ou solvente e após a uma pré-purificação. Segundo Yang *et al.* (1992) algumas bacteriocinas como a lactocina 481 e lactocina B podem aumentar até 450 vezes sua atividade biológica após o tratamento de seus sobrenadantes livres de células com altas concentrações de sulfato de amônio. De acordo com estes pesquisadores, os sais atuam tanto dissociando a bacteriocina nativa em monômeros mais ativos, como mudando sua conformação.

As bacteriocinas em forma nativa, isto é bruta, produzidas por diferentes *Lactobacillus* sp., tendem a formar agregados protéicos de peso molecular que varia de 100.000 a 3.000.000 Da. Estes agregados dissociam-se por ultracentrifugação ou por tratamento com dodecil-sulfato de sódio (SDS), uréia ou com detergentes (KLAENHAMMER, 1988).

A purificação do precipitado ativo dos sobrenadantes, por cromatografia de troca iônica tem permitido uma boa recuperação, por exemplo da nisina, diplocina e lactocina A. Entretanto, este método não serve para todas as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-láticas, pois afeta sensivelmente a recuperação da atividade biológica (BAREFOOT; NETLES, 1993).

Para Venema *et al.* (1997), Janes *et al.* (1998) e Uteng *et al.* (2002), a cromatografia de interação hidrofóbica pode ser utilizada com grande êxito na purificação de alguns lantibióticos (nisina, lactocina A e lactocina S). Não obstante, esta técnica não serve para a purificação de bacteriocinas de grande hidrofobicidade (plantaricina, lactocina 481), que na ausência de sal reagem espontaneamente com a matriz do gel.

A purificação de bacteriocinas por cromatografia de fase reversa pode ser utilizada em casos específicos, porém a cromatografia de troca iônica é uma técnica mais adaptada às moléculas hidrofóbicas. Abriouel *et al.* (2003) utilizaram este método associado à adsorção da bacteriocina em Carboxymethyl Sephadex CM-25, para enterocina AS-48 (bacteriocina produzida pelo *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* AS-48). Baseado em propriedades comuns em muitas bacteriocinas como carga positiva, resistência aos solventes orgânicos e pH ácido, estes pesquisadores conseguiram através desta técnica uma recuperação em grande escala da bacteriocina purificada em apenas dois passos de purificação.

Alguns pesquisadores têm utilizado uma outra propriedade das bacteriocinas, a de serem adsorvidas pelas células produtoras, como forma de purificação. Isto é possível quando se submete o sobrenadante a um tratamento térmico para inviabilizar as formas vegetativas, precedidas do ajuste de pH, posterior incubação *overnight* a 4° C e agitação constante, por fim ressuspensão e centrifugação após a separação das células. As bacteriocinas, cuja adsorção é dependente do pH, serão adsorvidas pelas células mortas e liberadas pela força iônica do tampão de suspensão e separada pela centrifugação, obtendo-se uma maior recuperação com baixo custo de produção (ATRIH *et al.*, 2003).

Janes *et al.* (1998) por meio de uma técnica com os mesmos procedimentos anteriores, somente que para a adsorção da bacteriocina, utilizou cinzas da casca de arroz associado, ao ácido silícico, conseguiu 84% de recuperação da bacteriocina do sobrenadante bruto.

2.7 Bacteriocinas Produzidas por Espécies de *Bacillus*

O Gênero *Bacillus* constitui um dos grupos mais amplos dentro da microbiologia. Suas características variam desde espécies com importância industrial e agrícola até patogênicas altamente produtoras de toxinas.

Segundo o Manual Bergey's de Bacteriologia Sistemática, morfológicamente são gram-positivas, esporogênicas, com divisão celular mediana, em forma de bastonetes e tolerantes ou não ao oxigênio. São agrupados de acordo com as exigências físicas, químicas, nutricionais ou genéticas, além do posicionamento celular dos endosporos.

A maioria das espécies deste gênero têm como hábitat natural o solo. São freqüentemente sujeitas a variações drásticas de parâmetros físico-químicos do meio ambiente, tais como temperatura, osmolaridade ou disponibilidade de fontes carbono. Muitas vezes estas variações impõe condições de crescimento lento ou de fase estacionária. Durante a transição da fase de crescimento exponencial para a fase estacionária, as células ensaiam respostas adaptativas, que vão desde o desenvolvimento da motilidade ou de competência para a transformação genética por DNA exógeno, até a produção de antibióticos ou de enzimas degradativas extracelulares (HYRONIMUS *et al.*, 1998).

A atividade antimicrobiana, que algumas linhagens de *Bacillus* possuem, deve-se aos peptídeos antibióticos, cuja origem pode ser de síntese ou do metabolismo. Esses metabólitos, geralmente, podem desenvolver uma função sinérgica à endosimbiontônica (GEBHARDT *et al.*, 2002). Uma série de metabólitos bioativos foi isolada de espécies de *Bacillus* presentes sobre artrópodes. Segundo estes pesquisadores, esses metabólitos tanto auxiliam na obtenção de energia, como na defesa destes insetos, pois seu sistema de defesa difere em muito dos vertebrados. São peptídeos cíclicos conhecidos como a gramicidina S, tirocidina e bacitracina e outros lipopeptídeos como as iturinas, bacilomicinas e fengicinas, que são metabólitos secundários.

Diversas são as origens destes bacilos produtores de substância antimicrobiana. Sugita *et al.* (1998) relataram a presença de bactérias intestinais isoladas de sete diferentes espécies de peixe da costa japonesa, produtoras de substância antimicrobiana. Para Yoshida *et al.* (2001) a presença de espécies de bacilos representa um fator de proteção a mais num ecossistema. Segundo eles, *B. amyloliquefaciens* isolado da amoreira produz um composto inibidor capaz de impedir a proliferação de bactérias e fungos fitopatogênicos como *Erwinia caratovora* e *Colletotrichum dematium*.

Pattnaik *et al.* (2001) identificaram uma substância tipo-bacteriocina (liquenina), produzida sob condições restritas de oxigênio por *B. licheniformis* de suco ruminal de búfalos. Tanto a produção, como a atividade limita-se à ausência de oxigênio. Sua melhor atividade ocorre na faixa de pH entre 4 e 9, é termoestável a 100° C, porém sensível à proteinase K. Apresenta um peso molecular de 1,5 kDa.

Já Hyronimus *et al.* (1998) isolaram uma linhagem de *B. coagulans* I₄, produtora da coagulina, de fezes de bovinos, capaz de inibir outras espécies de *Bacillus* e *Listeria* entre outros indicadores.

As bacteriocinas ou substâncias tipo-bacteriocinas ainda foram descritas em várias espécies de *Bacillus*. Alguns como *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. thermoleovarans*, *B. thuringiensis*, *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa*, apresentam um amplo e variado espectro de ação (PIURI *et al.*, 1998; OSCÁRIZ *et al.*, 1999; MARREC *et al.* 2000 e YOSHIDA *et al.*, 2001).

Sabe-se que o *B. subtilis* produz diversos antibióticos, que segundo Tamehiro *et al.* (2002) estão classificados de acordo com sua síntese. Sintetizados ribossomalmente estão subtilosina, subtilina, sublancina e TasA, produzidos durante a fase ativa de crescimento. O grupo não ribossomalmente sintetizados é produzido durante a fase estacionária, como a surfactina (biosurfactante), bacilisina e as iturinas. Estes autores ainda reportaram a ocorrência de um antibiótico com estrutura fosfolipídica (bacilisocina), também produzida por esta espécie.

B. thuringiensis pertence ao grupo de bactérias amplamente utilizadas na agricultura e em saúde pública, principalmente no controle de insetos patógenos e transmissores de doenças. A característica de produzir cristais protéicos (δ -endotoxinas) lhe confere uma atividade contra certas espécies de insetos, nematódeos, ácaros e protozoários. Já as β -exotoxinas secretadas possuem uma atividade antifúngica. A tohcicina e thuricina 7, bacteriocinas produzidas por esta espécie, apresentam um peso molecular na sua forma nativa, de 10,5 e 11,6 kDa, respectivamente, e atividade contra *Streptococcus pyogenes* e *L. monocytogenes*, com efeito tanto bactericida, como

bacteriolítico. Ambas são relativamente termoestáveis (90⁰ C a 30 mim.), ativas na faixa de pH entre 3 e 9 e sensíveis à proteinase K (CHERIF *et al.*, 2001).

2.7.1 *Bacillus cereus*

O *B. cereus* é mais conhecido pelas duas formas de doença capaz de causar, a gastroenterite diarréica e a gastroenterite emética, do que pelo seu antagonismo à bactéria. É comumente são encontrados em solos úmidos, vegetais em decomposição e ainda em laticínios e abatedouros de animais, como contaminantes de seus subprodutos.

As cereínas, como são normalmente chamadas as bacteriocinas produzidas pelo *B. cereus*, apresentam um amplo e variado espectro de ação. Elas já foram estudadas devido a sua ação, bacteriolítica ou bactericida, contra *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus* sp., *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. butyricum*, *B. cereus* e *B. subtilis*, entre outras espécies de importância alimentar. A cereína 7 constitui um agregado polipeptídico de peso molecular entre 3 e 10 kDa, termoestável a 100° C por 15 mim. e ativa na faixa de pH entre 2 e 9 (OSCÁRIZ *et al.*, 1999).

Algumas cereínas são ativas contra espécies estritamente relacionadas que , como é o caso da cereína GN105 produzida pela linhagem de *B. cereus* GN105, que atua somente contra espécies do mesmo gênero (NACLERIO *et al.*, 1993).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho são apresentados na forma de artigos publicados ou enviados para publicação em revistas científicas. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um destes artigos, sendo que o último desta relação encontra-se apenas em anexo.

4.1 Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus* sp. Strain 8A.

- Publicado no *Journal of Applied Microbiology* em 12 de junho de 2002. (J Appl. Microbiol., 2002, 93, 512-519) (Anexo 1)

4.2 Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus* 8A.

- Submetido ao *Journal of Applied Microbiology*.

4.3 Purification and partial chemical characterization of cerein 8A, a bacteriocin produced by a soil isolate of *Bacillus cereus* 8A.

- Submetido ao *International Journal of Food Microbiology*.

4.4 Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation.

- Publicado no *Applied Microbiology and Biotechnology* em 09 de janeiro de 2004, (documento disponível *on line* – DOI 10.1007/s00253-004-1570-1).

(Anexo 2)

De um modo geral, todos os trabalhos visam o estudo da Cereína 8A. O primeiro, com a bacteriocina bruta, utilizando o sobrenadante da cultura do *B. cereus*, teve como objetivo identificar o microrganismo produtor, determinar as condições de produção da bacteriocina bruta, espectro de ação e os testes de atividade, após tratamento com enzimas proteolíticas, ação do calor e do pH na atividade antimicrobiana.

Uma vez estabelecida a caracterização inicial da Cereína 8A, no trabalho seguinte estudou-se o efeito e o modo de ação, que foi determinado, como bactericida contra *L. monocytogenes* e *B. cereus*. A atividade contra bactérias gram-negativas, bem como o efeito esporicida foram também verificados. Através de espectrofotometria de infravermelho, obteve-se a evidência de que o modo de ação se baseia na desestruturação da membrana celular.

Finalmente, a purificação e a caracterização parcial da Cereína 8A foi o principal objetivo do último trabalho.

4.1 ARTIGO 1

4.1.1 Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus* sp. Strain 8A.

4.1.2 Abstract

Aims: The aim of this research was to investigate the production of bacteriocins by *Bacillus* spp. isolated from native soils of south of Brazil.

Methods and Results: A bacteriocin produced by the bacterium *Bacillus cereus* 8A was identified. The antimicrobial activity was produced starting at the exponential growth phase, although maximum activity was at stationary growth phase. A crude bacteriocin obtained from culture supernatant fluid was inhibitory to a broad range of indicator strains, including *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, and several species of *Bacillus*. Clinically relevant bacteria such as *Streptococcus bovis* and *Micrococcus luteus* were also inhibited. Bacteriocin was stable at 80°C, but the activity was lost when the temperature reached 87°C. It was resistant to the proteolytic action of trypsin and papain, but sensitive to proteinase K and pronase E. Bacteriocin activity was observed in the pH range of 5.0 to 8.0.

Conclusions: A bacteriocin produced by *Bacillus cereus* 8A was characterised, presenting a broad spectrum of activity and potential for use as biopreservative in food.

Significance and impact of study: The identification of a bacteriocin with large activity spectrum, including pathogens and spoilage microorganisms, addresses an important aspect of food safety.

Key words: antimicrobial, bacteriocin, *Bacillus cereus*, bioactive peptide, *Listeria monocytogenes*.

4.1.3 Introduction

Bacteriocins are bacterial peptides that inhibit or kill microorganisms that are usually, but not always, closely related to the producer strain (Klaenhammer, 1988). Bacteriocins are classified into different groups (Klaenhammer, 1993). Class I bacteriocins (lantibiotics) are small peptides that undergo extensive post-translational modification to produce the active peptide. Nisin, the most studied bacteriocin, belongs to class I bacteriocins, which are active against a broad spectrum of food spoilage and pathogenic bacteria, including *Listeria monocytogenes* (Maisnier-Patin *et al.* 1992). Class II bacteriocins are heat-stable, low molecular weight, membrane-active peptides. Members of class III are large heat-labile proteins, and a fourth class (complex bacteriocins) has also been suggested, requiring non-protein moieties for activity (Klaenhammer, 1993).

Bacteriocins from a variety of Gram-positive species have been biochemically and genetically characterised, including staphylococci (Navaratna *et al.* 1998; Oliveira *et al.* 1998) and coryneform bacteria (Valdés-Stauber *et al.* 1991; Motta and Brandelli 2002). Because of their potential use as natural preservatives, bacteriocins produced by lactic acid bacteria have been subject of intensive investigation in recent years (Nettles and Barefoot 1993; Eijsink *et al.* 1998), and many attempts are being made to incorporate bacteriocins into process and products. However, only nisin A has been

granted Generally Recognized as Safe (GRAS) status by the Food and Drug Administration.

Bacillus is an interesting genus to look for antimicrobial activity since *Bacillus* species produce a large number of peptide antibiotics representing several different basic chemical structures (von Döhren 1995). The production of bacteriocins or bacteriocin-like substances has been already described for *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium* and other *Bacillus* species (Tagg *et al.* 1976). Although several bacteriocin producing strains are active against a narrow spectrum of bacteria (Naclerio *et al.* 1993; Lee *et al.* 2001), some strains produce bacteriocins with a broad spectrum of activity, including important pathogens such as *L. monocytogenes* (Oscariz and Pisabarro 2000) and *Streptococcus pyogenes* (Cherif *et al.* 2001).

The objective of this study was to evaluate the potential antimicrobial activity of a bacteriocin produced by a *Bacillus* sp. strain 8A isolated from native soils of south of Brazil. The antimicrobial spectrum and some properties of the bacteriocin are described.

4.1.4 Materials and methods

4.1.4.1 Reagents and media

Nutrient broth was from Difco (Detroit, USA), BHI and MRS were from Oxoid (Basingstone, UK). Trypsin, Proteinase K, Pronase E, β -N-acetylglucosaminidase and β -glucuronidase were from Sigma (St. Louis, USA). α -Amylase and β -galactosidase were

from Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark). All other media and reagents were from Merck (Darmstadt, Germany).

4.1.4.2 Bacterial cultures

Indicator strains listed in Table 1 are laboratory stocks obtained from different sources and were kept frozen in 20% (v/v) glycerol at -20°C . The organisms were propagated in appropriate media and temperature, as indicated in Table 1.

Table 1. Antimicrobial activity spectrum of bacteriocin.*

Indicator organism	Media	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Inhibition zone (mm) [†]
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	BHI	37	18
<i>Bacillus subtilis</i> var <i>niger</i> (food isolate)	BHI	37	13
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	BHI	37	14
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 31195	BHI	37	15
<i>Bacillus coagulans</i> (clinical isolate)	BHI	37	15
<i>Bacillus macerans</i> (clinical isolate)	BHI	37	15
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	MRS	30	8
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	MRS	30	-
<i>Lactobacillus casei</i> (food isolate)	MRS	30	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (food isolate)	MRS	30	-
<i>Lactococcus lactis</i> R704	MRS	30	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	BHI	37	16
<i>Listeria innocua</i> (food isolate)	BHI	37	12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	BHI	37	-
<i>Streptococcus</i> sp. (α -hemolytic)	BA	37	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (clinical isolate)	BA	37	-
<i>Streptococcus bovis</i> (clinical isolate)	BA	37	12
<i>Streptococcus uberis</i> (clinical isolate)	BA	37	12
<i>Enterococcus faecalis</i> (clinical isolate)	BA	37	11
<i>Micrococcus luteus</i> (clinical isolate)	BA	37	13
<i>Corynebacterium pyogenes</i> (clinical isolate)	BHI	37	-
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	BHI	37	11
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 14752	BHI	37	-

<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 19391	BHI	37	12
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3624	RCM	37	12
<i>Clostridium septicum</i> (clinical isolate)	RCM	37	10
<i>Enterobacter aerogenes</i> (clinical isolate)	BHI	37	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	BHI	37	-
<i>Escherichia coli</i> (ETEC)	BHI	37	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	BHI	37	-
Table 1. continuation			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clinical isolate)	BHI	37	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (clinical isolate)	BHI	37	-
<i>Pasteurella haemolytica</i> (clinical isolate)	BHI	37	11
<i>Aeromonas hydrophila</i> (clinical isolate)	BHI	30	-
<i>Aeromonas salmonicida</i> (clinical isolate)	BHI	30	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (clinical isolate)	BHI	37	-
<i>Edwardsiella tarda</i> (clinical isolate)	BHI	30	-
<i>Proteus mirabilis</i> (clinical isolate)	BHI	37	-
<i>Alcaligenes faecalis</i> (clinical isolate)	BHI	30	-
<i>Erwinia carotovora</i> (food isolate)	BHI	25	-
<i>Candida albicans</i> (clinical isolate)	SAB	37	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	SAB	37	-
<i>Candida kefir</i> (food isolate)	SAB	37	-
<i>Aspergillus</i> sp. (food isolate)	SAB	37	-
<i>Penicillium</i> sp. (food isolate)	SAB	37	8
<i>Fusarium</i> sp. (food isolate)	SAB	37	-
<i>Pyrenophora</i> sp. (food isolate)	SAB	37	-

* Aliquots of 20 μ l were applied to discs, corresponding to 32 AU disc⁻¹.

