

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ - UTFPR  
CAMPUS CAMPO MOURÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - PPGTA  
NÍVEL MESTRADO ACADÊMICO

NATARA FÁVARO TOSONI

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE ENTEROCINAS EM CÉLULAS  
PLANCTONICAS E EM BIOFILME DE *Salmonella* Typhimurium E  
SOROTIPOS DE *Escherichia coli***

DISSERTAÇÃO

Campo Mourão

Março / 2019

NATARA FÁVARO TOSONI

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE ENTEROCINAS EM CÉLULAS  
PLANCTONICAS E EM BIOFILME DE *Salmonella* Typhimurium E  
SOROTIPOS DE *Escherichia coli***

Dissertação do Programa de Pós-Graduação em  
Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *campus*  
Campo Mourão/ Medianeira.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Furlaneto Maia

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Cristina Furlaneto

Campo Mourão/ Medianeira

Março / 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

T713p

Tosoni, Natara Fávoro

Potencial antibacteriano de enterocinas em células planctônicas e em biofilme de *Salmonella Typhimurium* e sorotipos de *Escherichia coli* / Natara Fávoro Tosoni – 2019.

43 f.: il.; 30 cm.

Texto em português com resumo em inglês

Orientadora: Luciana Furlaneto Maia

Coorientadora: Marcia Cristina Furlaneto

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2019.

Inclui bibliografias.

1 Bactérias gram - negativas 2. Micro – organismos patogênicos  
3..Agentes antiinfecciosos 4. Alimentos – Dissertações. I. Maia, Luciana Furlaneto, orient. II. Furlaneto, Marcela Cristina, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira  
Fernanda Cristina Gazolla Bem dos Santos 9/1735



**TERMO DE APROVAÇÃO**

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE ENTEROCINAS EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E EM BIOFILME DE  
*Salmonella Typhimurium* E SOROTIPOS DE *Escherichia coli***

Por

**NATARA FÁVARO TOSONI**

Essa dissertação foi apresentada às 9 horas, do dia 25 de Março de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

O(A) candidato(a) foi arguido(a) pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o **trabalho APROVADO**.

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Luciana Furlaneto Maia

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Marly Sayuri Katsuda

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Elsa Helena Walter Santana

\* A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

*Dedico este trabalho à minha família, meus pais Ademir (In memorian) e Solange, meu irmão e minha cunhada, Gustavo e Mariana, meu sobrinho Samuel pelo amor e suporte em todos os dias da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia pela paciência, atenção e conselhos. Pelos conhecimentos acadêmicos adquiridos além da pesquisa. Pelas conversas de incentivo e principalmente pela amizade e compreensão.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Márcia Furlaneto por ter disponibilizado o laboratório da UEL e sua equipe para realização deste trabalho. Também pelos conselhos e conversas. Pela amizade e apoio.

Aos meus amigos e membros da equipe do Laboratório Genoma, em especial à Cássia Souza, Giovanna Santana, Eloísa Paulo, Kátia Rocha e Alane Moralez.

Aos meus amigos membros do Laboratório LAMBA, em especial à Thabata Cirino, Nayara Batista, Bruno Seben e Ariadne Gonçalves.

À Márcia Terra pela parceria essencial e ensinamentos necessários para a conclusão deste projeto.

Ao Hugo Perini pela disponibilidade e ajuda nas análises finais.

À UTFPR e aos professores do PPGTA - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Alimentos, obrigada pela contribuição na formação profissional.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões apresentadas.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

TOSONI, N. F. **POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE ENTEROCINAS EM CÉLULAS PLANCTONICAS E EM BIOFILME DE *Salmonella* Typhimurium E SOROTIPOS DE *Escherichia coli*.** 2017. 51f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos- PPGTA), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2018.

*Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium são bactérias que apresentam riscos à saúde humana, sendo capazes de formar biofilmes em superfícies abióticas, constituindo uma importante fonte de contaminação na indústria de alimentos. Por serem estruturas complexas, são resistentes a diversos sanitizantes, e uma alternativa para seu controle são as bacteriocinas, pois são capazes de eliminar bactérias através de formação de poros na membrana celular. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação de bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* em células planctônicas e células de biofilme formado por *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli*. Foram utilizados sobrenadante livre de células (CFS) contendo enterocina produzida por 3 isolados de *Enterococcus* (MF2, MF5 e L3), no teste de antagonismo em placas. Posteriormente, a enterocina foi testada em biofilme formado, sendo mensurado pela medida da biomassa após aplicação de cristal violeta. A ação sinérgica entre as enterocinas foi verificada pela construção de uma superfície de resposta por planejamento de misturas. O CFS bruto contendo enterocina apresentou inibição contra as bactérias indicadoras, em todos os tempos de contato testados (6h e 18h). A enterocina expressada pelo isolado L3 foi o que apresentou o melhor perfil de inibição sobre células planctônicas. Já no biofilme o melhor tempo de inibição ocorreu no tempo 18h. A superfície de resposta para o teste de sinergismo mostrou que houve pequena interação binária sinérgica entre os CFS MF2 e MF5 contra um dos patógenos. Os resultados obtidos mostraram que as enterocinas produzidas por esses *Enterococcus* tem potencial para uso como conservantes em alimentos, visto que o espectro de ação abrange também as bactérias Gram negativas ao contrário da nisina, que é usada atualmente.

