

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS CONTRA *Listeria monocytogenes* MULTIRRESISTENTES A ANTIMICROBIANOS DE USO CLÍNICO

MAIARA LINDEMANN ZEHETMEYR¹; GRACIELE DAIANA FUNCK²; CARLA POHL SEHN³; LOUISE HAUBERT⁴; CRISTIANO TAVARES VIEIRA⁵; VLADIMIR PADILHA DA SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – UFPel – maiara.lz@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – UFPel – gracifunck@yahoo.com.br

³Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA – carla.pohlsehn@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – UFPel – louisehaubert@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – UFPel – cristianotavaresvieira@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – UFPel – vladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Bactérias ácido lácticas (BAL) estão presentes naturalmente em diversos alimentos, como o leite e seus derivados, e compreendem um grupo de micro-organismos com características semelhantes. São Gram-positivas, não esporuladas, catalase negativa, anaeróbicas e/ou aerotolerantes, com formato de bacilos, cocos ou coco-bacilos (LEROY; DE VUYST, 2004).

Esse grupo de micro-organismos apresenta metabolismo fermentativo e como metabólito principal da fermentação de carboidratos produz ácido lático, o que permite a sua aplicação na indústria para a produção de alimentos fermentados. Além disso, BAL também são capazes de produzir substâncias antimicrobianas de origem proteica (GÁLVEZ et al., 2008). Entre essas substâncias, destacam-se as bacteriocinas, que são peptídeos naturais secretados em nível ribossomal por determinadas bactérias, e que têm a capacidade de inibir a multiplicação de outras bactérias (ELAYARAJA et al., 2014).

Essas substâncias podem ser utilizadas como bioconservantes, em substituição aos conservantes sintéticos para o controle de micro-organismos deteriorantes e patogênicos contaminantes (FAVARO et al., 2014), entre estes, *Listeria monocytogenes* (ATRIH et al., 2001). *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, responsável por causar listeriose em humanos e animais. A listeriose é uma doença transmitida por alimentos, relativamente rara quando comparada com outras doenças de origem alimentar, porém considerada grave pelas altas taxas de letalidade, o que a torna um problema de saúde pública (DE VALK et al., 2005).

O atual tratamento para a listeriose é a antibioticoterapia, sendo os antibióticos de primeira escolha para o tratamento, os β-lactâmicos, como penicilina G e ampicilina, podendo ser associado com outras classes de antimicrobianos (KRAWCZYK-BALSKA et al., 2012). Apesar da suscetibilidade do patógeno a vários antimicrobianos, alguns isolados de *L. monocytogenes* envolvidos em surtos alimentares têm apresentado perfil de multirresistência, o que pode estar associado ao uso indiscriminado de antibióticos e transferência de genes de resistência (MARIAN et al., 2012).

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de bacteriocinas produzidas por dois isolados de BAL contra isolados de *L. monocytogenes* multirresistentes a antimicrobianos de uso clínico.

2. METODOLOGIA

A atividade antimicrobiana de bacteriocinas de dois isolados de BAL (BAL 99 e BAL 254), previamente isolados de presunto e queijo fatiado, foi testada contra cinco isolados de *L. monocytogenes* multirresistentes aos antimicrobianos de uso clínico, oriundos de alimentos e ambientes de processamento.

O sobrenadante livre de células (SLC) contendo bacteriocinas dos isolados de BAL foi obtido a partir do cultivo dos isolados a 37 °C por 24 h, o qual foi centrifugado a 6.800 x g a 4 °C por 20 minutos. Após, o pH dos SLC foi neutralizado (pH 7,0) utilizando-se solução de NaOH 1 N e aqueceu-se a 80 °C por 10 minutos (TODOROV; DICKS, 2004).

A quantificação da atividade antimicrobiana do SLC foi realizada pela técnica de diluição crítica de acordo com MAYR-HARTING; HEDGES; BERKELEY (1972), na qual foram realizadas diluições seriadas desses sobrenadantes. Foram adicionados 5 µL do SLC puro e diluído sobre ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) contendo as culturas de *L. monocytogenes* multirresistentes a antimicrobianos de uso clínico. Para o cálculo das unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL) foi considerada a maior diluição que produziu halos de inibição maior ou igual a 2 mm, através da seguinte fórmula: atividade antimicrobiana (UA.mL⁻¹) = (1000/V) D, onde D = maior diluição que apresentou halo de no mínimo 2 mm; V = volume do sobrenadante utilizado em microlitros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 é apresentada a atividade antimicrobiana, em UA.mL⁻¹, das bacteriocinas produzidas pelos isolados de BAL, contra cinco isolados de *L. monocytogenes* multirresistentes a antimicrobianos.

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana de bacteriocinas de BAL contra isolados multirresistentes a antimicrobianos (UA.mL⁻¹)

Isolados	BAL 99	BAL 254
LM 13	200	200
LM 14	3200	3200
LM 16	200	200
LM 30	200	200
LM 46	1600	3200

As bacteriocinas produzidas pelos isolados de BAL 99 e BAL 254 conseguiram inibir a multiplicação de todos os isolados multirresistentes, com maior atividade contra os isolados LM 14 e LM 46. A atividade antimicrobiana de BAL 99 e BAL 254 para quatro dos cinco isolados de *L. monocytogenes* foram iguais, apenas para o isolado LM 46 a atividade antimicrobiana da BAL 254 foi maior em comparação a BAL 99. Os resultados do presente estudo são relevantes, pois indicam a capacidade da substância proteica ao inibir patógenos multirresistentes que apresentam genótipo de resistência (*tetM* e *ermB*) e elementos genéticos móveis como plasmídeos, o que aumenta a probabilidade desses patógenos conjugar genes de resistência para outras bactérias saprófitas ou comensais (dados não publicados).