† Diameter of the inhibition zone in mm around the disc.

BA, sheep blood agar; BHI, brain hearth infusion; MRS, de Man-Rogosa-Sharpe agar, RCM, reinforced clostridial medium; SAB, Sabouraud's agar.

Corynebacterium fimi NCTC 7547 was used as a positive control since it is described as susceptible to all bacteriocins tested (Oliveira *et al.* 1998).

4.1.4.3 Isolation of microorganisms

Soil samples were collected at native woodlands of south of Brazil (28-29°S, 51°W). Samples were obtained by removing the leaf litter and collecting the top 10 cm of soil. Soil samples (100 g moist weight) were mixed with sterile water (1:1 w/v),

homogenised for 15 min at 60 cycles in a laboratory blender (Seward, London, UK), and allowed to stand for 1 h at room temperature. One ml of this suspension was inoculated into 100 ml of nutrient broth, after microbial growth was observed by turbidity, aliquots were inoculated onto nutrient agar plates, incubated at 30°C, and single colonies were isolated and screened for antimicrobial activity.

4.1.4.4 Bacterial identification

Bacterial identification was based on morphological and biochemical tests, conducted at Department of Bacteriology, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil).

4.1.4.5 Preparation of crude bacteriocin

To produce bacteriocin, bacteria were grown in 200 ml of BHI medium at 30°C in a rotary shaker at 125 cycles min⁻¹ for desired times. The cells were harvested by centrifugation at 10,000 x g for 15 min and culture supernatants were filtered through 0.22 µm membranes and stored in sterile flasks at 4°C until used for antimicrobial assay.

4.1.4.6 Bacteriocin activity assay

The antimicrobial activity was detected by agar disk diffusion assay (Kimura *et al.* 1998) and was tested against all indicator strains. An aliquot of 20 µl cell-free culture supernatant was applied on disks (6 mm) on agar plates previously inoculated with 0.3 ml of each indicator strain suspension, which corresponded to a 0.5 McFarland turbidity

standard solution. Plates were incubated at optimal temperature of the test organism. The bacteriocin titre was determined by the serial two-fold dilution method previously described by Mayr-Harting *et al.* (1972). Activity was defined as the reciprocal of the dilution after the last serial dilution giving a zone of inhibition and expressed as activity units (AU) per milliliter.

4.1.4.7 Growth determination

The determination of the number of viable cells (colony forming units, CFU ml⁻¹) was carried out as described elsewhere (Motta and Brandelli 2002). Bacterial growth was developed at 25°C in rotary shaker. At 8 h intervals, the bacterial suspension was diluted to 10⁻⁸ in 8.75 g l⁻¹ NaCl, samples were homogenised and then loaded (20 µl) in triplicate onto nutrient agar plates. Plates were incubated for 3 days at 30°C and counts done among 30-300 colonies.

In parallel, optical density (OD) of the cultures was measured at 600 nm with a Hitachi U-1100 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan).

4.1.4.8 Effects of proteolytic enzymes, heat and pH on antimicrobial activity

Proteolytic enzymes were tested on cell-free supernatant. Samples of 1 ml were treated at 37°C for 1 h with either 1 mg ml⁻¹ or 2 mg ml⁻¹ final concentration of the following enzymes: papain, trypsin, proteinase K, pronase E, α-amylase, β-glucuronidase, β-galactosidase and β-*N*-acetylglucosaminidase. Samples were then boiled for 2 min to inactivate the enzyme. To analyse thermal stability, samples of

bacteriocin were exposed to temperatures ranging 25 to 90°C for 30 min, 100°C for 1 to 15 min, 121°C/15 lb in⁻² for 15 min and frozen for up to 30 days. The activity of bacteriocin at different pH values was estimated by adjusting the pH of supernatant samples to pH 3 to 11. Chemicals (working concentrations in Table 4) were added to the bacteriocin and the samples were incubated for 1 h at 25°C before being tested for antimicrobial activity. After the treatments, the samples were tested for antimicrobial activity against *B. cereus* ATCC 14579.

4.1.5 Results

4.1.5.1 Isolation and identification of bacteriocin-producing strain

The isolates were screened for antibacterial activity against *C. fimi* NCTC 7547 and *B. cereus* ATCC 14579 as indicator strains. The isolate 8A was selected by producing higher inhibition zones. This microorganism is a Gram-positive spore-forming bacterium, presenting catalase- and lecithinase-positive reactions. Excepting by the presence of sub-terminal spore, all physiological and morphological characteristics were identical to *Bacillus cereus* ATCC 2599 (Claus and Berkeley 1986). The preliminary identification of this strain was based on phenotypical characteristics, indicate a *Bacillus cereus*.

4.1.5.2 Bacteriocin production

Strain 8A was aerobically incubated in BHI broth at different temperatures in rotary shaker. Cell growth reached the stationary phase at 8 h of cultivation, and similar

growth curves were observed at 25 and 30°C (Fig. 1a). Kinetics of bacteriocin production studied in BHI broth shown that synthesis and/or secretion started at the exponential growth phase at 25 and 30°C, with maximum activity observed at the late stationary growth phase (Fig. 1b). Maximum values of antibacterial activity were observed at 30°C, corresponding to 3200 AU ml⁻¹. When the temperature was increased to 37°C, the bacteriocin activity decreased to 600 AU ml⁻¹.

The number of viable cells (CFU ml⁻¹) and pH was also determined during growth of the strain 8A (Fig. 2). The values of CFU ml⁻¹ correlate well with OD (r² value of 0.98). It was observed that pH values increased from 7.5 to 8.5 at the end of incubation.

4.1.5.3 Inhibitory spectrum of bacteriocin

Cell-free supernatant of a culture of *Bacillus cereus* 8A was tested for the presence of antimicrobial activity against several strains, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast and moulds. The results are shown in Table 1. Inhibitory activity was observed on several Gram-positive bacteria, including important pathogenic and spoilage microorganisms such as *Clostridium perfringens*, *B. cereus* and *L. monocytogenes*. Clinically relevant bacteria such as *Streptococcus bovis*, *Strep. uberis* and *Micrococcus luteus* were also inhibited. Among the Gram-negative bacteria tested, only *Pasteurella haemolytica* was inhibited. The yeast tested were not inhibited, and a *Penicillium* sp. strain was inhibited. Larger inhibitory zones were observed against species of *Bacillus*. The producer strain was not inhibited by its bacteriocin. *B. cereus* ATCC 14579 was used as indicator strain in subsequent experiments.

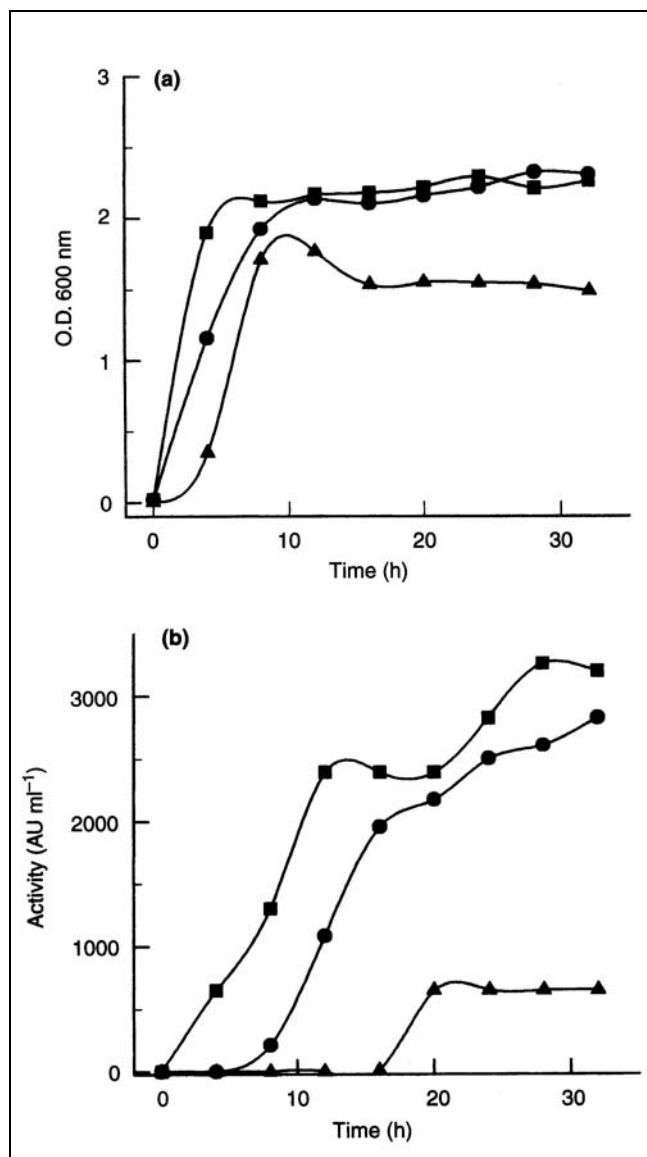


Fig. 1. Production of antimicrobial activity during growth of *Bacillus cereus* 8A in TSB-modified medium. Bacterial growth (a) and antibacterial activity (b) was monitored at 25°C (■), 30°C (●), and 37°C (▲) at the indicated times. Each point represents the mean of three independent experiments.

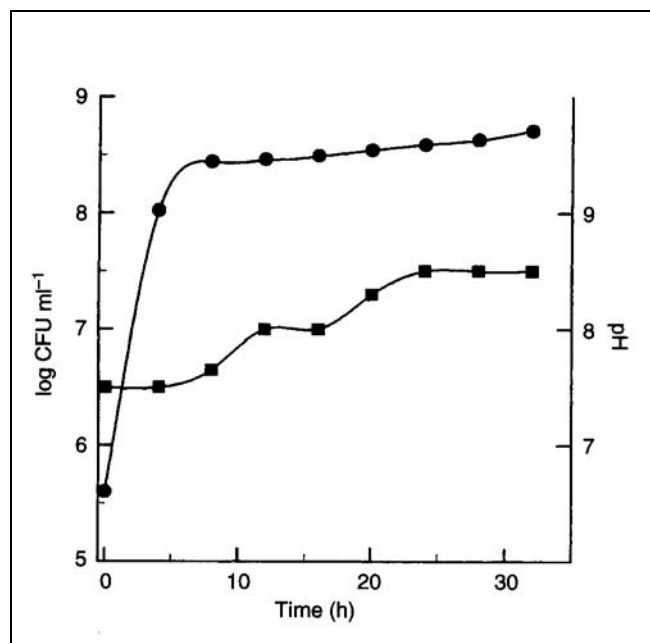


Fig. 2. Viable cell counts (●) and pH values (■) during growth of *Bacillus cereus* A8 in BHI broth. Each point represents the mean of three independent experiments.

4.1.5.4 Effect of enzymes, heat and pH on antimicrobial activity

To test the effect of proteolytic enzymes, 3200 AU ml⁻¹ of bacteriocin were tested for sensibility to papain, trypsin, proteinase K and pronase E, and residual activity was measured by agar disk diffusion assay against *B. cereus* ATCC 14579. The bacteriocin was sensitive to proteinase K and pronase E at the concentration of 2 mg ml⁻¹ (Table 2), but was not sensible to these enzymes at 1 mg ml⁻¹.

The effect of glycosidases on bacteriocin activity was also tested. None of the glycosidases tested reduced the antimicrobial activity (Table 2).

The bacteriocin was incubated for 30 min at different temperatures and residual activity was measured. It was stable at 80°C, but the activity gradually decreased with the increase of temperature. The residual activity was 90% after incubation at 82°C, and total loss of activity was observed after incubation at 87°C or more (Fig. 3a and Table 3). When the bacteriocin was incubated at 100°C, the residual activity was 80% after 2.5 min, but it was completely absent after 3 min incubation (Fig. 3b). Bacteriocin activity was not lost by cooling or freezing storage (Table 3).

Table 2. Effect of enzymes on bacteriocin activity.*

Treatment	Residual Activity (%)
Untreated bacteriocin	100
Trypsin	100
Papain	100
Proteinase K	0
Pronase E	0
α -amylase	100
β -glucuronidase	100
β -galactosidase	100
β - <i>N</i> -acetylglucosaminidase	100

* Bacteriocin was treated with 2 mg ml⁻¹ of each enzyme and then boiled for 2 min at 100°C for enzyme inactivation. Controls with each enzyme were performed.

Table 3. Thermal stability of bacteriocin on different conditions.

Treatment	Residual activity (%)
100°C/ 15 min	0
121°C/ 15 lb in ⁻² /15 min	0
4°C / 30 days	100
-20°C / 30 days	100
Freeze-dried	100

The bacteriocin was active over a pH range of 5.0 to 8.0, but it was inactivated when incubated outside of these limits (Fig. 4).

The effect of several chemicals on the antimicrobial activity was evaluated. The bacteriocin lost its activity after treatment with trichloroacetic acid (Table 4). Antimicrobial activity was not affected by treatment with organic solvents, detergents or EDTA (Table 4).

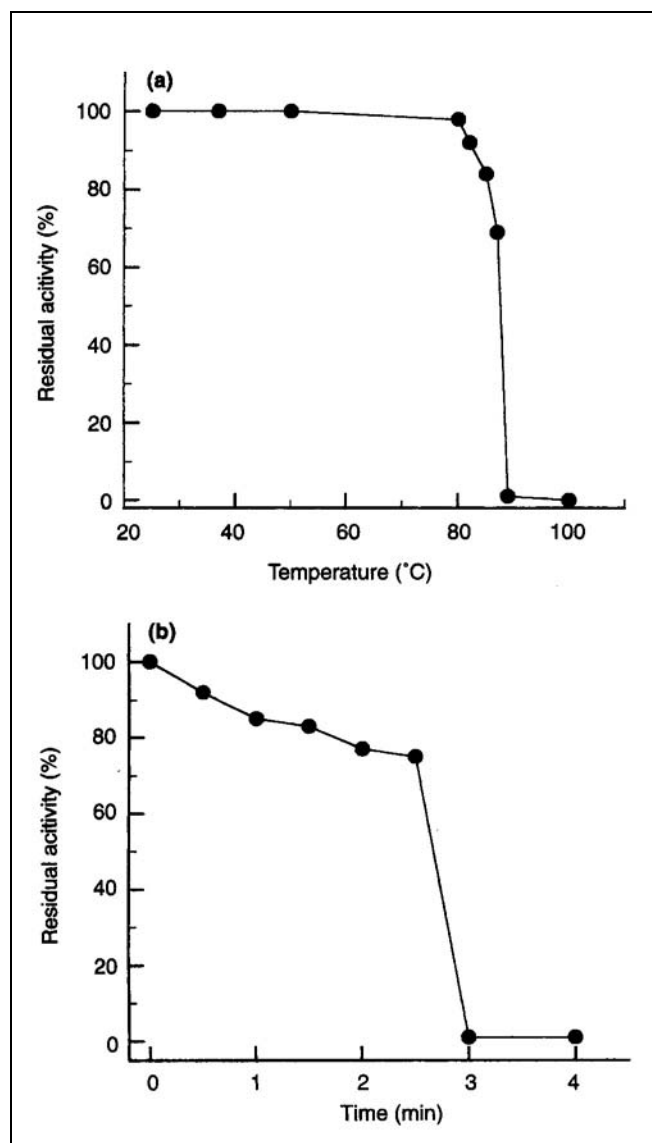


Fig. 3. Thermal stability of the bacteriocin. Bacteriocin (3200 AU ml⁻¹) was incubated at various temperatures for 30 min (A) or at 100°C for different times (B) and residual activity was measured. Activity is expressed as the percentage of residual activity determined against *B. cereus* ATCC 14579.

Table 4. Effect of chemicals on bacteriocin activity.*

Treatment	Concentration	Residual activity (%)
Acetone	10 % (v/v)	100
Chloroform	10 % (v/v)	92
Dimethyl sulfoxide	10 % (v/v)	100
Ethanol	10 % (v/v)	92
Methanol	10 % (v/v)	100
Ethyl ether	10 % (v/v)	100
Xylol	10 % (v/v)	100
EDTA	10 mmol l ⁻¹	83
Trichloroacetic acid †	100 mg ml ⁻¹	0
Sodium deoxycholate	1 mg ml ⁻¹	100
Sulphobetaine 14	1 mg ml ⁻¹	92
Triton X-100	1 % (v/v)	100
Tween 20	10 % (v/v)	100
Tween 80	10 % (v/v)	92

* Bacteriocin was previously incubated for 1 h at 25 °C with chemicals and then assayed for antimicrobial activity. Controls with each chemical were adequately done.

† After treatment with TCA samples were centrifuged at 10,000 x g for 5 min and the supernatant was neutralized to pH 7.0 before testing for antimicrobial activity.