**Palavras chaves:** Gram negativa, patógenos alimentares, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium are bacteria that present risks to human health, being able to form biofilms on abiotic surfaces, constituting an important source of contamination in the food industry, and an alternative for their control are the bacteriocins, because they are able to eliminate bacteria through the formation of pores in the cellular membrane. The objective of this study was to evaluate the action of bacteriocins produced by *Enterococcus* in planktonic cells and biofilm cells formed by *Salmonella* and sorovars *Escherichia coli*. Cell-free supernatant (CFS) containing enterocin produced by 3 *Enterococcus* isolates (MF2, MF5 and L3) were used in the plate antagonism test. Subsequently, the enterocin was tested in formed biofilm, being measured by the biomass measurement after application of violet crystal. The synergistic action among the enterocins was verified by the construction of a response surface by mixing planning. All *Enterococcus* isolates tested have more than two genes for expression of enterocin. The crude CFS containing enterocin showed inhibition against the indicator bacteria at all times of contact tested (6h and 18h). The enterocin expressed by the L3 isolate showed the best inhibition profile on planktonic cells. In the biofilm, the best time of inhibition occurred in the time 18h. The response surface for the synergism test showed that there was small synergistic binary interaction between the CFS MF2 and MF5 against one of the pathogens. The results show that the enterocins produced by these lactic acid bacteria (BAL) have potential for use as preservatives in foods, since the action spectrum also encompasses Gram negative bacteria in contrast to nisin, which is currently used.

**Keywords:** Gram Negative, foodborne pathogens, antimicrobial activity.



## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1	BIOFILME: FORMAÇÃO E CARACTERÍSTICAS.....	3
2.2	BIOFILME NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS .....	6
2.3	CONTROLE QUÍMICO DE BIOFILME.....	7
2.3.1	BACTERIOCINAS NO CONTROLE DE BIOFILME BACTERIANO.....	8
3	OBJETIVOS .....	11
3.1	OBJETIVO GERAL .....	11
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO .....	12
4.2	DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS ENTEROCINAS CONTRA <i>Escherichia coli</i> E <i>Salmonella Typhimurium</i> PELA TÉCNICA SPOT- ON- LAWN.....	12
4.3	OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS .....	12
4.4	ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ENTEROCINAS SOBRE CÉLULAS PLANCTONICAS DE <i>Escherichia coli</i> E <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	13
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE BACTERIOCINAS COMBINADAS.....	13
4.6	FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>Escherichia coli</i> E <i>Salmonella Typhimurium</i> EM PLACA DE POLIESTIRENO E AÇÃO ANTAGÔNICA DE ENTEROCINAS SOBRE CÉLULAS SÉSSEIS .....	14
	REFERÊNCIAS .....	16
5	RESULTADOS.....	26
6	CONCLUSÃO .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos dos problemas de saúde causados por alimentos são provenientes de alguma contaminação que ocorreu durante o processamento, de forma multifatorial, podendo ocorrer contaminação pela água, matéria prima, ar e formação de biofilmes bacterianos (CASTONGUAY et al., 2006; SHI, 2009; SREY et al., 2013; LIU et al., 2014).

Biofilmes são agregados uni ou multi-espécies, contendo materiais extracelulares, como polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios e também alto teor de DNA extracelular. São altamente vantajosos para sobrevivência, pois atua na proteção contra desidratação, estresse oxidativo, e ação de produtos sanitizantes (SHI, 2009; SREY et al., 2013).

A formação de biofilmes na indústria de alimentos acontece de forma simples, quando primeiramente compostos orgânicos e/ou inorgânicos aderem-se à superfície formando uma espécie de ambiente condicionante, em seguida células microbianas se aderem a esse ambiente. Quando os microrganismos estão em forma de vida planctônica recebem um estímulo para se aderir em alguma superfície. Existem fatores que facilitam esse processo, como: pH, temperatura, biodisponibilidade de nutrientes, entre outros. A adesão pode ocorrer em dois estágios: reversível, caracterizado por interações fracas entre microrganismo e superfície, ou irreversível, quando ocorre o ancoramento da célula por flagelos, pili e compostos extracelulares que fortalecem as ligações (OLIVEIRA, BRUGNERA & PICCOLI, 2010).

As formas de controle de biofilmes, visando obter alimentos seguros, exigem uma grande quantidade de desinfetantes, detergentes, bactericidas, sanitizantes entre outros, e por sua vez geram grandes quantidades de resíduos levando a outro desafio para as indústrias e as áreas de pesquisa pela busca por métodos ambientalmente seguros também desperta interesses.

Bacteriocinas são peptídeos produzidos por diversos microrganismos para se proteger de competidores, trata-se de uma defesa natural contra outros microrganismos, em sua maioria são catiônicas e atacam a membrana de outras células, no entanto as células produtoras desenvolvem resistência contra esta substância (CLEVELAND et al., 2001; COTTER, 2014). Enterocina é uma classe de bacteriocina catiônica produzida por *Enterococcus*, é resistente a uma ampla faixa de temperatura e pH, além de ser destruída facilmente pelas proteases na digestão.