LÜ et al. (2014) mostraram que uma bacteriocina denominada lactocina MXJ 32A, produzida por *Lactobacillus coryniformes*, exibiu amplo espectro antimicrobiano, além de ser efetiva contra cepas resistentes aos antimicrobianos de uso clínico. O possível mecanismo de ação sugerido pelo grupo seria a destruição da parede celular e formação de poros na membrana celular.

HUANG et al. (2009) demonstraram que todas as cepas de *L. monocytogenes* testadas apresentaram sensibilidade a uma bacteriocina produzida pelo isolado *Pediococcus pentosaceus* 05-10, a qual também diminuiu o número viável de células do patógeno após duas horas, sugerindo uma ação bactericida. Em outro estudo semelhante, a bacteriocina produzida pelo isolado *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* BMK2005, apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes (BENDJEDDOU et al., 2012).

Atualmente, na indústria de alimentos já se faz uso de bacteriocinas, como a nisin, que possui ação antimicrobiana de amplo espectro contra *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e outras bactérias patogênicas. A substância não apresenta efeitos toxicológicos para seres humanos, justificando sua ampla utilização na indústria de alimentos como bioconservante (BALCIUNAS et al., 2013).

Através desses resultados, observa-se que compostos naturais, como os produzidos por BAL, podem ser uma alternativa ao uso de compostos sintéticos para a conservação de alimentos. Segundo BALCIUNAS et al. (2013), os consumidores estão buscando alternativas mais naturais, buscando alimentos sem adição de conservantes sintéticos, as quais podem ser utilizadas na briopreservação, extensão da vida útil de produtos e contra patógenos de importância clínica, inclusive inibindo o crescimento de micro-organismos multirresistentes.

4. CONCLUSÕES

As bacteriocinas produzidas por BAL 99 e BAL 254 apresentam atividade antimicrobiana contra isolados de *L. monocytogenes* com perfil de multirresistência aos principais antimicrobianos de uso clínico. Esses resultados apontam o potencial de utilização dessas substâncias como bioconservadores em alimentos.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATRIH, A., REKHIF, N., MOIR, A. J. G., LEBRIHI, A., LEFEBVRE, G. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, p. 93-104, 2001.

BALCIUNAS, E. M., MARTINEZ, F. A. C., TODOROV, S. D., FRANCO, B., CONVERTI, A., OLIVEIRA, R. P. D. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. **Food Control**, Vurrey, v. 32, p. 134-142, 2013.

BENDJEDDOU, K., FONS, M., STROCKER, P., SADOUN, D. Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1543-1552, 2012.

DE VALK, H.; JACQUET, C.; GOULET, V.; VAILLANT, V.; PERRA A.; SIMON, F. Surveillance of listeria infections in Europe. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, v. 10, p. 251-255, 2005.

ELAYARAJA, S.; ANNAMALAI, N.; MAYAVU, P.; BALASUBRAMANIAN, T. Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 4, p. s305-s311, 2014.

FAVARO, L., BASAGLIA, M., CASELLA, S., HUE, I., DOUSSET, X., FRANCO, B.D.G.M., TODOROV, S.D., Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brinecheese. **Food Microbiology**, London, v. 38, p. 228-239, 2014.

GÁLVEZ, A., LÓPEZ, R.L., ABRIQUEL, H., VALDIVIA, E., OMAR, N.B., Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.28, n.2, p. 125-152, 2008.

HUANG, Y., LUO, Y., ZHAI, Z., ZHANG, H., YANG, C., TIAN, H., LI, Z., FENG, J., LIU, H., HAO, Y. Characterization and application of an anti-Listeria bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. **Food Control**, Vurrey, v. 20, p. 1030-1035, 2009.

KRAWCZYC-BALSKA, A., MARCHLEWICZ, J., DUDEK, D., WASIAK, K., SAMLUK, A. Identification of a ferritin-like protein of *Listeria monocytogenes* as a mediator β -lactam tolerance and innate resistance to cephalosporins. **BMC Microbiology**, London, v.12, p. 278, 2012.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, p. 67-78, 2004.

LÜ, X.; LANHUA, Y.; DANG, J.; DANG, Y.; BIANFANG, L. Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms. **Food Control**, Vurrey, v. 46, p. 264-271, 2014.

MARIAN, M. N., SHARIFAH AMINAH, S.M., ZURAINI, M.I., SON, R., MAIMUNAH, M., LEE, H.Y. MPN-PCR detection and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from raw and ready-to-eat foods in Malasya. **Food Control**, Vurrey, v. 28, p. 309-314, 2012.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, C. W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J. R.; RIBBONS, D. W. (Eds.). **Methods in Microbiology**. New York: Academic Press Inc., 1972. v.7

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 44, n. 4, p. 305-316, 2004.