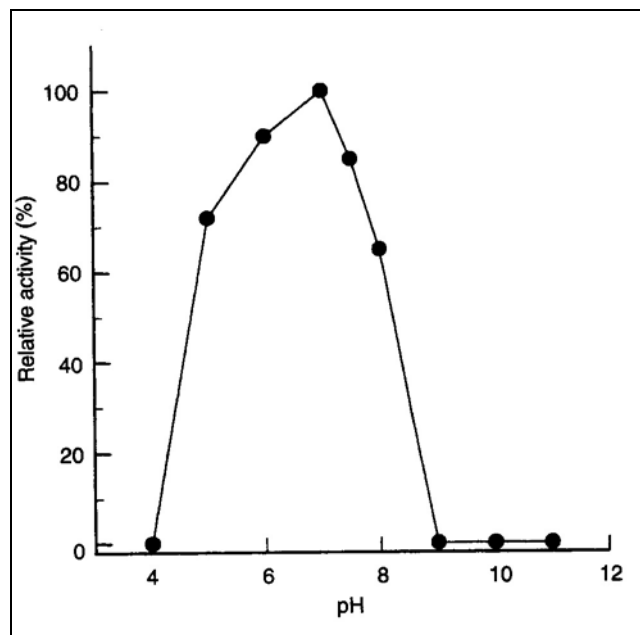


Fig. 4. Effect of pH on the bacteriocin activity. Bacteriocin (3200 AU ml^{-1}) was subjected to assays of antibacterial activity at various pH values. Activity is expressed as the percentage of maximum activity determined against *B. cereus* ATCC 14579.

Considering the properties of the inhibitory substance produced by *Bacillus cereus* 8A, it was characterised as a bacteriocin-like compound. We propose cerein 8A as a designation for this bacteriocin.

4.1.6 Discussion

A bacteriocin-producing bacterium was isolated from soil samples of native woodlands of south of Brazil. Strain 8A was preliminarily identified as *Bacillus cereus* by biochemical profiling, and its antimicrobial activity was released into culture broth during cultivation. *B. cereus* ATCC 14579, *C. perfringens* ATCC and *L. monocytogenes* ATCC 7644, among other bacteria were inhibited by this antimicrobial activity. Among

Gram-negative bacteria tested only *P. haemolytica* was sensitive. *C. fimi* NCTC 7547, which is described as susceptible to all bacteriocins tested (Oliveira *et al.* 1998), was sensitive for bacteriocin of strain 8A as well. The bacteriocin was able to inhibit the growth of *L. monocytogenes* and *C. perfringens*, a very important property to food safety. *Bacillus* spp. has been also considered as a potential agent to biological control against phytopathogenic fungi (Podile and Prakash 1996; Yoshida *et al.* 2001). In this regard, inhibitory effect against *Penicillium* sp. was also observed, although all other fungi tested were insensitive. Since the tests were performed with a crude bacteriocin preparation, the possibility that there is a different molecule showing antifungal activity can not be ruled out.

The inhibition of bacterial strains involved in bovine mastitis by cerein 8A would be very beneficial to the cattle industry. Because bacteriocin treatment is inexpensive, effective and non-toxic to animals and humans, it has been already proposed as an alternative strategy for disease control (Milles *et al.* 1992; Oliveira *et al.* 1998). The bacteriocin produced by the strain 8A may represent an antimicrobial substance with potential application in the prevention and treatment of mastitis.

Although some bacteriocins from *Bacillus* present a narrow antimicrobial spectrum, the antibacterial activity of cerein 8A was comparable to broad-range bacteriocins associated with *Bacillus* spp. Oscariz and Pisabarro (2000), isolated and identified cerein 7, a bacteriocin produced by *B. cereus* Bc7, that was inhibitory for growth of *Listeria* spp. and other gram-positive bacteria. Coagulin, a bacteriocin-like substance produced by *B. coagulans* I4 has been reported (Hyronimus *et al.* 1998). It presents a large antibacterial spectrum, inhibiting strains of the same specie as the

producer strain. In addition, a *B. brevis* strain isolated from kimchi produce a bacteriocin active on a broad spectrum of bacteria, including some pathogens food-spoilage microorganisms, and some yeast strains (Mah *et al.* 2001).

Bacteria can produce a variety of inhibitory substances. In this case, it is unlikely that organic acid causes the inhibition observed. Although *B. cereus* can produce acids from carbohydrates, but the pH in the growth medium of *Bacillus* sp. strain 8A was in the range of 7.5-8.5. An increase in pH during cultivation is often associated with proteolytic microorganisms. Indeed, the production of extracellular proteases by *B. cereus* has been described (Makinen and Makinen 1987) and proteolytic activity could be harmful to antimicrobial peptides. Bacteriocin activity was not lost during cultivation, indicating that the bacteriocin is resistant to extracellular proteases of *B. cereus*. *Bacillus* spp. produces antimicrobials which are cyclic peptides containing unusual aminoacids, therefore more resistant to proteases (von Döhren 1995). In agreement with this fact, cerein 8A was resistant to papain and trypsin hydrolysis.

In the evaluation of bacteriocin properties, its inhibitory activity was sensitive to microbial proteases and was lost with TCA treatment, which indicates its proteinaceous nature. Other bacteriocins produced by *Bacillus*, such as cerein and coagulin I4, are often less resistant to proteolytic treatments (Naclerio *et al.* 1993; Hyronimus *et al.* 1998). None of the glycosidases tested affect the activity, contrary to observed for carnocin LA54A (Keppler *et al.* 1994), suggesting that cerein 8A is not a complex bacteriocin. Total loss of activity was observed after incubation at 87°C or higher, but activity was maintained at 80°C, indicating the inhibitory compound was relatively heat stable.

Some studies have been addressed the use of bacteriocins for food protection. *Bacillus* strains cause the inhibition of *Clostridium botulinum* in challenge studies on surimi nuggets (Lyver *et al.* 1998). Inhibition of *L. monocytogenes* has been already described for some foods such as meats (Ming *et al.* 1997) and cheese (Ennahar *et al.* 1998). However, increased tolerance of *L. monocytogenes* to conventional bacteriocins, such as nisin and pediocin, has been reported (van Schaik *et al.* 1999; Rasch and Knochel 1998). Therefore, research for new products presenting antimicrobial activity is a very important field. In addition, current starters were not inhibited by cerein 8A, which is an attractive property of this bacteriocin for food industry.

Bacteriocins have gained importance as natural biopreservatives for control of spoilage and pathogenic organisms in foods. This study indicates the importance of the bacteriocin produced by *Bacillus cereus* 8A against pathogenic microorganisms such as *L. monocytogenes* and *C. perfringens*. The identification and characterisation of bacteriocins, and exploring their potential use in the biological control of pathogenic and spoilage microorganisms, addresses a very important aspect of food protection.

4.1.7 Resumo

O objetivo desta pesquisa foi investigar a produção de bacteriocina pelo *Bacillus* spp. isolado de solo da região Sul do Brasil. A partir da linhagem de *B. cereus* 8A foi identificada uma bacteriocina com efeito inibitório. A atividade antimicrobiana foi observada inicialmente na fase exponencial de crescimento e obtendo o máximo de atividade na fase estacionária. Obteve-se uma bacteriocina bruta do sobrenadante da cultura, que foi testada contra bactérias indicadoras incluindo a *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* e outras espécies importante de *Bacillus*. Bactérias clinicamente relevantes como *Streptococcus bovis* e *Micrococcus luteus* também foram inibidos. A bacteriocina foi estável até 80° C, mas perdeu sua atividade quando a temperatura atingiu 87° C. Verificou-se a resistência contra a ação proteolítica da tripsina e papaína,

porém foi sensível a ação da proteinase K e pronase E. Atividade da bacteriocina foi observada em uma faixa de pH de 5,0-8,0. Conclui-se que a bacteriocina produzida pelo *B. cereus* 8A foi caracterizada, apresentando amplo espectro de atividade e um potencial uso como biopreservativo em alimentos.

4.1.8 References

- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Bem Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S. and Boudabous, A. (2001) Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 2434-247.
- Clauss, D. and Berkeley, R.C.W. (1986) Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, vol 2, ed. Sneath, P.H.A. pp. 1105-1141. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Eijsink, V.G.H., Skeeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B. and Nes, I.F. (1998) Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3275-3281.
- Ennahar, S., Assobhei, O. and Hasselmann, C. (1998) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *Journal of Food Protection* **61**, 186-191.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C. and Urdaci, M.C. (1998) Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 42-50.
- Keppler, K., Geisen, R. and Holzapfel, W.H. (1994) An α -amylase sensitive bacteriocin of *Leuconostoc carnosum*. *Food Microbiology* **11**, 39-45.
- Kimura, H., Sashihara, T., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (1998) Novel bacteriocin of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. *Annals of New York Academy of Sciences* **864**, 345-348.
- Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 337-349.

- Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 39-86.
- Lee, K.H., Jun, K.D., Kim, W.S. and Paik, H.D. (2001) Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 146-151.
- Lyver, A., Smith, J.P., Austin, J., and Blanchfield, B. (1998) Competitive inhibition of *Clostridium butulinum* type E by *Bacillus* species in a value-added seafood product packaged under a modified atmosphere. *Food Research International* **31**, 311-319.
- Mah, J.H., Kim, K.S., Park, J.H., Byun, M.W., Kim, Y.B., and Hwang, H.J. (2001) Bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from kimchi. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 577-584.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S.R. and Richard, J. (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* **72**, 249-263.
- Makinen, K.K. and Makinen, P.L. (1987) Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by the human oral bacterium *Bacillus cereus* (strain SOC-67). *Journal of Biological Chemistry* **262**, 12488-12495.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A J. and Berkeley, C.W. (1972) Methods for studying bacteriocins. In *Methods in Microbiology*, vol. 7, ed. Norris, J.R and Ribbons, D. pp. 315-412. New York: Academic Press.
- Milles, H., Lesser, W. and Sears, P. (1992) The economic implication of bioengineered mastitis control. *Journal of Dairy Science* **75**, 596-605.
- Ming, X., Weber, G.H., Ayres, J.W. and Sandine, W.E. (1997) Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *Journal of Food Science* **62**, 413-415.
- Motta, A.S. and Brandelli, A. (2002) Characterisation of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 63-70.
- Ennahar, S., Assobhei, O. and Hasselmann, C. (1998) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *Journal of Food Protection* **61**, 186-191.

- Navaratna, M.A.D.B., Sahl, H.G., and Tagg, J.R. (1998) Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4803-4808.
- Nettles, C.G. and Barefoot, S.F. (1993) Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* **56**, 338-356.
- Oliveira, S.S., Abrantes, J., Cardoso, M., Sordelli, D. and Bastos, M.C.F. (1998) Staphylococcal strains involved in bovine mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides. *Letters in Applied Microbiology* **27**, 287-291.
- Oscariz, J.C. and Pisabarro, A.G. (2000) Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 361-369.
- Podile, A.R. and Prakash, A.P. (1996) Lyses and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1. *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 533-538.
- Rasch, M. and Knochel, S. (1998) Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Letters in Applied Microbiology* **27**, 275-278.
- Tagg, J.R., Dajani, A S. and Wannamaker (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriology Reviews* **40**, 722-756.
- Valdés Stauber, N., Götz, H. and Busse, M. (1991) Antagonistic effect of coryneform bacteria from red smear cheese against *Listeria* species. *International Journal of Food Microbiology* **13**, 119-130.
- van Schaik, W., Gahan, C.G.M. and Hill, C. (1999) Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3147. *Journal of Food Protection* **62**, 536-539.
- von Döhren, H. (1995) Peptides. In *Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production*, ed. Vining, L.C., Stuttard, C. pp. 129-171. Newton: Butterworth-Heinemann.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., and Shirata, A. (2001) Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* **91**, 181-187.

4.2 ARTIGO 2

4.2.1 Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus* 8A.

4.2.2 Abstract

Aims: To investigate the mode of action of cerein 8A, a bacteriocin produced by the soil bacterium *Bacillus cereus* 8A.

Methods and Results: The effect of cerein 8A was tested against *Listeria monocytogenes*, resulting in a bactericidal effect with a concentration of 400 AU ml⁻¹. Cerein 8A was also bactericidal against *Bacillus cereus* at 200 AU ml⁻¹, while decrease of spore outgrowth was observed with a dose of 400 AU ml⁻¹. Cerein 8A inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis; higher inhibition was achieved when the chelating agent EDTA was co-added with the bacteriocin. The effect of cerein 8A on *B. cereus* and *L. monocytogenes* was also investigated by Fourier transform infrared spectroscopy. Treated cells showed important frequency increase in 2929 cm⁻¹ and a decrease in 1400 cm⁻¹ band, corresponding to assignments of fatty acids.

Conclusions: Cerein 8A was bactericidal to Gram-positive bacteria, and also showed inhibitory effect against Gram-negative. There is evidence that its mode of action is disturbing cell membranes.

Significance and impact of study: The knowledge of the mode of action of bacteriocins is an essential step to propose its use as antimicrobial agent or food preservative.

4.2.3 Introduction

Bacteriocins are peptidic antibiotics produced by a number of different bacteria that often have an antimicrobial effect on closely related organisms (Tagg *et al.* 1976; Klaenhammer 1993). Bacteriocins have been extensively studied because their potential for use as natural biopreservatives in the food industry and as antimicrobials in pharmaceuticals (Kolter and Moreno 1992; Milles *et al.* 1992). Those produced by lactic acid bacteria are mostly studied because of their particular importance in the dairy industry (Delves-Broughton 1990), and a large number of bacteriocins have been described as a result of a huge amount of research work in recent years (Jack *et al.* 1995). Bacteriocins were classified considering their chemical structures, stability, and mode of action: I, lantibiotics; II, small heat-stable peptides; III, large heat-labile proteins and IV, complex proteins that require carbohydrate or lipid moieties for activity (Klaenhammer 1993).

The mechanisms of action of peptide antibiotics are diverse. The bacterial membrane is the target for most bacteriocins (Klaenhammer 1993). The type-A lantibiotics nisin, subtilin, Pep5 and epidermin have novel secondary modes of action in addition to their well-established lytic activity (Sahl and Bierbaum 1998). This kind of functional duality, i.e. one molecule having dual antibiotic activity, has been considered emerging theme in antimicrobial mechanism (McCafferty *et al.* 1999).

A number of bacteriocins or bacteriocin-like inhibitory substances have been described from *Bacillus* spp., such as coagulatin (Hyronimus *et al.* 1998); cerein 7 (Oscáriz *et al.* 1999), subtilosin (Zheng and Slavik 1999) and thuricin 7 (Cherif *et al.*

2001), some of them presenting a broad spectrum of antibacterial activity. *B. cereus* 8A was isolated from soils of native woodlands of south of Brazil as a strain which exhibited antagonistic action against relevant pathogenic and food spoilage microorganisms. Its activity includes *L. monocytogenes*, *B. cereus*, and mastitis agents (Bizani and Brandelli 2002). The antimicrobial activity was lost by treatment with proteases and TCA, indicating a bacteriocin-like substance.

This work is a step towards exploring the potential use of cerein 8A as an antimicrobial substance for food use, to prevent proliferation of *L. monocytogenes* and other relevant pathogenic and spoilage microorganisms. The aim of this paper was to investigate the mode of action of cerein 8A.

4.2.4 Materials and methods

4.2.4.1 Bacterial strains

The producer strain was *Bacillus cereus* 8A isolated and characterized as described elsewhere (Bizani and Brandelli 2002). Indicator strains were *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, stored in 20% glycerol at -21°C , and propagated twice in BHI broth (Becton & Dickinson, Cockeysville) before used.

4.2.4.2 Bacteriocin

For the production of bacteriocin, *B. cereus* 8A was grown in 200 ml of BHI broth at 30°C in a rotatory shaker at 125 cycles min⁻¹ for 32 h. The cells were harvested by centrifugation at 10,000 x g for 15 min and the culture supernatant was filtered through a 0.22 µm membrane (Millipore, Bedford). Bacteriocin activity was further purified by precipitation with ammonium sulfate at 65% saturation. The pellet was resuspended in phosphate buffered saline (PBS) and extracted with 1-butanol (0.7 vol). After the butanol was evaporated under reduced pressure, bacteriocin was stored at 4°C until used for antimicrobial assay.

4.2.4.3 Bacteriocin activity assay

The antimicrobial activity was detected by agar disc diffusion assay (Motta and Brandelli 2002). Aliquots of 20 µl bacteriocin preparation were applied on 6 mm cellulose discs on agar plates previously inoculated with 0.5 McFarland suspension of the indicator strain. Inhibition zones were measured after incubation for 24 h at 37°C. Bacteriocin titer was determined by the serial dilution method previously described by Mayr-Harting *et al.* (1972).

4.2.4.4 Growth determination

The determination of viable cell counts (cfu ml⁻¹) was carried out as described previously (Motta and Brandelli 2002). Bacterial suspensions were diluted to 10⁻⁸ in 8.75 g l⁻¹ NaCl, samples were homogenized and then loaded (20 µl) in triplicate onto

nutrient agar (Becton Dickinson, Cockeysville) plates. The plates were incubated for 24 h at 37°C and counts performed for 30-300 colonies.

In parallel, the optical density (O.D.) of the cultures was measured at 600 nm.

4.2.4.5 Effect and mode of action against indicator organisms

An overnight culture of each indicator organism was obtained by growing in BHI at 37°C. A sample (1 ml) of these cultures were inoculated in Erlenmeyer flasks containing 99 ml BHI and incubated at 37°C. The growth was monitored at different intervals by O.D. 600 nm and by viable cell counts (cfu ml⁻¹).

Bacteriocin preparation (final concentration 120 or 400 AU ml⁻¹) was added to cultures of *L. monocytogenes* and *B. cereus* and the effect of bacteriocin on turbidity and on the number of viable cells was determined at 2 h intervals.

The effect of cerein 8A on gram-negative bacteria (*E. coli* and *S. Enteritidis*) was evaluated using 400 AU ml⁻¹ concentrations. To evaluate the effect of chelator on bacteriocin activity, the addition of 20 mmol l⁻¹ disodium EDTA (Riedel, Hannover) was tested. A control with sole EDTA was done.