Ainda, apresenta amplo espectro de atividade contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (GRANDE et al., 2005; MARTÍNEZ-BUENO e GÁLVEZ, 2017).

Considerando os benefícios e os resultados positivos que as bacteriocinas vêm apresentando quanto à inibição de microrganismos patogênicos em produtos alimentícios, novos testes e estudos relacionados à atividade antimicrobiana, produção e caracterização de bacteriocinas são de grande interesse e também necessários para o desenvolvimento de novas estratégias para controlar a contaminação de alimentos. Portanto, o presente trabalho consistiu em avaliar a ação inibitória de enterocina contra biofilmes formados por sorotipos de *Escherichia coli* e *Salmonella* Tiphymurium.

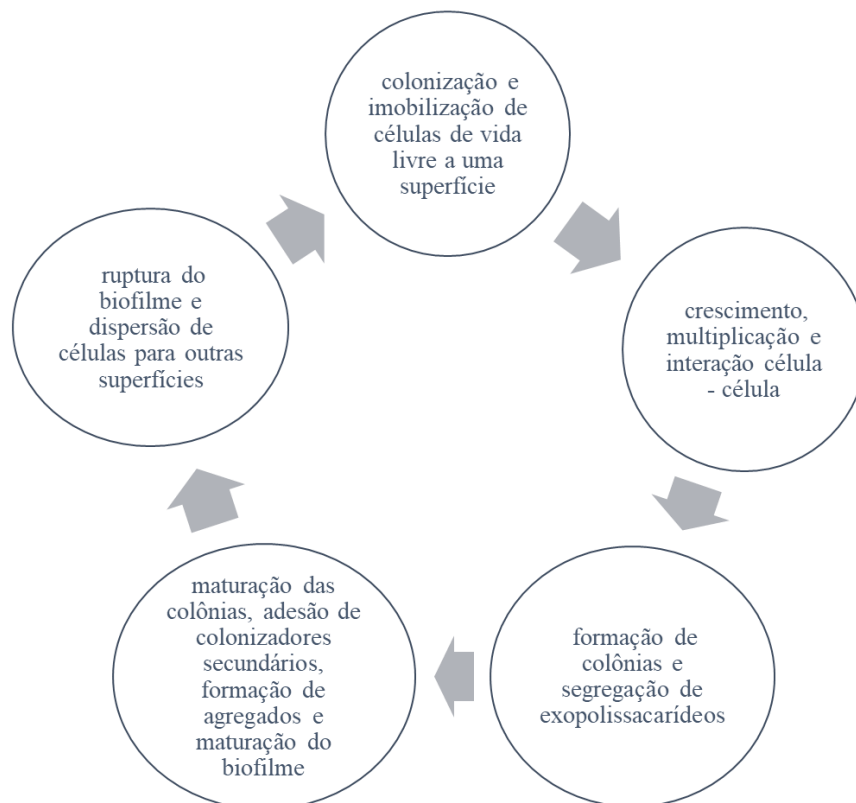
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BIOFILME: FORMAÇÃO E CARACTERÍSTICAS

Biofilmes microbianos são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato biótico ou abiótico, circundado por uma matriz extrapoliissacarídica (EPS), contendo ácidos nucleicos, proteínas e outras substâncias (MOHAMED & HUANG, 2007). Os microrganismos em biofilme podem apresentar diferentes fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN & COSTERTON, 2002).

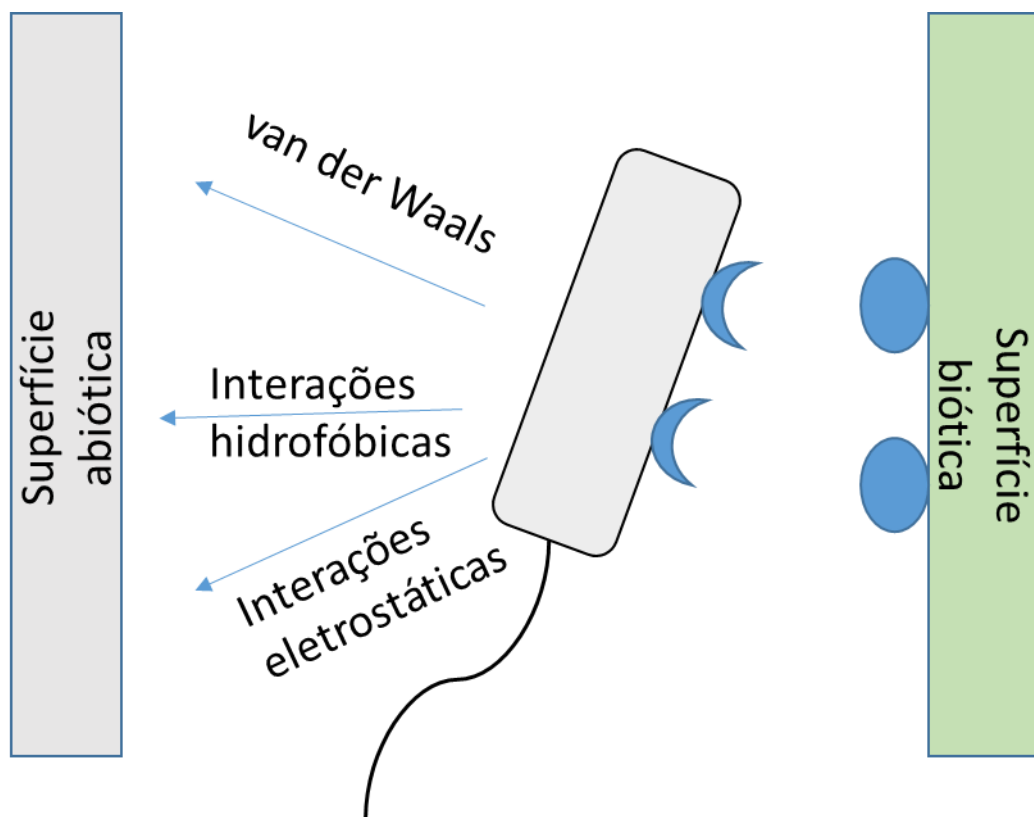
A formação de biofilmes é considerada uma problemática com relação à área ambiental, industrial e da saúde, devido a essas comunidades microbianas expressarem propriedades específicas, tais como o aumento da resistência a antibióticos, a luz UV, a produtos químicos como os biocidas; aumento das taxas de troca de material genético, alteração na biodegradabilidade e aumento na produção de metabólitos secundários (PRAKASH; VEEREGOWDA & KRISHNAPPA, 2003).

A formação de biofilme compreende várias etapas; sendo destacadas 5 etapas (DONLAN, 2002) (Figura 1).



**Figura 1.** Primeiras Etapas de formação de biofilme bacteriano (Fonte: Citação própria).

Segundo Watnick e Kolter (2000) os microrganismos, denominados de células planctônicas, se aproximam da superfície, formando uma associação provisória com a própria superfície e/ou outros microrganismos. Essa adesão inicial irá depender do tipo de material que o microrganismo irá se aderir; se for uma superfície abiótica, essas interações podem ocorrer por interações físico-químicas não específicas, já em superfícies bióticas a interação microrganismo/superfície é mediada por ligações moleculares específicas do tipo receptor-ligante (DUNNE, 2002) (Figura 2).



**Figura 2.** Interações envolvidas na adesão de células bacterianas planctônicas à superfície abiótica e biótica. As interações físico-químicas não específicas, envolvidas na adesão reversível, incluem as interações eletrostáticas de van der Waals e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e por adesinas, podendo culminar na adesão irreversível (Fonte: Dunne (2002)).

Após o processo de adesão, ocorre a formação de microcolônias e produção de exopolissacarídeos (EPS), que passam a estabilizar a associação. Após esta etapa forma-se uma estrutura tridimensional que consiste no biofilme microbiano, sendo compostos por células sésseis.

Vários elementos exercem influência no processo de adesão e formação de biofilmes bacterianos, como hidrofobicidade, carga da superfície, temperatura,

presença de substrato, aparatos celulares como pili, fímbrias e flagelos, diferenças existentes entre as superfícies utilizadas no processamento de alimentos e a configuração dos equipamentos em relação à facilidade ou não de limpeza e sanitização (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

Segundo Pereira et al. (2000), a topografia das superfícies, como sua composição, rugosidade e porosidade também podem ser determinantes para este processo.

Uma vez que as bactérias estejam ligadas irreversíveis a uma superfície, o processo de maturação do biofilme inicia-se. A densidade e complexidade do biofilme aumentam à medida que os organismos aderidos iniciam sua replicação e os componentes extracelulares gerados por esses organismos interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante para formar a matriz ou exopolissacarídeo (EPS). Esta substância envolve as células no interior do biofilme, fortalece a adesão entre as células, promove o suporte estrutural do biofilme e pode agir como receptor para novas interações. O EPS é composto principalmente de proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos (STOODLEY et al., 2002).

Outros fatores que controlam o amadurecimento de micro colônias são pH, perfusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade. Em determinado momento, o biofilme alcança uma massa crítica e um equilíbrio dinâmico é criado de forma que as camadas mais externas do biofilme começam a gerar células planctônicas, ou seja, inicia-se a liberação de células da estrutura formada, sendo capazes de colonizar outras superfícies (DUNNE, 2002).

O biofilme maduro pode apresentar microcanais internos, úteis na distribuição de nutrientes e água, no escoamento de metabólitos, enzimas alginatolases e as proteases, necessárias ao destacamento de células do biofilme e na distribuição de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (HALL-STOODLEY et al, 2004).

Sob determinadas situações, devido a uma programação celular, ocorre o desprendimento de células pertencentes ao biofilme (células sésseis) ou de grupos de células unidas pelo EPS que podem colonizar novo local (BAYLES, 2007).

O *quorum sensing* (QS), sistema de comunicação célula-célula, é outro fator que tem sido considerado de grande importância para a formação de biofilmes microbianos. Neste sistema as bactérias sintetizam compostos sinalizadores de baixo peso molecular, denominados de autoindutores (AIs), que irão modular e influenciar a formação do biofilme, modulando também outras funções como esporulação,

produção de bacteriocinas, expressão de fatores de virulência, produção de proteases e pigmentação, além de favorecer o acesso a nutrientes (VIANA, 2006).