4.2.4.6 Inhibition of *B. cereus* spores

Spore production by *B. cereus* ATCC 9634 was carried out on nutrient agar as reported by Roberts and Hoover (1996). Samples were harvested after 10 days of incubation, resuspended in sterile physiological water and treated at 80°C for 10 min. Aliquots were serially diluted with sterile water to the initial concentration of 10⁶ spores

ml⁻¹. Cerein 8A was added to tempered Plate Count Agar (PCA, Mast Diagnostics, Merseyside) to achieve 200 or 400 AU ml⁻¹ final concentration. The initial spore concentration was inoculated in PCA amended with cerein 8A, and PCA alone to determine the starting spore concentration. Plates were incubated at 37°C for up to 5 days before counting. Alternatively, spores suspension was added to BHI broth containing 400 AU ml⁻¹ cerein 8A and spore germination was followed during incubation at 37°C.

4.2.4.7 Hemolysis and hemmagglutination

The hemolysis and hemmagglutination properties of the bacteriocin preparations were verified with human and sheep erythrocytes. Tests were carried out essentially as described by Bizani and Brandelli (2001). Hemolysis was observed by visual inspection of sheep blood agar plates. A clinical isolate of *Aeromonas* sp. with known hemolytic activity was used as positive control.

For hemagglutination tests the strain 8A was grown on trypticase soy agar (Accumedia, Baltimore) and then was suspended in 0.5 ml sterile PBS. A volume of 50µl was mixed with the same volume of a 6% (v/v) washed erythrocyte suspension on a white porcelain tile. A negative control of erythrocytes suspension and PBS was done. The reactions were visualized in a bright-field microscope, and considered positive if agglutination occurred within 10-15 min incubation.

4.2.4.8 Hydrolytic activities

The assay of murein hydrolytic activity was carried out on peptidoglycan agar plates (Beukes *et al.* 2000). Commercial lysozyme (Merck, Darmstadt) was used as positive control. To check if the compound had phospholipase activity, the bacteriocin was spotted onto egg yolk plates (Habermann and Hardt 1972), using commercial phospholipase (Sigma, St. Louis) as control. The investigation of proteolytic activity was carried out on skimmed milk agar plates or using azocasein as substrate (Riffel and Brandelli 2002), with pronase E (Sigma, St. Louis) as positive control. Bacteriocin dilutions were spotted onto the plates and the appearance of clear zones was monitored.

4.2.4.9 Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

Bacteriocin (400 AU ml⁻¹) was added to cell suspensions of about 10⁶ cfu ml⁻¹ of both *L. monocytogenes* and *B. cereus*. After incubation for 60 min, treated and control cells were washed three times with 0.9% NaCl. Ten microlitres of each bacterial sample was evenly applied onto a ZnSe optical plate, dried in approximately 5 min under vacuum and ready for FTIR measurement. A Spectrum One FTIR spectrometer (Perkin Elmer, Uberlingen) equipped with an attenuated transmission reflectance (ATR) device was used. The resolution was 2 cm⁻¹ and at least 4 scans were co-added for each sample.

4.2.5 Results

4.2.5.1 Effect on *Listeria monocytogenes*

The effect of bacteriocin concentration on the survival of *L. monocytogenes* is shown in Fig. 1. The number of viable cells was reduced as increased the bacteriocin concentration. Complete inhibition of growth was observed with 400 AU ml⁻¹, presenting an EC₅₀ (defined as the drug concentration that produces 50% maximum effect) of approximately 120 AU ml⁻¹.

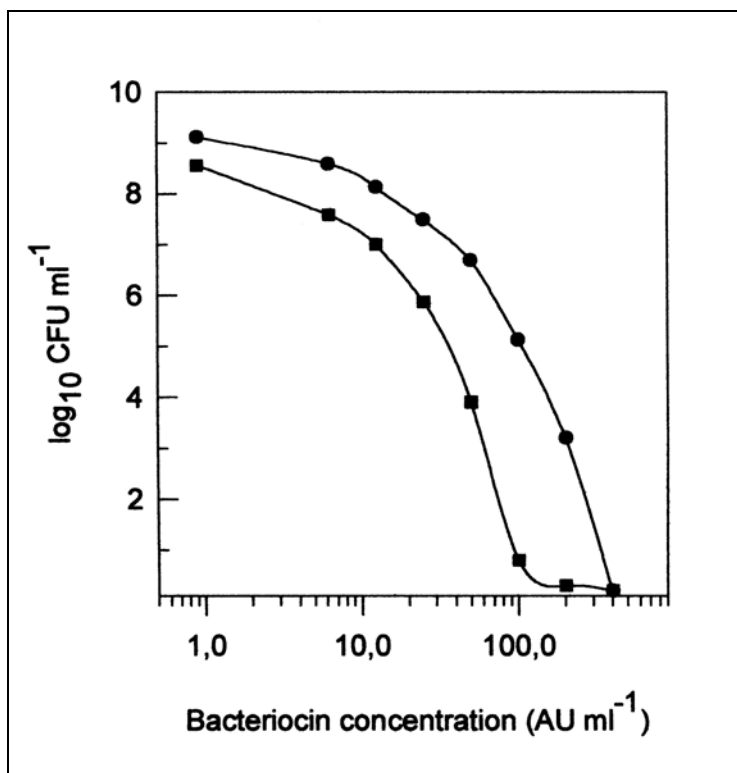


Fig. 1. Effect of cerein 8A concentration on survival of *Listeria monocytogenes* (circles) and *Bacillus cereus* (squares). Bacterial cells were incubated for 60 min in the presence of increased dose of cerein 8A and then viable cell counts were determined. Each point represents the mean of three independent experiments.

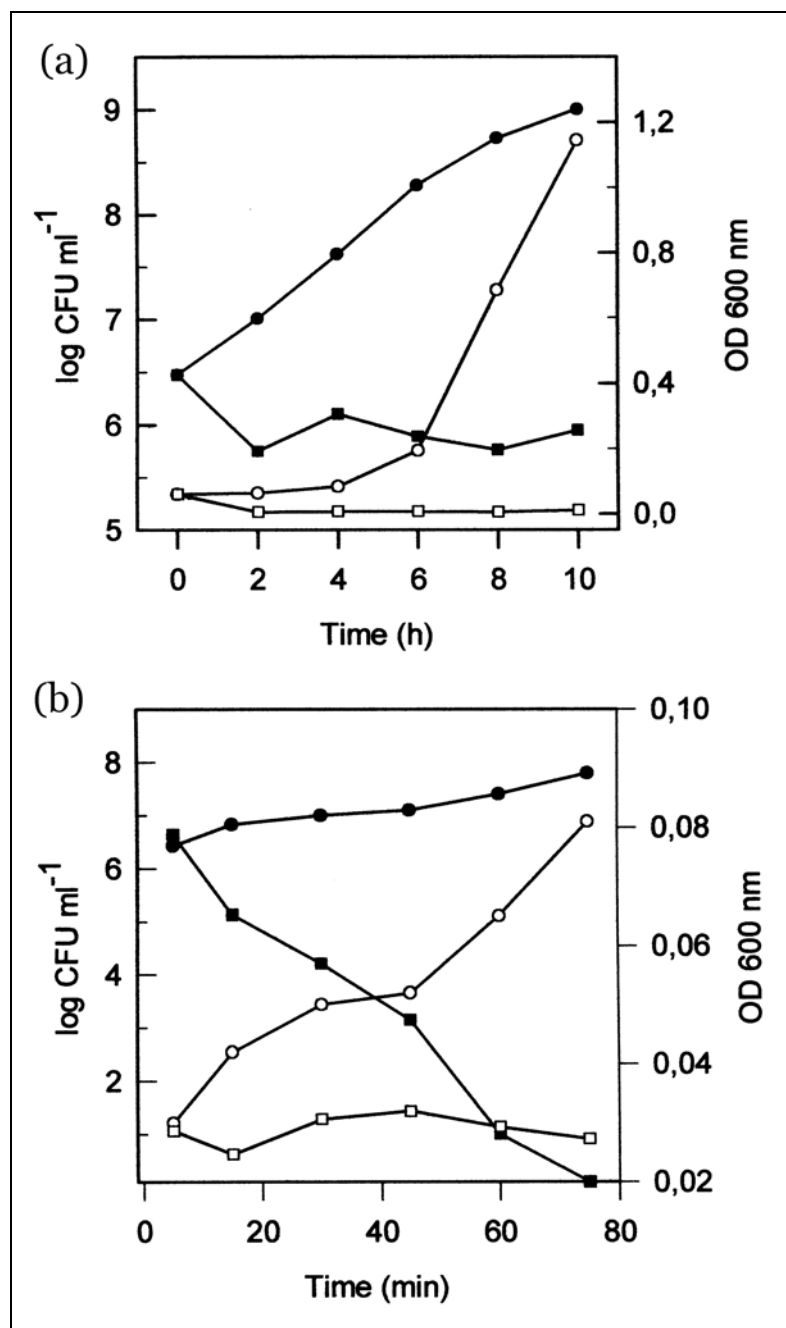


Fig. 2. Effect of cerein 8A on the growth of *Listeria monocytogenes*. Optical density (open symbols) and viability (black symbols) were monitored in control (circles) and treated (squared) cells with a final concentration of (a) 120 AU ml⁻¹ or (b) 400 AU ml⁻¹. Each point represents the mean of three independent experiments.

The kinetics of the bacteriocin effect on growth of *L. monocytogenes* is shown in Fig. 2. A dilution of bacteriocin (120 AU ml^{-1} final concentration) added to a cell suspension of *L. monocytogenes* resulted in a difference in viable counts of 3 log cycles related to the control (Fig. 2a). The addition of bacteriocin immediately inhibited the growth of *L. monocytogenes* resulting in a decrease in the O.D. during the incubation (Fig. 2a), which indicate that cell lyses was triggered in *L. monocytogenes* after cell death. When a concentration of 400 AU ml^{-1} was used, a drastic decrease in the viable counts was detected, reaching zero after 75 min (Fig. 2b).

4.2.5.2 Effect on *Bacillus cereus*

Complete inhibition of *B. cereus* growth was achieved with a cerein 8A dose of 200 AU ml^{-1} , and the EC50 was observed at approximately 40 AU ml^{-1} (Fig. 1).

The addition of bacteriocin (120 AU ml^{-1} final concentrations) to a cell suspension of *B. cereus* resulted in an important decrease in the number of viable cells over a period of 10 h (Fig 3a). The O.D. readings of bacteriocin-treated *B. cereus* suspensions remained nearly constant during this period (Fig. 3a). The use of a higher dose of cerein 8A (400 AU ml^{-1}) resulted in a rapid decrease in the viable cell counts, reaching zero within 60 min, in parallel with a decrease in the O.D. readings (Fig. 3b).

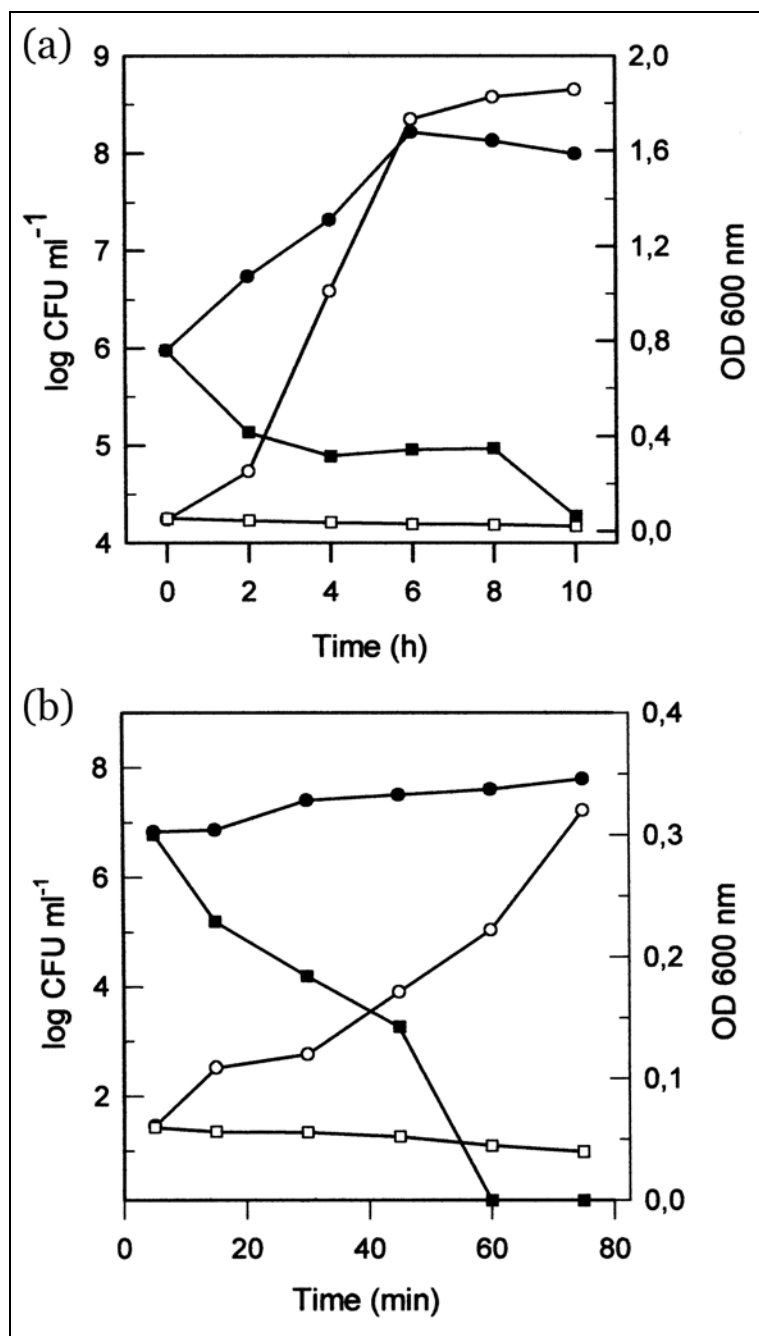


Fig. 3 Effect of cericin 8 on the growth of *Bacillus cereus*. Optical density (open symbols) and viability (black symbols) were monitored in control (circles) and treated (squared) cells with a final concentration of (a) 120 AU ml⁻¹ or (b) 400 AU ml⁻¹. Each point represents the mean of three independent experiments.

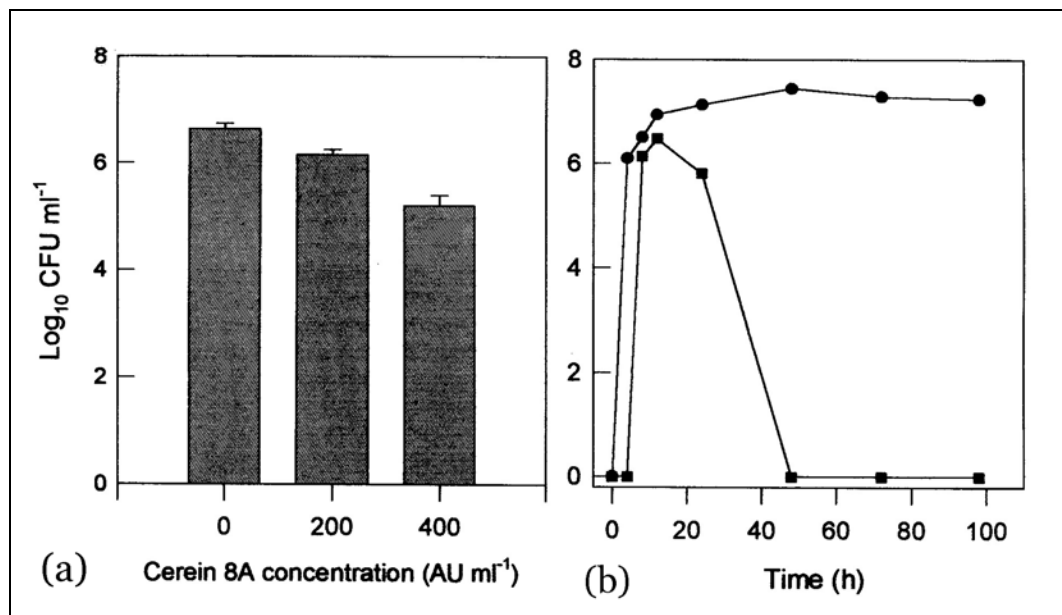


Fig. 4. Effect of cerein 8A on outgrowth of spores of *B. cereus*. (a) Spore suspension was inoculated in PCA plates containing 200 or 400 ml^{-1} cerein 8A or PCA alone as control. Bars are the mean \pm s.e.m. of the three independent experiments. (b) Spore were inoculated in BHI broth containing 400 AU ml^{-1} (squares) or BHI alone (circles), and viability was evaluated at indicated times. Each point represents the mean of three experiments.

The effect of cerein 8A on the survival of spores of *B. cereus* ATCC was investigated. The bacteriocin caused a decrease of 1 log cycle in spore germination (Fig. 4a). As cerein 8A concentration decreased to 200 AU ml^{-1} no significant inhibition of colony formation was observed. A dilution of bacteriocin (400 AU ml^{-1} final concentration) added to a suspension of 10^6 spores ml^{-1} of *B. cereus* caused an inhibition of spore germination (Fig. 4b). Viable counts were not observed after 48 h incubation, while the control values without bacteriocin reached 10^8 cfu ml^{-1} .

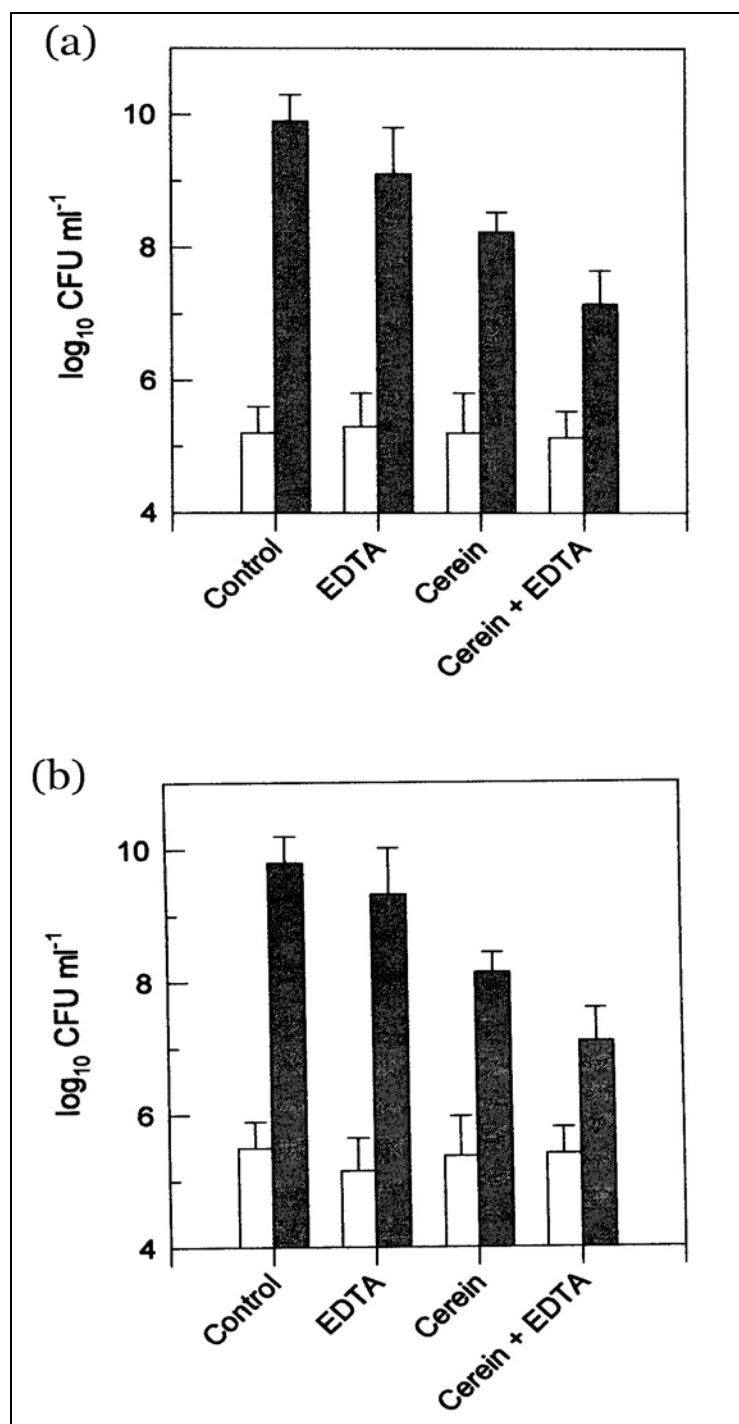


Fig. 5. Effect of cerein 8A on gram-negative bacteria. The viability of *Salmonella* Enteritidis (a) or *Escherichia coli* (b) monitored after treatment with 400

AU ml⁻¹ cerein 8A, 20 mmol l⁻¹ EDTA, or cerein 8A plus EDTA. Bars are the mean \pm s.e.m. of three experiments.

4.2.5.3 Effect on Gram-negative bacteria

A dilution of bacteriocin (400 AU ml⁻¹ final concentration) added to a cell suspension of *S. Enteritidis* resulted in significant differences in viable counts related to the controls without bacteriocin (Fig. 5a). The addition of bacteriocin plus EDTA resulted in higher inhibition than the bacteriocin alone. Similar results were obtained with *E. coli* (Fig. 5b).

4.2.5.4 Hemolysis, hemagglutination and hydrolytic activities

The bacteriocin was assayed for hemolytic and hemagglutination activities, resulting in negative reactions against human and sheep erythrocytes. Negative reactions for muramidase, phospholipase and protease were also observed (data not shown).

4.2.5.5 Infrared spectroscopy

The effect of cerein 8A on macromolecular structures of *L. monocytogenes* and *B. cereus* was analyzed by FTIR spectroscopy. The possible assignments of the individual bands are listed in Table 1. The IR spectra showed characteristic bands in the wave range 3300 cm⁻¹ for nucleic acids structures, 3000-2800 cm⁻¹ for cell membrane fatty acids, 1800-1500 cm⁻¹ for cell proteins, 1500-1400 cm⁻¹ for fatty acids, 1500-1200 cm⁻¹ for proteins and phospholipids and 1200-900 cm⁻¹ for glycoconjugates. Treated cells of *L. monocytogenes* showed important differences in the frequency 1400 cm⁻¹ and

minor in 2890 cm^{-1} and 1750 cm^{-1} (Fig. 6). No important differences were observed in the $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ (deformation of carbohydrates) or $1660\text{-}1535\text{ cm}^{-1}$ (amide I and II) bands. FTIR spectra of the cell biomass of *B. cereus* treated with cerein 8A showed very similar changes.

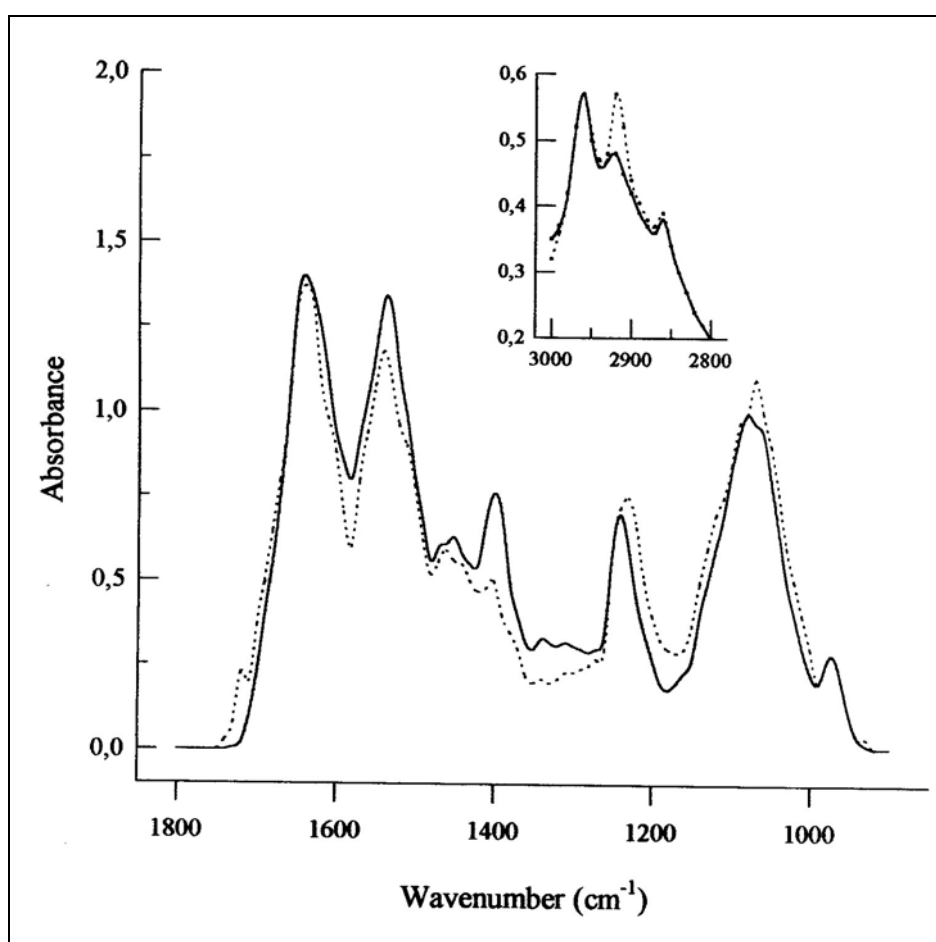


Fig. 6. FTIR spectra of cell biomass of *Listeria monocytogenes*. Cell suspensions of *L. monocytogenes* were treated with 400 AU mL⁻¹ cerein 8A for 60 min, then washed and dried onto a ZnSe optical plate. The infrared spectra of treated (dashed line) or untreated (solid line) biomass were recorded using the ATR methodology. Insert: detail of spectra in the range 3000 - 2800 cm⁻¹.

Table 1. FTIR absorption bands of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*

Frequency (cm ⁻¹)	Assignment*
3280	H-bonded OH groups, NH ₂ stretching
2960-2920	Aliphatic C-H stretching (fatty acids)
1660-1535	NH ₂ bending, C=O, C=N stretching (amide I and II)
1450	C-H deformations in aliphatics
1398-1390	C-H bending, -CH ₃ stretching (fatty acids)
1240-1230	C-N stretching (amide III)
1200-1000	C-O, PO ₂ ⁻ stretching (glycopeptides, ribose)

* Assignments according Rodriguez (2000) and Maquelin *et al.* (2002).

4.2.6 Discussion

Cerein 8A, an antimicrobial peptide produced by *B. cereus* 8A shown bactericidal activity against important food pathogen and spoilage bacteria. This report data supporting this substance has a bactericidal effect on *L. monocytogenes* and *B. cereus*.

The important decline in the number of living cells of both *B. cereus* and *L. monocytogenes* observed over a period of 2 h after the addition of bacteriocin suggested that the mode of action was bactericidal. This was supported by the decrease of O.D. readings, which indicated that the cells of these indicator strains were lysed. The effect

can be dependent on the assay conditions, such as the amount and purity of bacteriocin, indicator strain and its cellular concentration (De Vuyst and Vandamme 1994). Indeed, Boucabeille *et al.* (1998) found the effect of linenscin OC2 to be bactericidal and bacteriolytic on *L. innocua*, while bacteriostasis was observed for a low dose of linenscin OC2. Similar results were reported for a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens* ATCC 9175 (Motta and Brandelli 2002).

Cerein 8A display similar kinetics against *B. cereus* and *L. monocytogenes*, killing the bacterial cells within 60 min interval. Although this bacteriocin appears to be effective against gram-positive bacteria (Bizani and Brandelli 2002), it seems to be most active against *Bacillus* sp., since a higher dose was necessary to kill *L. monocytogenes*. This result agrees with the fact of several bacteriocins display its activity against closely related species (Tagg *et al.* 1976; Klaenhammer 1993).

Although the bacteriocin cerein 8A appears to not kill *E. coli* and *S. Enteritidis* cells, it caused a significant inhibition of their growth. This effect was increased when the chelating agent EDTA was co-added. This effect was similar to reported for nisin (Cutter and Siragusa 1995), and may be explained by the weakening of external plasma membrane caused by chelating agents through sequestering magnesium (Montville and Bruno 1994).

Cerein 8A also inhibit spore outgrowth of *B. cereus*, similar to observed for coagulins I4, a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus coagulans* (Hyronymous *et al.* 1998). This effect is very relevant to protection against spore-forming bacteria, since cerein 8A was inhibitory to relevant food-borne *Bacillus* and *Clostridium* species (Bizani and Brandelli 2002).

Antimicrobial activity has been associated with molecules frequently exported by the bacteria, is such as hemolysins or hydrolytic enzymes (Lai *et al.* 2002; Parret and De Mot 2002). Some bacteriocins produced by food isolated bacteria, such as linescin OC2, shown hemolytic activity (Boucabeille *et al.* 1998). However, this was not observed for cerein 8A since no one of these activities was associated with the antimicrobial activity.

The effect of cerein 8A on *B. cereus* and *L. monocytogenes* was accessed by FTIR spectroscopy. The spectra revealed important changes in the assignments for symmetrical C=O bonds, in the region corresponding to membrane fatty acids (Rodriguez 2000; Filip and Hermann 2001). This result may indicate that the cerein 8A cause perturbation in the bacterial membrane, which could result in dissipation of proton motive force and leakage of intracellular contents. FTIR has been used for identification of microorganisms (Mariey *et al.* 2001; Maquelin *et al.* 2002), but little attempt has been addressed to investigation of antimicrobial mechanism. The interaction of surfactin (Carrillo *et al.* 2003) and gramicidin S (Akinoglu *et al.* 2001) with membrane lipids has been already demonstrated by FTIR studies. Since phospholipase activity was not associated to cerein 8A, it would be a pore-forming peptide. The type A lantibiotics, to which belongs nisin, pediocin, and epidermin, like many other amphiphilic antimicrobial peptides, exert their activity by disruption of the functional barrier of microbial cytoplasmic membranes (McCafferty *et al.* 1999). In addition to nisin and epidermin, Lipid I or II binding has been observed for lantibiotics subtilin and mesarcidin produced by *Bacillus* spp. (Brötz *et al.* 1998; Okeley *et al.* 2003).

4.2.7 Resumo

Este trabalho teve como objetivo investigar o modo de ação da Cereína 8A, produzida por uma linhagem de *B. cereus* 8A isolado de solo. O efeito da Cereína 8A foi testado contra *Listeria monocytogenes*, mostrando um efeito bactericida na concentração de 400 UA ml⁻¹. A ação bactericida também foi observada contra o *B. cereus* na concentração de 200 UA ml⁻¹, porém atividade contra seus esporos foi observado na dose de 400 UA ml⁻¹. A Cereína 8A inibiu o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis e apresentou maior inibição quando agentes quelantes, como EDTA foram adicionados à bacteriocina. O efeito da Cereína 8A em *B. cereus* e *L. monocytogenes* foi analisado por espectrofotometria de luz infravermelha. À análise das células tratadas mostrou um aumento importante na frequência de 2920 cm⁻¹ do espectro e uma diminuição na frequência de 1400 cm⁻¹, banda correspondente a designação de ácidos graxos. A cereína 8A teve um efeito bactericida frente às bactérias gram-positivas, mostrando também um efeito contra gram-negativas. Uma hipótese provável do seu modo de ação estaria sobre a desestruturação da membrana celular.

4.2.8 References

- Akinoglu, B.G., Gheith, M. and Severcan, F. (2001) Thermodynamics study of gramicidin S and dipalmitoylphosphatidylcholine model membrane interactions based on the FTIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **565-566**, 281-285.
- Beukes M, Bierbaum G, Sahl HG, Hastings JW (2000) Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 23-28.
- Bizani, D, Brandelli A (2001) Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination of *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. *Brazilian Journal of Microbiology* **32**, 334-339.
- Bizani, D, Brandelli A (2002) Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 152-159.
- Boucabeille C., Letelier, L Simonet J. M., Henckes, G. (1998) Mode of action of linenscin OC2 against *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3416-3421.

- Brötz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P.E. and Sahl, H.G. (1998) The lantibiotic mesarcidin inhibits peptidoglycan biosynthesis by targeting lipid II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 154-160.
- Carrillo, C., Teruel, J.A., Aranda, F.J. and Ortiz, A. (2003) Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1611**, 91-97.
- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S. and Boudabous, A. (2001) Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG 1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 243-247.
- Cutter, C.N. and Siragusa, G.R. (1995) Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *Journal of Food Protection* **58**, 977-983.
- Delves-Broughton, J. (1990) Nisin and its use as a food preservative. *Food Technology* **44**, 100-118.
- De Vuyst, L. and Vandamme e.E. J. (1994) *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications*. London: Blackie Academic & Professional, 540 p.
- Filip, Z. and Hermann, S. (2001) An attempt to differentiate *Pseudomonas* spp. and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy. *European Journal of Soil Biology* **37**, 137-143.
- Habermann, E. and Hardt, K.L. (1972) A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analytical Biochemistry* **50**, 163-170.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C. and Urdaci, M.C. (1998) Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 42-50.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. (1995) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **59**, 171-200.
- Klaenhammer, T. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 39-86.

- Kolter, R. and Moreno, F. (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annual Review of Microbiology* **46**, 141-163.
- Lai, A.C.Y., Tran, S. and Simmonds, S.R. (2002) Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiology Letters* **215**, 133-138.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., van den Braak, N., Endtz, H.Ph., Naumann, D. and Puppels, G. (2002) Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* **51**, 255-271.
- Mayr-Harting, A., Hedjes, A. J, and Berkeley, C. W. (1972) Methods for studying bacteriocins. In: Norris, J. R., Ribbons, D. W. (Eds). *Methodos in Microbiology*. New York: Academic Press, **7**, 115p.
- Mariey, L., Signolle, J.P., Amiel, C. and Travert, J. (2001) Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy* **26**, 151-159.
- McCafferty, D.G., Cudic, P., Yu, M.K., Behenna, D.C. and Kruger, R. (1999) Synergy and duality in peptide antibiotic mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**, 672-680.
- Mengin-Lecreulx, D., Flouret, B. and van Heijenoort, J. (1982) Cytoplasmic steps of peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **151**, 1109-1117.
- Milles, H., Lesser, W., Sears, P. (1992) The economic implication of bioengineering mastitis control. *Journal of Dairy Science* **75**, 596-605.
- Montville, T.J. and Bruno, M.E.C. (1994) Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 53-74.
- Motta, A.S., Brandelli, A. (2002) Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 63-70.
- Okeley, N.M., Paul, M., Stasser, J.P., Blackburn, N. and van der Donk, W.A. (2003) SpaC and NisC, the cyclases involved in subtilin and nisin biosynthesis, are zinc proteins. *Biochemistry* **42**: 13613-13624.

- Oscáriz, J.C., Lasa, I. and Pisabarro, A.G. (1999) Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiology Letters* **178**, 337-341.
- Oscáriz, J.C. and Pisabarro, A.G. (2000) Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 361-369.
- Parret, A.H.A., De Mot, R. (2002) Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria. *Trends in Microbiology* **10**, 107-112.
- Riffel, A. and Brandelli, A. (2002) Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **29**, 255-258.
- Roberts CM, Hoover DG (1996) Sensivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 363-368.
- Rodriguez, M.P.Q. (2000) Fourier transform infrared (FTIR) technology for the identification of microorganisms. *Clinical Microbiology Newsletter* **22**, 57-61.
- Sahl, H.G. and Bierbaum, G. (1998) Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology* **52**, 41-79.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.K. (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriology Reviews* **40**, 722-756.
- Zheng, G. and Slavik, M.F. (1999) Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Letters in Applied Microbiology* **28**, 363-367.

4.3 ARTIGO 3

4.3.1 Purification and partial chemical characterization of cerein 8A, a bacteriocin produced by a soil isolate of *Bacillus cereus* 8A.