O metabolismo de carboidratos também regula a produção de biofilme entre as várias bactérias gram-positivas, incluindo *E. faecalis*, sendo que um regulador transcricional dependente de glicose (PILLAI et al., 2004). Estudos realizados com *E. faecalis* e *E. faecium* demonstraram que a glicose teve influência positiva do carboidrato na capacidade de formação de biofilme destes microrganismos (MARINHO et al., 2010; PILLAI et al., 2004; CASSENEGO, 2013).

O pili bacteriano também estão envolvidos no desenvolvimento de biofilme, pois o pili promove o contato célula-célula (VAN HOUTT & MICHIELS, 2010). Ainda, fatores ambientais como temperatura, pH, presença de nutrientes, osmolaridade, presença de outras bactérias e tipo de superfície também interferem na formação de biofilme (MOHAMED & HUANG, 2007; VAN HOUTT e MICHIELS, 2010).

MARINHO et al. (2013) também revelaram que a temperatura influencia na formação de biofilme, sendo que em 10° C inibiu fortemente o desenvolvimento de biofilme e a 37°C ocorreu o melhor desempenho de formação de biofilme nos isolados de *E. faecium*.

## **2.2 BIOFILME NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

A formação de biofilme em superfícies utilizadas na produção de alimentos, vêm recebendo destaque, principalmente no que se refere aos malefícios de sua presença. Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores de alimentos, podendo comprometer a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados (CHEN et al., 2007; FUSTER-VALLS et al., 2008; MANSFELD, 2007).

Biofilmes de microrganismos potencialmente patogênicos foram detectados em alimentos e em superfícies de processamento de alimentos, comprometendo a higiene dos mesmos bem como podendo atuar como reservatório de patógenos e microrganismos deteriorantes. Biofilmes microbianos produzidos em superfícies de alimentos representam um risco para a saúde pública (SHI & ZHU, 2009; VAN HOUTT & MICHIELS, 2010; FONSECA 2010).

A fixação de microrganismos na superfície de alimentos pode ser considerada como um primeiro passo para a deterioração desses produtos, e sua permanência e

crescimento dependem de sua capacidade de se manter aderido. Assim o conhecimento sobre as características de formação de biofilmes em alimentos frescos é útil para estabelecer diretrizes sobre armazenamento seguro (BAE et al., 2014).

Outra problemática envolvendo a formação de biofilme na indústria de alimentos é a capacidade das células sésseis serem resistentes aos agentes empregados nos procedimentos de higienização. Alguns pesquisadores relatam que as células sésseis chegam a ser de 500 a 1000 vezes mais resistentes que as células planctônicas (DRENKARD, 2003). Um dos grandes responsáveis por conferir esta proteção é a matriz de EPS, que age como barreira física, impedindo que os agentes sanitizantes cheguem a seus sítios de ação. O EPS é também capaz de adsorver cátions, metais e toxinas, conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação.

Outros problemas são que alguns subprodutos celulares do biofilme aceleram a corrosão do aço inoxidável, e dificultam a troca de calor, reduz o fluxo de fluidos e filtração por membranas (LIAQAT et al, 2013).

Devido a este agravante, conhecer as condições que propiciam a formação de biofilme e as suas fragilidades é primordial para que estratégias de controle, mais econômicas e eficazes, afim de eliminar mais esta possibilidade de introdução de microrganismos na cadeia alimentar (HERRERA et al, 2007).

### **2.3 CONTROLE QUÍMICO DE BIOFILME**

Sob condições favoráveis as bactérias podem aderir e se reproduzir e quando não removidas de forma eficiente podem promover a formação dos biofilmes bacterianos (BOWER; McGUIRE & DAESCHEL, 1996). Após a formação do biofilme, os microrganismos que se encontram em seu interior são protegidos da remoção quando expostos ao escoamento de líquidos, alta turbulência e à ação de agentes químicos como os utilizados nos procedimentos de higienização (CLONTZ, 2008). Os materiais comumente utilizados no setor, tais como o aço inoxidável, vidro, borracha, policarbonato, poliuretano, poliestireno, polipropileno, titânio, alumínio e cerâmica vem sendo investigados quando a capacidade de adesão microbiana (DI CICCIO et al, 2015).

A indústria de alimentos utiliza diversas estratégias de higienização dos equipamentos, no entanto, tais procedimentos podem não ser totalmente eficazes sobre biofilmes bacterianos, selecionando fenótipos resistentes (SIMÕES et al., 2010).



Diferentes produtos químicos podem ser utilizados no processo de sanitização de utensílios e equipamentos, incluindo produtos tensoativos ou alcalinos, usados para suspender e dissolver os restos de alimentos pela diminuição da tensão superficial, ou emulsão de gorduras e desnaturação de proteínas (MAUKONEN et al., 2003). Cloro, peróxido de hidrogênio, iodo, ozônio e ácido peracético estão entre os principais agentes sanitizantes utilizados na indústria de alimentos (KUDA et al., 2008). Contudo, a eficácia dos sanitizantes pode ser influenciada pela presença de material orgânico, tais como gorduras, carboidratos e proteínas, pH, temperatura, dureza da água, inibidores químicos, além da concentração e tempo de contato (KUDA et al., 2008).