4.3.2 Abstract

The bacteriocin cerein 8A, produced by a *Bacillus cereus* strain isolated from soil of native woodlands of Brazil, was purified. The peptide was isolated by ammonium sulfate precipitation, 1-butanol extraction, and ion exchange chromatography on Q-Sepharose, resulting in a purification of 54-fold. The purified antimicrobial activity was lost by treatment with proteases and heat. Direct activity on polyacrylamide gels was observed, the purified bacteriocin corresponded to a 26 kDa peptide band. The native bacteriocin eluted at the void volume of Sephadex G-100, but within the included volume when a 1.5 M NaCl buffer was used, indicating it is secreted as large aggregates. The bacteriocin strongly bond to Phenyl Sepharose and Q-Sepharose, suggesting the presence of hydrophobic and acidic amino acids. The ultraviolet spectrum was typical of a polypeptide and the infrared spectrum indicates that the peptide contains an acyl group in its structure.

4.3.3 Introduction

Bacteriocin production is widespread among bacteria isolated from diverse environment (Riley and Wertz 2002). The bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) have been extensively studied because their potential use in food industry (Kim 1993; Barefoot and Nettles 1993). Nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*, is commercially available as biopreservative for many food

systems (Davies et al 1997). In addition, pediocin and lactacin has been successfully used as inhibitors of a number of pathogenic and spoilage microorganisms (Mulet-Powell *et al* 1998). Although the bacteriocin research is mostly on LAB, interesting bacteriocins and bacteriocin-like substances are produced by several other classes of bacteria such as *Bacillus* spp. (Oscáriz *et al.* 1999; Bizani and Brandelli 2002) and coryneform bacteria (Valdéz-Stauber and Scherer 1994; Motta and Brandelli 2002).

The use of bacteriocins as an alternative strategy of disease control has been already proposed (Milles *et al.* 1992). Although nisin has been used as “generally regarded as safe” biopreservative against relevant pathogens, some reports have described nisin-resistant strains (Crandall and Montville 1998; Rasch and Knochel 1998) indicating the need for alternatives to nisin use. However, purification of the antimicrobial peptides is an essential step before its proposal as natural food preservative or antimicrobial agent.

A large number of peptide antibiotics are produced by *Bacillus* species (Katz and Demain 1977). Although most these substances are active against gram-positive microorganisms, some compounds present a broad range of activity including also Gram-negative bacteria and fungi (Katz and Demain 1977). Interestingly, some of the peptide antibiotic produced by *Bacillus* spp. not only demonstrate antimicrobial activity but are also excellent biosurfactants (Lin *et al.* 1994).

The soil isolate *Bacillus cereus* 8A produces an antibacterial peptide, cerein 8A, which inhibits several Gram-positive bacteria including *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. and *Listeria monocytogenes* (Bizani and Brandelli 2002). The aim of this work was to purify and to determine some properties of cerein 8A.

4.3.4 Materials and methods

4.3.4.1 Bacteria

The producer strain *Bacillus cereus* 8A, isolated from soil of native woodlands of South of Brazil, was characterized elsewhere (Bizani and Brandelli 2002). Indicator strains were *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 and *Bacillus cereus* ATCC 14579. The bacteria were kept frozen at -21°C in BHI broth (Merck, Darmstadt, Germany) containing 20% (v/v) glycerol, and propagated twice in BHI broth before using.

4.3.4.2 Detection of antimicrobial activity

Antimicrobial activity was detected by agar disc diffusion assay (Motta and Brandelli 2002). Aliquots of 20 μl bacteriocin preparation were applied on 6 mm cellulose discs on agar plates previously inoculated with 0.5 McFarland suspension of the indicator strain. Inhibition zones were measured after incubation for 24 h at 37°C . Bacteriocin titre was determined by the serial dilution method previously described by Mayr-Harting *et al.* (1972).

4.3.4.3 Purification protocol

B. cereus 8A was cultivated aerobically in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 150 ml of BHI broth at 30°C , 180 cycles min^{-1} for 48 h. Cells were harvested by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 30 min at 4°C , and the resulting supernatant was filtered through 0.22 μm membranes (Millipore). The cell free culture filtrate was submitted to precipitation with ammonium sulfate to 65% saturation. The resulting pellet was resuspended in 10 ml phosphate buffered saline

(PBS) and then extracted twice with 6 ml of 1-butanol. The organic phases were combined and evaporated under reduced pressure. The resulting powder was resuspended in 10 mM phosphate pH 7.2 and applied to a column of Q-Sepharose (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), eluted with this same buffer followed by a gradient from 0 to 1.5 M NaCl. Fractions were monitored for A280nm and antimicrobial activity.

4.3.4.4 Gel permeation chromatography

Samples of cerein 8 were applied to a column of Sephadex G-100 (Pharmacia Biotech, Uppsala), eluted with PBS. Fractions were collected and evaluated for protein concentration (A280 nm) and antimicrobial activity. Alternatively, the column was eluted with PBS containing 1.5 M NaCl.

4.3.4.5 Direct detection on gels

Cerein 8A was analyzed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Aliquots of crude and purified bacteriocin were freeze-dried. Samples were suspended in 125 mM tris pH 6.8 containing 0.1% SDS, 20% glycerol, and then applied to 14% polyacrylamide gels. Electrophoresis was carried out as described elsewhere (Hames 1981) using a Mighty Small II apparatus (Hoefer Scientific) and 20 mA per gel. After running the gels were washed with sterile distilled water for removal of SDS and then flooded on plates containing Mueller-Hinton agar with 10^6 cfu/ml *L. monocytogenes*. Detection of antimicrobial activity was developed as described by Naclerio *et al.* (1993). Plates were incubated for 24 h at 37C and the presence of clearing zones was observed. Other gels were stained with Coomassie

blue to observe peptide bands (Neuhoff *et al.* 1994). Molecular weight (MW) standards were from Sigma (St. Louis).

4.3.4.6 Effects of enzymes, heat, pH and chemicals on bacteriocin activity

Samples of purified bacteriocin were treated at 37°C for 1 h with 2 mg ml⁻¹ final concentration of the following enzymes: papain, trypsin, proteinase K and pronase E. Samples were then boiled for 2 min to inactivate the enzyme. To analyse thermal stability, samples of bacteriocin were exposed to temperatures ranging 25 to 90°C for 30 min, and 121°C/15 lb in⁻² for 15 min. The activity of bacteriocin at different pH values was estimated by adjusting the pH of supernatant samples to pH 3 to 11. Chemicals (working concentrations in Table 2) were added to the bacteriocin and the samples were incubated for 1 h at 25°C before being tested for antimicrobial activity. After the treatments, the samples were tested for antimicrobial activity against *B. cereus* ATCC 14579.

4.3.4.7 Physical methods

The ultraviolet absorbance spectrum was recorded using a Shimadzu UV1601PC double beam spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo), from 200 to 600 nm at 0.5 nm resolution. The infrared spectrum was measured as a potassium bromide pellet. Four scans of the sample were taken using a Mattson 3020 FTIR spectrophotometer (Madison, USA).

4.3.5 Results

The bacteriocin produced by *B. cereus* 8A was purified from the culture supernatant by ammonium sulfate precipitation, extraction with 1-butanol, and ion exchange chromatography. The purification steps and the recovery values of the bacteriocin are given in Table 1. The extraction with 1-butanol resulted in important increase in purification fold. When ion-exchange chromatography using a Q-Sepharose was carried out, the protein peak eluted at nearly 1.3 M NaCl contained 100% of the antimicrobial activity (Fig. 1). The final specific activity of the purified bacteriocin was increased approximately 54-fold compared to that in the culture supernatant and the recovery was 6.7%. When the purity of the fractions containing bacteriocin activity was assessed by SDS-PAGE, a single protein band with an apparent molecular weight of 26 kDa was detected (Fig. 2).

Table 1. Purification of cerein 8A

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (AU)	Specific activity (AU mg ⁻¹)	Purification fold	Yield (%)
Supernatant	186.9	120,000	642	1	100
Precipitation	6.6	71,680	10,861	16.9	59.7
Extraction	0.70	74,200	106,000	165.1	61.8
Q-Sepharose	0.23	8,000	34,783	54.2	6.7

The unique peptide band was coinciding with antimicrobial activity observed in gels (Fig. 2). A single band of inhibition was also observed with culture supernatant, corresponding to the same molecular weight of purified bacteriocin. Studies on native bacteriocin revealed that it elutes at the void volume of Sephadex G-100, but enter at the included volume when the elution buffer contains high ionic

strength (Fig. 3). Similar results were obtained with both Sephadex G-50 and Sephadex G-150 (data not shown).

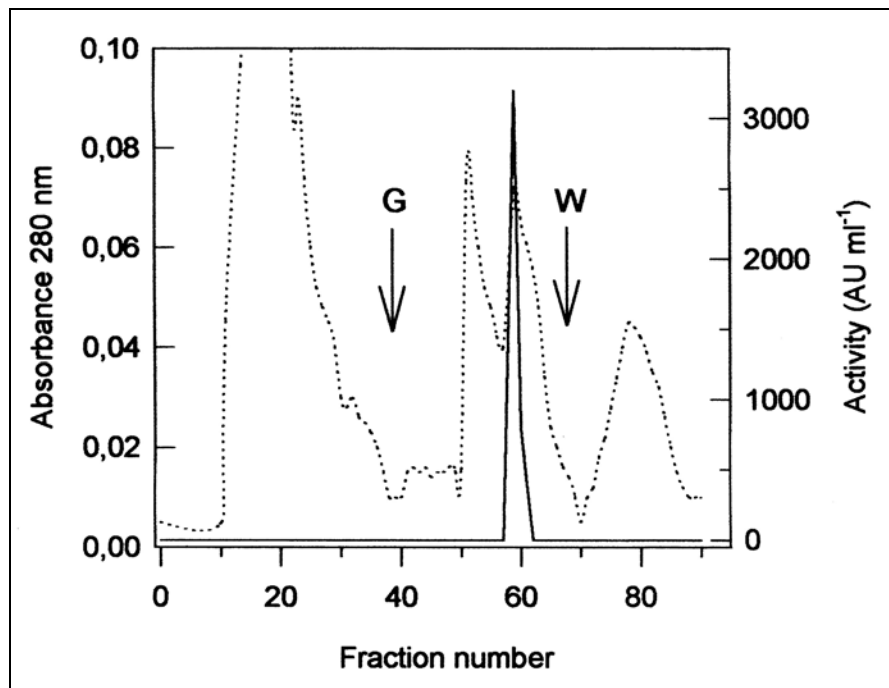


Fig. 1. Ion exchange chromatography of cerein 8A. Elution of Q-Sepharose column for protein (dotted line) and bacteriocin activity (full line).

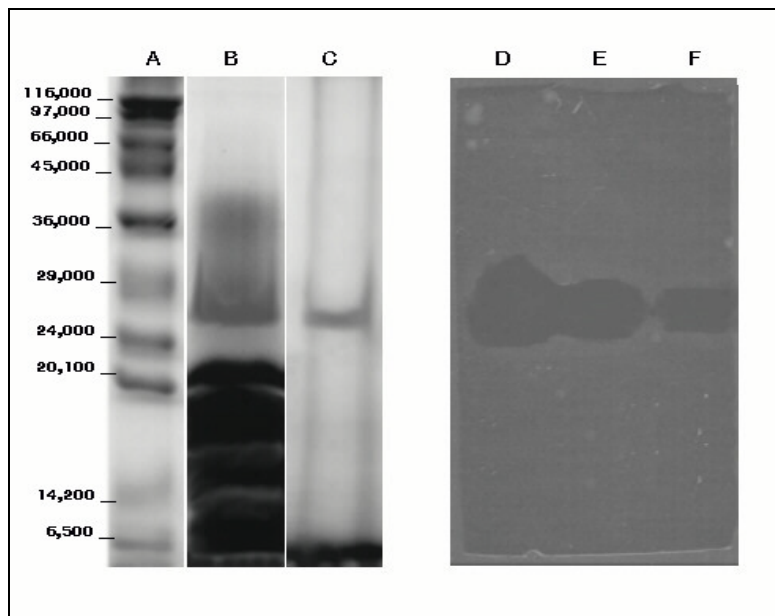


Fig. 2. Gel electrophoresis analysis of cerein 8A. Samples of the crude (lanes B and D) and purified bacteriocin (lanes C, E and F) submitted to SDS-PAGE and stained for proteins with Coomassie blue (lanes B and C) or tested for antimicrobial activity (lanes D, E and F). Lane A: molecular weight standards.

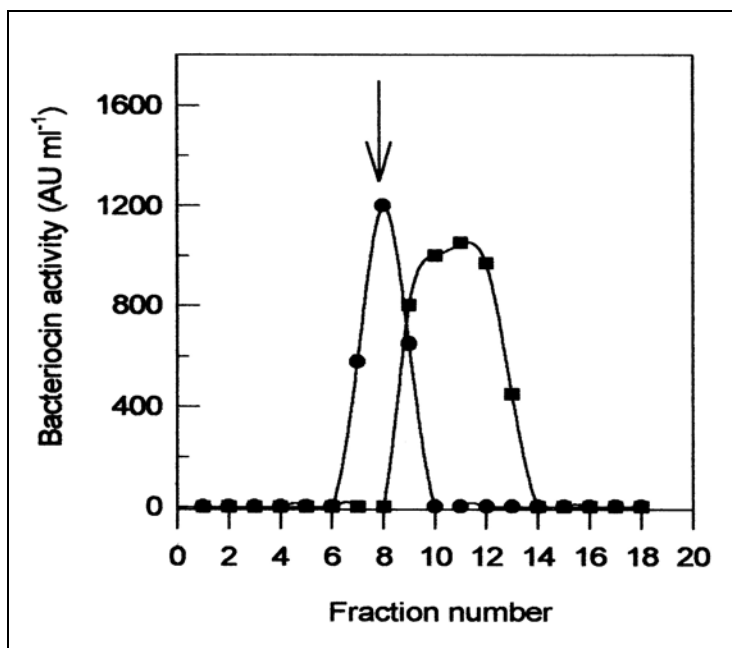


Fig. 3. Gel filtration chromatography analysis of cerein 8A. Supernatant was applied on a Sephadex G-100 column eluted with 10 mmol l⁻¹ sodium phosphate pH7.0 (circles) or 10 mmol l⁻¹ sodium phosphate containing 1.5 mol l⁻¹ NaCl (squares). Fractions were collected and assayed for antimicrobial activity. The arrow indicates the void volume of the column (V₀).

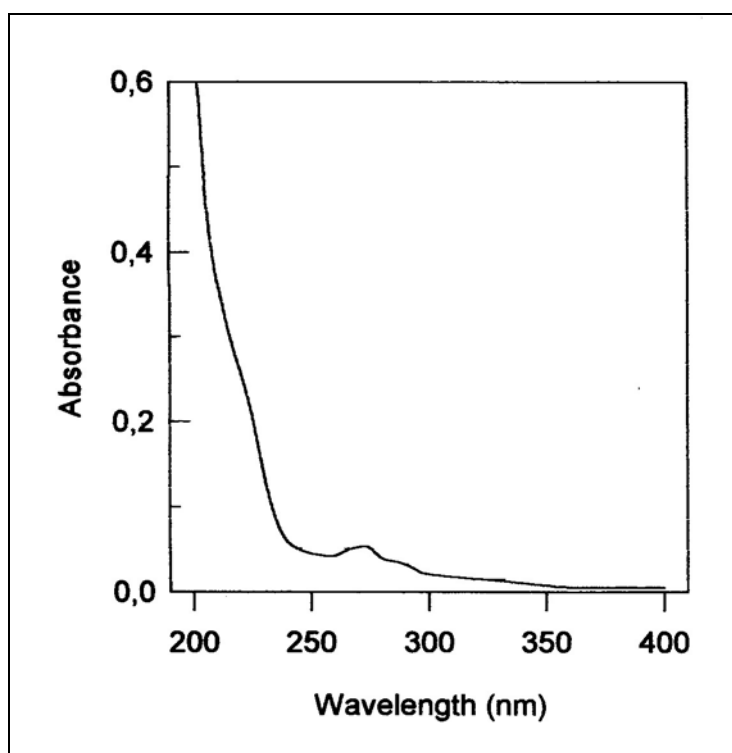


Fig. 4. UV absorption spectrum of cerein 8A.

The UV absorption spectrum of the purified bacteriocin was examined between 190 and 600 nm. The purified bacteriocin showed absorbance maxima at 220 and 272 nm, and there is no appreciable absorbance above 300 nm (Fig. 4). Intense signal was observed at lower than 200 nm, typical of protein absorption. A shoulder was observed at 220 nm characteristic absorption of peptide bonds. Minor absorbance was observed at 272 nm.

The infrared spectrum of cerein 8A is shown in Fig. 5. Characteristic absorption valleys at 1539, 1649 and 3250 cm^{-1} indicate that the substance contains peptide bonds. Valleys that result from C-H stretching (2950, 2850, 1454, 1428 cm^{-1}) indicate the presence of aliphatic chain(s).