Castro (2012) avaliou a eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio, ácido peracético e digluconato de clorexidina, sobre a formação de biofilme de *E. faecium*, *E. faecalis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* em superfície de aço inoxidável. Embora os sanitizantes tenham sido utilizados nas concentrações recomendadas pelos fabricantes e frequentemente utilizadas nas indústrias de alimentos, estes não eliminaram o biofilme formado por estes microrganismos. Jessen e Lammert (2003) explicam que a remoção de microrganismos de superfícies de contato torna-se muito mais complicada após a formação do biofilme maduro, sendo mais eficiente adotar várias ações combinadas.

Meira et al. (2012) e Souza et al. (2014) verificaram o efeito de ácido peracético e hipoclorito de sódio sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* em superfícies de poliestireno e aço inoxidável, contudo, estes não foram eficientes para a completa remoção das células do biofilme.

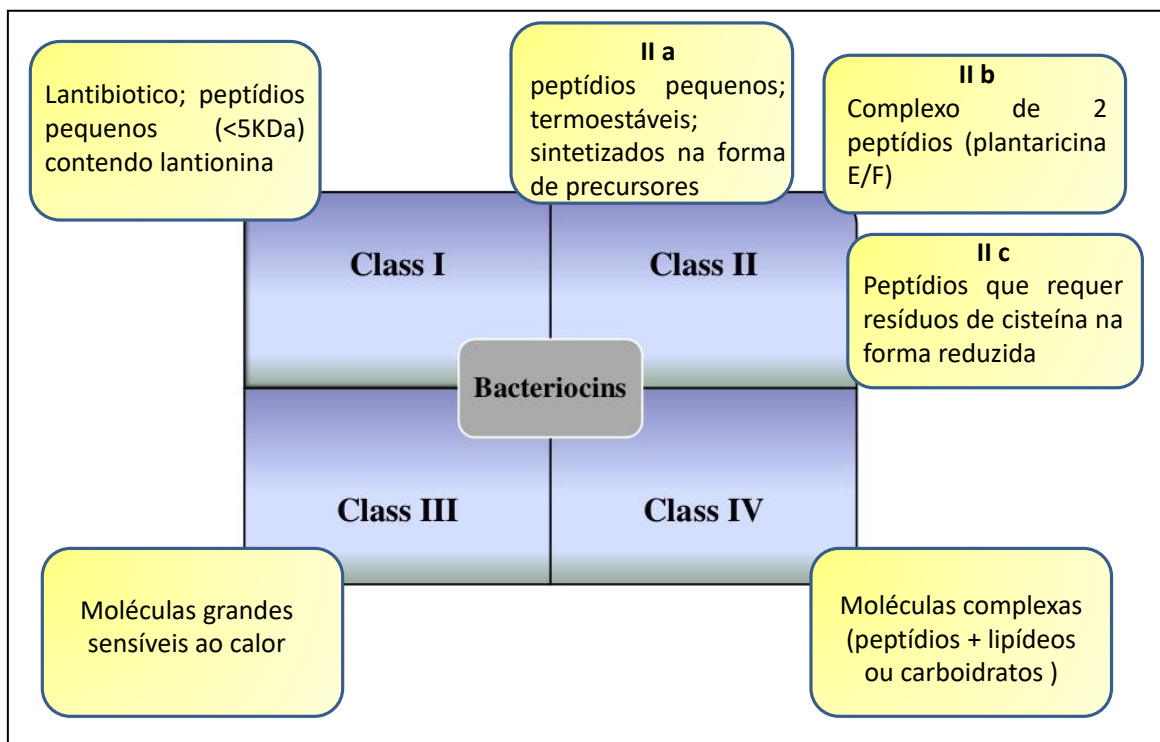
As células *persisters* aderidas às superfícies após a aplicação de sanitizantes reforçam o biofilme como uma fonte provável de contaminação cruzada, principalmente em superfícies de processamento de alimentos (MEIRA et al., 2012).

### **2.3.1 BACTERIOCINAS NO CONTROLE DE BIOFILME BACTERIANO**

Apesar das estratégias e conceitos de segurança na indústria de alimentos, ainda há vários problemas relacionados à contaminação de alimentos por patógenos alimentares (DI CICCIO et al, 2015). Uma alternativa para aumentar a segurança de alimentos envolve o uso de produtos provenientes de microrganismos (ROSS et al. 2002). Dentre estes, destaca-se o uso de bacteriocinas.

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas com atividade antimicrobiana produzidas por diferentes grupos de bactérias. Tais peptídeos antimicrobianos são ativos contra patógenos de origem alimentar, como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, e células vegetativas e esporos de *B. cereus* e *Clostridium botulinum* (GIRAFFA et al., 2003).

As bacteriocinas podem ser agrupadas em quatro grandes grupos com base em sua estrutura como, por exemplo, similaridades entre a sequência primária, propriedades físico-químicas, sequência líder e número de peptídeos que constituem sua atividade, e principalmente com base em seu modo de ação (AYMERICH et al., 1996). Cotter et al (2013) definiu quatro classes de bacteriocinas (Figura 3).