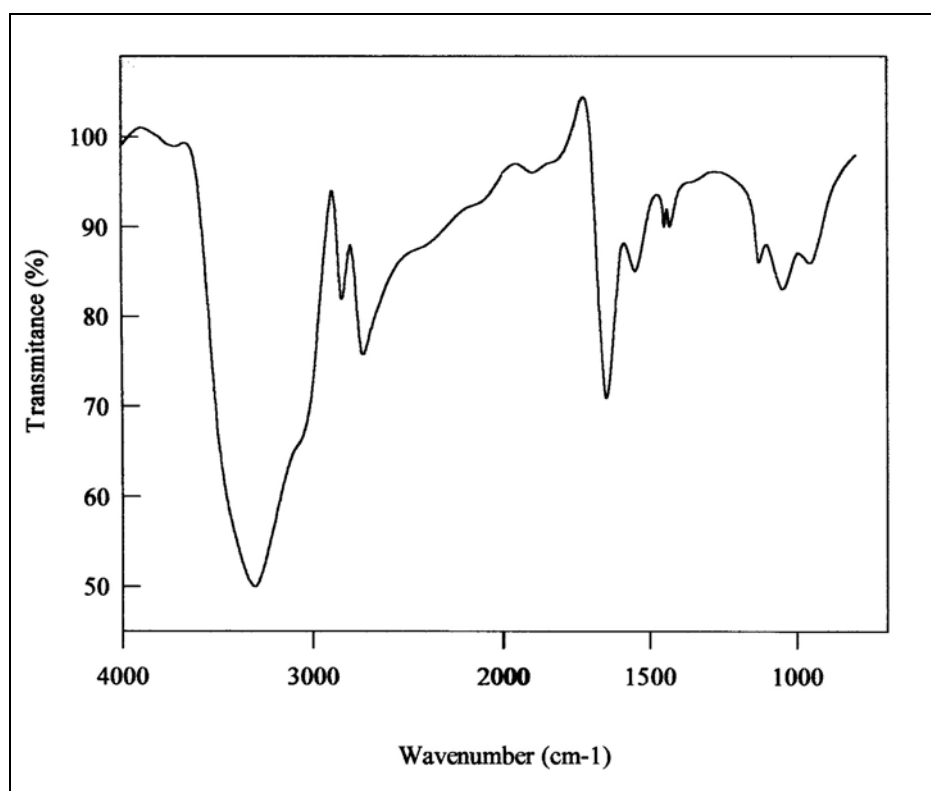


Fig. 5. FTIR spectrum of cerein 8A.

Table 2. Properties of the purified cerein 8A

Treatment *	Residual activity (%)
None	100
Trypsin	0
Pronase E	0
Proteinase K	0
Papain	0
60°C / 30 min	100
75°C / 30 min	100
80°C / 30 min	0
Acetone	100
Dimethyl sulfoxide	100
Chloroform	100
Ethyl ether	100
Xylol	66

* Enzymes were used at 2 mg ml⁻¹; organic solvents were used at 10% (v/v).

The purified bacteriocin was stable in the pH range from 2 to 11 (not shown). The inhibitory activity was lost by heating at temperatures higher than 75°C for 30 min, and by treatment with all the proteolytic enzymes tested (Table 2). Among the chemical tested, only xylol resulted in partial loss of activity (Table 2).

4.3.6 Discussion

The bacteriocin produced by *B. cereus* 8A, cerein 8A, was purified by a sequential precipitation, extraction and ion exchange chromatography protocol. The substance bond to the Q-Sepharose matrix, indicating the nature of the peptide is anionic. An important loss of activity was observed in the last purification step, suggesting that another component might help in maintaining cerein 8A stability. The MW was estimated as about 26 kDa. These characteristics are contrasting with the lantibiotics, which are cationic peptides with low MW (Klaenhammer 1993).

Also cerein 8A shown different properties from other bacteriocins produced by *B. cereus* (Naclerio *et al.* 1993; Oscáriz *et al.* 1999; Torak and Matijasic 2003).

The elution pattern in gel filtration columns suggests that cerein 8A is secreted as large aggregates with MW higher than 150 kDa. However, lower MW was observed when the elution was carried out with a high ionic strength buffer (1.5M NaCl), or estimated by SDS-PAGE. Discrepancy in MW determination has been shown for other bacteriocins and has been associated to the strong hydrophobic nature of the peptides (Valdés-Stauber and Scherer 1994; Oscáriz and Pisabarro 2000). Abnormal behavior of some highly hydrophobic proteins in SDS-PAGE is described (Kaufmann *et al.* 1984). In this regard, cerein 8A strongly bond to a Phenyl Sepharose matrix, indicating the presence of hydrophobic domains.

The ultraviolet spectrum of the cerein 8A is compatible with a peptide. The absorbance pattern is not characteristic of most peptide antibiotics, which produce absorbance maxima at 210-230 nm. This absorbance pattern also indicates the presence of a tyrosine residue ($\lambda_{\max} = 274$ nm) (Sheehan 2002). Similar ultraviolet pattern were demonstrated for other peptide antibiotics (Meyers *et al.* 1970; Kurusu and Ohba 1987). Neither of these peptides contains tyrosine in its structure, however, they contain α -amino-4-hydroxyphenylacetic acid, which is very similar to tyrosine.

The FTIR spectrum of cerein 8A offers valuable information about the peptide structure. Analysis of the spectrum shown typical absorption bands corresponding to N-H stretching of proteins and peptide bonds (Maquelin *et al.* 2002), a concrete evidence that the substance contained a peptide in its structure. Additional absorption valleys indicating aliphatic chains may be related with predominance of hydrophobic amino acids such as Val, Leu, Ile, or it contains a fatty acid in their structure. Antimicrobial activity of lipopeptides produced by *Bacillus*

spp. has been described (Lin *et al.* 1994; Yakimov *et al.* 1995), however such peptides belong to a subclass of peptolides, cyclic peptides that contain fatty acids (Nishii *et al.* 1980), often presenting less than 10 amino acids and MW as lower as 1.5 kDa. In addition, there is no evidence that a lactone ring is present in cerein 8A.

Purified cerein 8A was more susceptible to the heat and proteolytic treatments than the crude bacteriocin, however its stability over a wide pH range and organic solvents was maintained (Bizani and Brandelli, 2002). This bacteriocins showed different stability, cerein 7 (Oscariz and Pisabarro, 2000) and other bacteriocin of the *B. cereus* (Naclerio *et al.*, 1993; Torak and Matijasic, 2003). The size, protein stability and the lack of enzymatic activity of cerein 8A (Bizani *et al.*, unpublished results) did not allow us to classify this compound according to classical Klaenhammer's classifications (Klaenhammer, 1993). These data suggesting cerein 8A is a bacteriocin with unique properties.

4.3.7 Resumo

A Cereína 8A, produzida por uma linhagem de *Bacillus cereus* isoladas de solo de mata nativa da região Sul do Brasil, foi purificada. Esta substância peptídica foi isolada por meio da precipitação de sulfato de amônio, seguida de extração com 1-butanol e cromatografia por troca iônica em coluna Q-Sepharose. A atividade antimicrobiana do purificado foi reduzida pelo processo de tratamento com proteases e pelo calor. Foi realizado teste de atividade diretamente do gel de poliacrilamida, também se observou que a bacteriocina purificada corresponde a um peso molecular de 26 kDa. Um volume reduzido de bacteriocina bruta foi aplicado em coluna de cromatografia tipo Sephadex G-100 com tampão de 1.5 M NaCl, sem haver separação, indicando que a substância pode ser um grande agregado de peptídeos. A bacteriocina liga-se fortemente com a matriz de coluna de interação hidrofóbica como Phenyl Sepharose e troca iônica, Q-Sepharose, evidenciando a presença de amino-ácidos hidrofóbicos. O espectro ultravioleta foi típico de um polipeptídeo e o espectro de luz infravermelho indica que os peptídeos contêm um grupamento *acyl* na sua estrutura.

4.3.8 References

- Barefoot SF, Nettles CG (1993) Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *J Dairy Sci* **76**: 2366-2379.
- Bhavnani SM, Ballow CH (2000) New agents for Gram-positive bacteria. *Curr Op Microbiol* **3**: 528-534.
- Bizani D, Brandelli A (2002) Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *J Appl Microbiol* **93**: 512-519.
- Clauss D, Berkeley RCW (1986) Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath PHA (ed) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1105-1141.
- Crandall AD, Montville TJ (1998) Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl Environ Microbiol* **64**: 231-237.
- Davies EA, Bevis HE, Delves-Broughton J (1997) The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **24**: 343-346.
- Hames BD (1981) *An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis*. In: *Gel Electrophoresis of Proteins* (Eds. Hames BD, Rickwood D), pp. 1-92, IRL Press, Oxford.
- Katz E, Demain AL (1977) The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev* **41**: 449-474.
- Kaufmann E, Geisler N, Weber K (1984) SDS-PAGE strongly overestimates the molecular masses of the neurofilamental proteins. *FEBS Lett* **170**: 81-84.
- Kim WJ (1993) Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservatives. *Food Rev Int* **9**: 299-313.
- Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**: 39-86.
- Kurusu K, Ohba K (1987) New peptide antibiotics LI-FO3, FO4, FO5, FO7 and FO8, produced by *Bacillus polymyxa*. Isolation and characterization. *J Antibiot* **40**: 1506-1514.
- Lin SC, Carswell KS, Sharma MM, Gergiou O (1994) Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**: 281-285.

- MacFaddin JF (2000) *Biochemical test for identification of medical bacteria*, 3rd ed. Lippincot, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, van den Braak N, Endtz HP, Naumann D, Puppels GJ (2002) Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Meth* **51**: 255-271.
- Meyers E, Weisenborn FL, Pansy FE, Slusarchyk IS, von Saltza MH, Rathnum ML, Parker W (1970) Janiemycin, a new peptide antibiotic. *J Antibiot* **24**: 503-507.
- Milles H, Lesser W, Sears P (1992) The economic implication of bioengineering mastitis control. *J Dairy Sci* **75**: 596-605.
- Motta AS, Brandelli A (2002) Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J Appl Microbiol* **92**: 63-70.
- Mulet-Powell N, Lacoste-Armynot AM, Viñas M, de Bouchberg MS (1998) Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. *J Food Protec* **61**: 1210-1212.
- Naclerio G, Ricca E, Sacco M, De Felice M (1993) Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 4313-4316.
- Neuhoff V, Arold N, Trauber D, Ehrhardt W (1994) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.
- Nishii M, Kihara T, Isono K, Higashijima T, Miyazawa T, Sethi SK, McCloskey JA (1980) The structure of lipopeptin a. *Tetrahedron Lett* **48**: 4627-4630.
- Oscáriz JC, Lasa I, Pisabarro AG (1999) Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiol Lett* **178**: 337-341.
- Oscáriz JC, Pisabarro AG (2000) Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *J Appl Microbiol* **89**: 361-369.
- Paik HD, Bae SS, Park SH, Pan JG (1997) Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringensis* subsp *tochigensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**: 294-298.
- Rasch M, Knochel S (1998) Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Lett Appl Microbiol* **27**: 275-278.

- Riley MA, Wertz JE (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu Rev Microbiol* **56**: 117-137.
- Sheehan D (2002) *Physical Biochemistry: principles and applications*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Singer RS, Finch R, Wegener HC, Bywater R, Walters J, Lipsitch M (2003) Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis* **3**: 47-51.
- Torak KG, Matijasic BB (2003) Partial characterisation of bacteriocins produced by *Bacillus cereus* isolates from milk and milk products. *Food Technol Biotechnol* **41**: 121-129.
- Valdés-Stauber N, Scherer S (1994) Isolation and characterization of linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3809-3814.
- Yakimov MM, Timmis KN, Wray V, Fredrickson HL (1995) Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1706-1713.

4 DISCUSSÃO GERAL

Uma variedade de fatores antagonistas, incluindo metabólitos finais, compostos tipo antibióticos e as bacteriocinas, a maior parte destas produzidas por bactérias ácido-láticas, têm atraído atenção pelo potencial uso como conservantes indústria de alimentos. A maioria das bacteriocinas, devido a sua seletividade, interferência do ambiente em sua atividade, e atividade inibitória geralmente superior contra linhagens estritamente relacionadas ao organismo produtor, possuem um espectro ação reduzido, sendo que somente poucas bacteriocinas inibem diversos grupos de microrganismos (MARINGONI, KUROZAWA, 2002).

Neste trabalho, identificou-se, caracterizou-se e purificou-se uma bacteriocina produzida pelo *B. cereus* 8A, isolado de solo da região Sul do Brasil.

Esta bacteriocina, denominada de Cereína 8A, apresenta um espectro de ação característico, inibindo algumas bactérias não inibidas normalmente por outras bacteriocinas, além de ser ativa sobre espécies do mesmo gênero e sobre outras bactérias de origem alimentar ou clinicamente importantes.

O resultado da atividade da Cereína 8A, mostra um espectro variado e amplo começando pela atividade contra bactérias gram-positivas pertencente às linhagens estritamente relacionadas ao gênero produtor como *B. cereus* ATCC 9634, *B. cereus subtilis* ATCC 9372 e *B. subtilis* subsp. *niger* isolado de alimento, contra o qual foi

constatado o maior halo de atividade. São microrganismos que representam importância na segurança alimentar por serem bactérias toxigênicas, esporogênicas e termófilas (podendo até crescer entre 5 e 85° C).

B. cereus é conhecido por ser um agente causador de doença alimentar, tem suas origens do solo (terra e água), hortaliças, cereais e grãos armazenados com alto teor de umidade. A contaminação pode vir por qualquer material do solo (caixas, papel, embalagens de hortaliças), contaminando as superfícies das cozinhas (equipamento, superfícies e bancadas) além da contaminação cruzada através das mãos. Responsável por duas formas de gastroenterite, o *B. cereus* pode determinar uma síndrome emética devido à ingestão de alimentos que possuem a toxina já produzida. O quadro clínico desta gastroenterite se desenvolve num período de 1 a 6 horas, predominando vômitos e náuseas, raras diarreias e sem febre. A síndrome diarreica de gastroenterite (clássico) ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com a bactéria ou esporos dela, apresenta um período de incubação de 8 a 22 horas, predominando diarreia e náuseas, raros vômitos e sem febre.

B. macerans e *B. coagulans* também mostraram ser sensíveis à Cereína 8A. Ambas espécies estão envolvidas com contaminações alimentares (legumes, frutas, sucos e derivados destes cujo pH seja ácido), embora também tenham sido isoladas de processo infeccioso bovino a partir da contaminação de silagem.

As espécies do gênero *Listeria* testadas foram sensíveis à bacteriocina embora a *L. innocua* tenha se apresentado com halo de inibição menor, o que pode estar relacionado com o fato de ser um isolado de indústria de laticínios provavelmente de origem infeccioso animal. *L. monocytogenes* ATCC 7644 mostrou uma boa sensibilidade sendo, utilizada como uma das bactérias padrão para os demais

experimentos. A listeriose é uma doença descrita no início do século passado e que ocasiona uma elevação de monócitos, origem do termo “monocytogenes”. Alimentos provenientes ou em contato com solo, água, vegetais, leite, ração animal e silagens são os principais envolvidos como fonte deste microrganismo. Laticínios e alimentos industrializados como queijo, requeijão, patês, lingüiças, presunto e vegetais em conserva são os principais veículos de transmissão. Sua presença nos alimentos, principalmente os derivados do leite, é atribuída ao fato destes serem muitas vezes fabricados com a matéria-prima crua ou submetidos a um tratamento térmico ineficiente como a pasteurização lenta, permitindo a sobrevivência, ou ainda, a contaminação pós-produção. A atenção é ainda maior com alimentos conservados em baixas temperaturas, pois este microrganismo cresce em temperatura de refrigeração (0° C) até 44° C e numa faixa pH entre 4,5 e 8. Por outro lado, o controle obrigatório destas contaminações acarreta elevados prejuízos sanitários e econômicos, pelo que é imprescindível investigar outras vias de controle destas contaminações, principalmente as que decorrem de interações bióticas.

Streptococcus uberis, *S. pyogenes*, *S. bovis* e *Pasteurella haemolytica* também foram bactérias que mostraram sensibilidade à Cereína 8A. São isolados clínicos provenientes de processos infecciosos animal e com possíveis características laboratoriais marcantes como resistência a antibióticos, virulência, etc, o que demonstraria ter uma a mesma eficácia *in vivo*.

As bactérias gram-negativas testadas não apresentaram uma sensibilidade semelhante às demais indicadoras. Testes com *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis em meio líquido mostraram um efeito inibitório, potencializado quando submetidas ao tratamento com 20 mM de EDTA. A atividade inibitória ocorre

devido à ação quelante do EDTA, que remove os íons de Mg^{+2} e Ca^{+2} da membrana externa de gram-negativas, o que favorece a liberação de fosfolipídeos e lipoproteínas (MONTEVILLE, BRUNO, 1994). A perda destas substâncias aumenta a permeabilidade da parede celular e permite a atuação da Cereína 8A.

De outra maneira a tolerância de organismos sem mureína em sua parede celular (ex.: os fungos), sugere que a síntese deste polímero pode ser um pré-requisito para a ação antimicrobiana de uma bacteriocina. Entretanto deve-se levar em consideração que a inibição de fungos e leveduras foi descrita para as algumas bacteriocinas cujas concentrações foram duas vezes mais altas às usadas para as bactérias. Em testes realizados com extratos de parede celular bacteriana em meio sólido, com o objetivo de visualizar o efeito da Cereína 8A sobre a mureína, pode-se observar que a bacteriocina não apresentou uma atividade de enzima semelhante à muramidase. Para algumas bacteriocinas como a nisina, o processo ocorre de forma diferente, há inibição da síntese de mureína, portanto o alvo primário para esta bacteriocina seria a inibição da síntese deste polímero (DALMAU *et al.*, 2002).

A solubilidade e a estabilidade são importantes propriedades para uma substância candidata a biopreservativo alimentar. A Cereína 8A em sua forma nativa e purificada se manteve consideravelmente estável diante dos testes realizados. Em solução ou suspensão aquosa com pH ácido (3-5) a Cereína 8A reteve sua atividade. Num intervalo de pH entre 5 e 6 a atividade aumenta progressivamente sem perdas significativas na atividade e sua melhor atividade ocorre no intervalo de pH de 5 a 8. O aumento da alcalinidade reduz gradativamente a atividade inibitória. A Cereína 8A não alterou sua solubilidade nas diferentes faixas pH testado.