**Figura 3.** Classificação das bacteriocinas segundo (Fonte: Cotter, et al (2013)).

A maioria das bacteriocinas interage com lipídeos aniônicos presentes na membrana plasmática das bactérias alvo, sendo ativas principalmente contra bactérias Gram-positivas, já que essas são caracterizadas por um elevado teor de lipídeos aniônicos na membrana. A maioria das bacteriocinas age permeabilizando a membrana por meio da formação de poros, o que promove a dissipação da força próton motora (PMF) e inibição do transporte de aminoácidos (ABEE et al, 1995). A

PMF está envolvida em diversos processos na membrana citoplasmática, tais como o acúmulo de íons e metabólitos, e a síntese de ATP (BRUNO e MONTEVILLE, 1993).

Bacteriocinas também podem inibir bactérias Gram-negativas, neste caso necessitam transpor a membrana externa e alcançar a membrana plasmática da célula alvo para atuarem. Em contato com a membrana plasmática são capazes de interferir na síntese de DNA, RNA e proteínas. A exemplo, a microcina B17 inibe a enzima DNA-girase, e a microcina J25 inibe a RNA polimerase (COTTER et al., 2013).

As bactérias produtoras de bacteriocinas possuem um mecanismo de imunidade que as protegem da ação de suas próprias bacteriocinas. A proteção é conferida por um peptídeo de imunidade expresso concomitantemente às bacteriocinas (ABEE et al, 1995). A proteína de imunidade pode estar fracamente associada ou não associada às proteínas receptoras de membrana (manose fosfotransferase - Man-PTS). Quando a bacteriocina é produzida, a proteína de imunidade se liga ao receptor evitando que a bacteriocina se ligue a ele e forme poros na membrana citoplasmática, o que provocaria a lise celular (NES et al, 2007).

A nisina é a bacteriocina mais comum que vem sendo empregada na conservação de alimentos, no Brasil e no mundo, sendo utilizada principalmente em queijos pasteurizados para prevenir o crescimento indesejável de bactérias gram-positivas esporogênicas deterioradoras. Embora haja diversos relatos da inibição de biofilme bacteriano por nisina, este peptídeo possui melhor ação contra bactérias Gram positivas (JOERGER, 2003). Por este fato, diversos estudos tem focado no isolamento de novos isolados bacterianos produtores de bacteriocina, que apresentem ação antagônica contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, quando em formação de biofilme.

Zhao et al (2004), demonstraram que bacteriocina produzida por *Enterococcus durans* e *Lactococcus lactis* foram capazes de reduzir mais de 5 log UFC/cm<sup>2</sup> de biofilme de *Listeria monocytogenes*. Minei et al (2008) descreveram a redução na formação de biofilme em cupons de aço inox, quando co-cultivado *L. monocytogenes* e *Enterococcus faecium* bacteriogenicos. Winkelströter et al (2015) também comprovaram a diminuição da formação de biofilme quando *Lactobacillus paraplantarum* e *L. monocytogenes* foram crescidos em co-cultivo.

Células planctônicas e biofilme de *Bacillus subtilis* também foram afetados após contato com bacteriocina produzida por *L. acidophilus*. Nisina A e lacticina Q também

apresentaram efeito antagônico contra biofilme de *Staphylococcus aureus* (OKUDA et al., 2013).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a ação antimicrobiana e antibiofilme de enterocinas sobre isolados de *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a atividade antagônica de enterocinas sobre os isolados de *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium através da técnica de sobrenadante livre de célula (CFS).
- Determinar a atividade sinérgica em células planctônicas entre enterocinas combinadas através planejamento de misturas.
- Determinar a ação anti biofilme dos CFS contra biofilmes formados por *Salmonella* Typhimurium e sorotipos de *E. coli*.
- Confirmar por microscopia de fluorescência a ação anti biofilme dos CFS

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

Neste estudo foram avaliados 9 isolados bacterianos pertencentes ao grupo de Bactérias Ácido Láticas (BAL), previamente identificados e caracterizados como produtoras de bacteriocinas (GIAZZI, 2017).

As bactérias indicadoras foram *Salmonella* Typhimurium UK-1 ATCC 68169, *Escherichia coli* BAC 49LT ETEC (Enterotoxigênica), EHEC (enterohemorrágica) e EPEC (enteropatogênica), todas provenientes de surtos alimentares e gentilmente doadas pela prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Katsuko T. Kobayashi (Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina). As culturas encontram-se estocadas a -20°C e foram reativadas em 5 mL de caldo MRS (Himedia) a 37°C por 24h.

### **4.2 DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS ENTEROCINAS CONTRA *Escherichia coli* E *Salmonella* Typhimurium PELA TÉCNICA SPOT-ON-LAWN**

A detecção da atividade antimicrobiana foi realizada pela metodologia *Spot-on-lawn* (LEWUS; KAISER & MONTVILLE, 1991). Os isolados de BAL foram inoculados em forma de linha em meio BHI sólido e incubados a 37°C por 24h. Em seguida, 1 mL de clorofórmio foi adicionado na parte interna da tampa e as placas foram fechadas e mantidas em repouso durante 20 minutos em fluxo laminar, a fim de promover a morte celular das colônias bacterianas e eliminar a hipótese de uma possível competição entre microrganismos (DRECHSEL et al, 2009; SMARDA et al, 2007; WIRAWAN et al, 2007).