A estabilidade térmica da Cereína 8A pode ser avaliada com vistas às possíveis aplicações em alimentos. A perda da atividade ocorre com a bacteriocina na forma bruta a 87° C e purificada a 80° C, já em experimentos em temperaturas mais baixas, não se verificou perda de atividade, mesmo depois de mantida por 12 meses congelada a -20° C ou a 4° C por 30 dias ou mais. A temperatura ambiente não alterou sua atividade. Quanto à estabilidade da bacteriocina, também foi observado que os processos de concentração (rota-vapor e liofilização) não diminuíram atividade da Cereína 8A. Estas propriedades são importantes para aplicação na indústria de alimento, indicando que esta bacteriocina pode ser utilizada em produtos liofilizados, pasteurizados, congelados, refrigerados ou de baixo pH.

A avaliação da susceptibilidade da Cereína 8A frente às enzimas proteolíticas foi realizada com objetivo na identificação da natureza desta substância. Em teste utilizando a bacteriocina bruta, verificou-se a resistência contra a ação proteolítica da tripsina e papaína, mas não contra a proteinase K e pronase E. Com a Cereína 8A purificada a sensibilidade foi observada frente a todas as enzimas, o que sugere ser uma substância de natureza protéica. A maior estabilidade da Cereína 8A na forma bruta, frente ao tratamento enzimático, poderia estar relacionado, à formação de agregados moleculares, que neste caso durante o processo de purificação são desagrupados, tornando-a mais sensível. É possível também que depois do processo de purificação, mais sítios da Cereína 8A estejam vulneráveis às enzimas proteolíticas.

Os efeitos da Cereína 8A sobre a membrana celular, tanto de *B. cereus* como de *L. monocytogenes*, ao ser analisado por espectrofotometria de infravermelho, demonstraram uma alteração em nível de componentes lipídicos, podendo estar

relacionado com a desestruturação das moléculas que sustentam a membrana celular e conseqüentemente levando à formação de poros. Este tipo de alteração seria semelhante ao que ocorre com determinados lantibióticos, onde a substância induz a perda de K^+ intracelular, despolarização da membrana citoplasmática, hidrólise de ATP intracelular, saída de fosfato inorgânico, e finalmente inibição da função respiratória (McAULIFFE *et al.*, 2001).

Ao avaliar o efeito e o modo de ação da Cereína 8A, pode-se observar que os resultados são dependentes de condições experimentais, como a concentração da bacteriocina, grau de pureza da Cereína 8A e tipos de espécies indicadoras, bem como sua concentração.

Uma hipótese para o modo de ação da Cereína 8A pode ser explicada pela teoria de que determinadas regiões da membrana poderiam mediar o efeito antibacteriano da bacteriocina, sugerindo que alguns constituintes da membrana deveriam interagir com o antibiótico. Considerando que a membrana citoplasmática é composta de proteínas e lipídios e que a Cereína 8A possui caráter aniônico, esta não teria seu efeito protagonizado pelos fosfolipídios, sobrando as proteínas que poderiam ser os principais componentes de interação. Se a maior parte dos aminoácidos que compõem a Cereína 8A é de natureza apolar, as interações hidrofóbicas entre seus aminoácidos e grupamentos hidrofóbicos de proteínas de membrana ou eventualmente com cadeias carbônicas dos ácidos graxos, podem ser responsáveis pela formação do complexo com a Cereína 8A.

A precipitação da Cereína 8A com sulfato de amônio ocorre pela neutralização das cargas de superfície pelo sal ou pela redução da atividade de água das proteínas (fenômeno conhecido como “salting out”). A concentração de sal

necessária para causar a precipitação de uma partícula protéica, está relacionado ao número e distribuição das cargas e dos grupos polares não iônicos presentes na superfície da proteína, bem como ao número e distribuição dos resíduos hidrofóbicos expostos além dos domínios cujas cargas já foram neutralizados (YANG *et al.*, 1992; CRUPPER, IANDIOLO 1996; VENEMA *et al.*, 1997). Portanto, a concentração de sal exigida para precipitar 95% da Cereína 8A do sobrenadante da cultura chega a 65% de saturação de $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, embora 55% da atividade precipite com 45% de saturação. Isso sugere que a substância que se está precipitando sejam agregados protéicos, o que vem ao encontro do observado em cromatografia de gel filtração usando eluentes com diferentes forças iônicas. Uma série de evidências indicam que a atividade antimicrobiana está associada a uma molécula de natureza protéica, pois foi destruída por enzimas proteolíticas, apresentou banda de atividade em gel coincidente com banda de proteína e os espectros de ultravioleta e infravermelho são compatíveis com um polipeptídeo.

A purificação em quase todos os protocolos normalmente envolve, além da precipitação com sais, várias combinações de cromatografia de gel-filtração, cromatografia por troca iônica, interação hidrofóbica, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência. Em geral estes métodos produzem resultados satisfatórios em pequena escala, pois além de se obter uma recuperação, pequena, são métodos onerosos e de difícil manuseio, tornando inviável seu uso em grandes proporções (JANES *et al.*, 1998).

As evidências mostram que a Cereína 8A apresenta características de ser uma bacteriocina aniônica e hidrofóbica. Conhecendo estas características da bacteriocina, se torna mais fácil a elaboração de uma metodologia para a recuperação

em grande escala. Métodos que utilizam a adsorção da bacteriocina à estrutura afim, poderão tornar-se viáveis na recuperação. Neste caso é necessário que a bacteriocina tenha duas propriedades físico-químico fundamentais para o processo: formar uma rede carregada em torno do material adsorvente e segundo, ser resistente aos solventes orgânicos e variação de pH durante os processos de extração, características em parte presentes na Cereína 8A.

Durante o processo de purificação podemos observar que através dos métodos utilizados para a Cereína 8A chegou-se a um índice de 60% de recuperação na etapa da precipitação. A extração com 1-butanol a partir do precipitado com $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, permitem obter uma bacteriocina com maior grau de purificação. Na cromatografia por troca iônica em coluna Q-Sepharose houve perda significativa da atividade que se refletiu na diminuição do fator de purificação, ainda assim obteve-se um rendimento de 54%.

Novos estudos estão sendo desenvolvidos para identificar a melhor ou melhores condições de produção da Cereína 8A, pois constitui uma ferramenta com potencial promissor para proteção e conservação de alimentos.

5 CONCLUSÕES

A Cereína 8A foi capaz de inibir o crescimento de microrganismos envolvidos com contaminações alimentares, entre eles a *L. monocytogenes*. Esta propriedade antilistérica é uma característica importante para uma substância candidata a biopreservativo.

A metodologia adotada neste estudo, para a seleção primária da Cereína 8A, deve ter condicionado a detecção e eventual biossíntese ou produção da bacteriocina. A vantagem desta metodologia adaptada decorre da possibilidade de determinar a influência (variações) do meio (ambiente) sobre o *B. cereus* 8A, na produção do composto bioativo.

Na cultura em meio líquido, a Cereína 8A é formada quando o *B. cereus* 8A está atingindo sua fase estacionária, ou seja, quando a maior parte de sua massa celular foi sintetizada, indicando ser produto de secreção ou síntese secundário.

Seu efeito inibitório frente a *L. monocytogenes* e *B. cereus* foi observado em concentrações de 400 e 200 UA mL⁻¹, respectivamente, sugerindo-se um modo de ação bactericida. Durante os testes não foi verificado, entre as bactérias indicadoras, princípio de resistência ou formação de colônias tolerantes à Cereína 8A.

As características químicas indicaram que a Cereína 8A é uma proteína de peso molecular de aproximadamente 26 kDa.

Características como natureza protéica, estabilidade térmica até 80° C, atividade antibiótica numa faixa de pH entre 5 e 8, indicam que a Cereína 8A tem um potencial uso como conservantes em sistemas alimentares.

6 PERSPECTIVAS

Desta forma como perspectiva de novos estudos, baseados nos resultados deste trabalho, podemos citar:

- Completar estudos e caracterização de composição química, realizando seqüenciamento de aminoácidos.
- Determinar propriedades como toxicidade, citotoxicidade e DL_{50} da Cereína 8A tanto em condições *in vivo* como *in vitro*.
- Buscar uma metodologia de produção e purificação cujos processos possibilitem obter a bacteriocina viável em maior escala, como por exemplo avaliar a viabilidade de produção de Cereína 8A usando substratos mais baratos como resíduos agroindustriais.
- Realizar testes de proteção em alimentos para verificar a eficácia da Cereína 8A *in situ*.

7 BIBLIOGRAFIA

ABRIOUEL, H.; MAQUEDA, M.; GÁLVEZ, A.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; VALDIVIA, E. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, 55, 599-603, 2003.

APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. Cap. 24, EUA, Washington, 1992.

ATRIH, A.; MOIR A. J. G.; LEFEBVRE, G. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactococcus plantarum* C19. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 68, 93-104, 2003.

BABA, T.; SCHNEEWIND, O. Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. **Trends in Microbiology**, Cambridge, 6, 66-71, 1998.

BAREFOOT, S. F.; NETTLES, C. G. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, 76, 2366-2379, 1993.

BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C.; RAY, B.; KALCHAYANAND, N. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidolactici* H on sensitive bacterial strain. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, 70, 25-33, 1991.

BLACK, J. G. Características das células procarióticas e eucarióticas. Por Black. J. G. **Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4º ed., p. 71-77, 2002.

BRASIL. Resolução nº 23 de 15 de março de 2000. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Ministério da Saúde, Brasília-DF, 2000a.

BRASIL. Resoluções nº 1.001, 1.002, 1.003 e 1.004. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Ministério da Saúde, Brasília-DF. 2000b.

CABO, M. L.; PASTIORIZA, L.; BERNARDÉZ, M.; HERRERA J. J. R. Effectiveness of CO₂ and Nisaplin on increasing shelf-life of fresh pizza. **Food Microbiology**, London, 18, 489-498, 2001.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 50, 131-149, 1999.

CHERIF, A.; OUZARI, H.; DAFFONCHIO, D.; CHERIF, H.; BEM SLAMA. K.; HASSEN, A.; JAOUA, S.; BOUDABOUS, A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. **Letters in Applied Microbiology**, London, 32, 2434-247, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS. **Princípio de Transferência dos Aditivos Alimentares**. Seção 5.3, Vol. 1A, 1995.

CRUPPER, S. S.; IANDIOLO, J. J. Purification and partial characterization of a novel antilisterial agent (Bac1829) produced by *Staphylococcus aureus* KSI1829. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 62, 3171-3175. 1996.

DALMAU, M.; MAIER, E.; MULET, N.; BENZ, R. Bacterial membrane injuries induced by lactacin F and nisin. **International Microbiology**, Barcelona, 5, 73-80, 2002.

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

DE VUYST, L. DE; CALLEWAERT R.; CRABBÉ K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions.

Microbiology, London, 142, 817-827, 1996.

DE VUYST, L. DE; VANDAMME . E. J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria:** microbiology, genetics and applications. London: Blackie Academic & Professional, 540 p., 1994.

DYKES G. A. Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. **Tree**, Washington, 10, 186-189, 1995.

EL-ZINEY, M. G.; TEMPEL, T.; DEBEVERE, J.; JAKOBSEN, M. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. **Journal of Food Protection**, Ames, 62, 257-261, 1999.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, K. S.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, 24, 85-106, 2000.

FIELDS, F. O. Use of bacteriocins in food: Regulatory considerations. **Journal of Food Protection**, Ames, Supplement, 72-77, 1996.

GEBHARDT, K.; SCHIMANA, J.; MÜLLER, J.; RHEINHEIMER, J.; DETTNER, K. Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, 217, 199-205, 2002.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: A review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, Ames, 60, 6, 732-738, 1997.

GUERRA, M. M.; BERNARDO, F. M. A. Characterization of the effects of *L. monocytogenes* Scott a produced by ripening microflora of a alentejo's traditional cheeses. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, 96, 65-69, 2001.

HÉCHARD, Y.; SAHL, H. Mode of action and unmodified bacteriocins from gram-negative bacteria. **Biochimie**, Paris, 84, 545-557, 2002.

HOFLACK, L.; WILCKES, A.; ANDRUP, L.; MAHILLON, J. Functional insights into pG12, a cryptic rolling-circle replicating plasmid from *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology**, London, 145, 1519-1530, 1999.

HURST, A. Microbial antagonism in food. **Canadian Institute of Food Science Technology Journal**, Ottawa, 6, 80-90, 1973.

HYRONIMUS, B.; LE MARREC, C.; URDACI, M.C. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, 85, 42-50. 1998.

ISLAN, M.; CHEN, J.; DOYLE, M.; CHINNAN, M. Control of *Listeria monocytogenes* on turkey frankfurters by generally-recognized-as-safe preservatives. **Journal of Food Protection**, Ames, 65, 1411-1416, 2002.

JACK, R. W., TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, 59, 171-200, 1995.

JACOB, F.; LWOFF, A. SIMINOVITCH, A.; WOLLMAN, E. Définition de quelques termes relatifs à la lysogenie. **Annales de L'Institut Pasteur**, Paris, 84, 222-224, 1953.

JANES, M. E.; NANNAPANENI, R.; PROCTOR, A.; JOHNSON, M. G. Rice hull ash and acid as adsorbents for concentration of bacteriocins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 64, 4403-4409, 1998.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, Paris, 70, 337-349, 1988.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, 12, 39-86, 1993.

LÜCKE, F. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, Barking, 56, 105-115, 2000.

- MARINGONI A. C.; KUROZAWA C. Tipificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por bacteriocinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 37, 1339-1345, 2002.
- MARREC, C. LE; VERNEUIL, B.; URDACI, M. C. Biochemical and genetic characterization of Coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I₄. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 66, 5213-5220, 2000.
- MATARAGAS. M.; GALIOTOU, M.; DRISINOS, E. H. influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Science**, Barking, 64, 265-271, 2003.
- McAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, 25, 285-308, 2001.
- MITEVA, V.; IVANOVA, I.; DANOVA, S.; MONCHEVA, P.; BOYAVAL, P. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 42, 147-158, 1998.
- MONTVILLE, T. J.; BRUNO, M. E. C. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 24, 53-74, 1994.
- MULET-POWELL, N.; LACOSTE-ARMYNOT, A. M.; VIÑAS, M.; BUOCHBERG, M. S. Interaction between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. **Journal of Food Protection**, Ames, 61, 1210-1212, 1998.
- MURIANA, P. Bacterocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, Ames, Supplement, 54-63, 1996.
- NACLERIO, G.; RICCA, E.; SACCO, M.; DE FELICE, M. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, 59, 4313-4316. 1993.

- NETTLES, C. G.; BAREFOOT, S. F. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Ames, 56, 338-356, 1993.
- OSCÁRIZ, J.C.; LASA, I.; PISABARRO, A.G. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. **FEMS Microbiolgy Letters**, Amsterdam, 178, 337-341.1999.
- PATTNAIK, P.; KAUSHIK, J. K.; GROVER, S.; BATISH, V. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformes* isolated from water buffalo. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, 91, 636-645, 2001.
- PIURI, M.; SANCHEZ-RIVAS, C.; RUZAL, S. M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional sausages. **Letters in Applied Microbiology**, London, 27, 9-13, 1998.
- REEVES, P. The bacteriocins. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, 29, 25-45, 1965.
- RILEY, M. A; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology and application. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, 56, 117-137, 2002.
- RILEY, M. Molecular mechanisms of bacteriocins evolution. **Annual Reviews of Genetics**, Palo Alto, 32, 255-278, 1998.
- RILEY, M.; GORDON, D. M. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. **Trends in Microbiology**, Cambridge, 7, 129-133, 1999.
- SANTOS, W. L. M.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P. Bacteriocinas: definição e características. **Higiene Alimentar**, São Paulo, 8, 21-25, 1994.
- SCANNELL, A. G. M.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MARX, S.; ARENDT, K. Development of bioactive food packaging materials using immobilized Lacticin 3147 and Nisaplin®. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 60, 241-249, 2000.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, 7, 158-164, 1996.

SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Guidelines for manuscripts on bacteriocins of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 33, iii-v, 1996.

SCOTT, V. N.; TAYLOR, S. L. Temperature, pH, and spore load effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. **Journal of Food Science**, Chicago, 46, 121-126, 1981.

SIRAGUSA, G. R.; CUTTER, C.N.; WILLET, J. L. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface of bacteria on meat. **Food Microbiology**, London, 16, 229-235, 1999.

SOARES, A.; INOUE, S. H.; LARA, J. A. F.; SHIMOKOMAKI, M. Aditivos, corantes, condimentos e ingredientes – Artigo Técnico Ingredientes e Aditivos para carnes: segurança e inovação. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, ed. 317, julho, 24-37 2003.

SUGITA, H.; HIROSE, Y.; MATSUO, N.; DEGUSHI, Y. Production of the antimicrobial substance by *Bacillus* strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Acquaculture**, Amsterdam, 165, 269-280, 1998.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Bacteriology Reviews**, Washington, 40, 722-756, 1976.

TAMEHIRO, N.; OKAMOTO-HOSOYA, Y.; OKAMOTO, S.; UBUKATA, M.; OCHI, K. Bacilysocina, a novel phospholipidic antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, 46, 315-320, 2002.

URUKU, D. O.; SHELEF, L. A. Sensitivity of strains *Listeria monocytogenes* to Nisin. **Journal of Food Protection**, Ames, 60, 867-869, 1997.

UTENG, M.; HAUGE, H. H.; FIMLAND, G. Rapid two-step for large-scale for purification of Pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 68, 952-956, 2002.

VENEMA, K.; CHIKINDAS, M. L.; VENEMA, G.; KOK, J. Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic cationic bacteriocins: Purification of lactococin B and pediocin PA-1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 63, 305-309, 1997.

YANG, R.; JOHNSON, M.; RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 58, 3355-3359, 1992.

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, 91, 181-187, 2001.

ANEXO 1

Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus* sp. Strain 8A.

- Journal of Applied Microbiology (2002), **93**:512-519

ANEXO 2

Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation.

- Applied Microbiology and Biotechnology – Aceito em 9 janeiro de 2004.
(documento disponível *on line* – DOI 10.1007/s00253-004-1570-1)

ANEXO 3

Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir.

- Brazilian Journal of Microbiology (2001), **32**:334-339.