Ao BHI semi-sólido (0,8% de ágar) foi adicionado o microrganismo indicador na concentração final correspondente à escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \cdot 10^8$  células/mL) foi vertido sobre a cultura de BAL tratado com clorofórmio.

As placas foram incubadas a 37°C por 24h e a inibição foi verificada pela presença de halo translúcido ao redor da colônia (LEWUS; KAISER & MONTVILLE, 1991).

### **4.3 OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS**

O sobrenadante livre de células (CFS) foi obtido conforme metodologia descrita por Nilsen et al (1998). Os isolados que apresentaram atividade antagônica no teste

*spot on lawn* foram cultivados em caldo MRS a 37°C por 24 h. O caldo foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante esterilizado por filtração em membrana com poros de 0,22 µm (Millipore). O pH do sobrenadante foi ajustado em 6,5 e foi acrescentado 300 U/mL de catalase (AMMOR et al, 2006). O CFS foi mantido a -20°C.

#### **4.4 ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ENTEROCINAS SOBRE CÉLULAS PLANCTONICAS DE *Escherichia coli* E *Salmonella* Typhimurium**

O teste da atividade antimicrobiana do CFS foi realizado em placas de microtitulação segundo protocolo descrito por Harris et al (1989). Para tanto, 100 µL de meio BHI contendo *E. coli* ou *S. Typhimurium* (concentração final de  $1,5 \cdot 10^8$  células/mL) foi depositado nos poços, e em seguida foi depositado 100 µL do CFS tratado. As placas foram incubadas a 37°C por 6 e 18h. A inibição celular foi mensurada por DO (densidade óptica) a 540<sub>nm</sub>, em cada tempo de incubação.

#### **4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE BACTERIOCINAS COMBINADAS**

O estudo da interação entre as bacteriocinas foi realizada pelo método estatístico de planejamento de misturas Simplex - Centroid com pontos internos (Figura 5), onde  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  se referem a MF2, MF5 e L3, respectivamente. Foi utilizado o software STATISTICA 10.1.

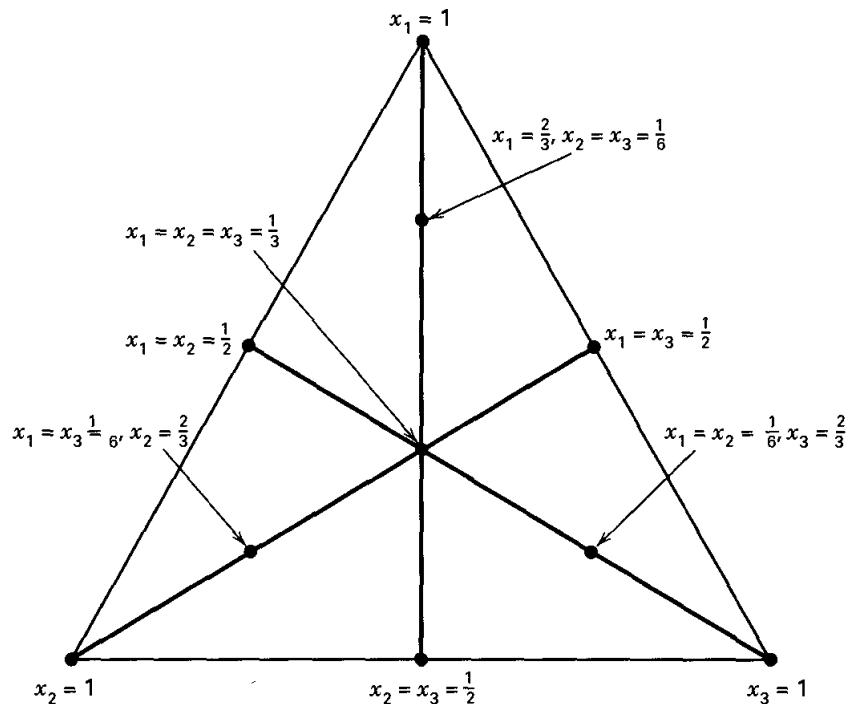


Figura 4. Diagrama ternário para planejamento de misturas simplex-centroid com pontos internos (Fonte: Montgomery (2013)).

#### 4.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Escherichia coli* E *Salmonella* Typhimurium EM PLACA DE POLIESTIRENO E AÇÃO ANTAGÔNICA DE ENTEROCINAS SOBRE CÉLULAS SÉSSEIS

A formação de biofilme seguiu a metodologia descrita por Marques e Suzart (2004). Para tanto, foram depositados 200  $\mu\text{L}$  de cultivo bacteriano em BHI ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) em poços de placas de microtitulação, sendo incubadas a  $37^\circ\text{C}$ . As placas foram feitas em duplicata, pois ao final do período de incubação, em uma das placas foi acrescentado 100  $\mu\text{L}$  de CFS, sendo mantidos por 6 e 18.

A formação de biofilme e ação do CFS se deu pela mensuração de biomassa total do biofilme. Após cada período de teste, os poços foram lavados com solução salina 0,85% e depositado 200  $\mu\text{L}$  de metanol, retirado e adicionado 200  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cristal de violeta (0,5%). A cada poço foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético a 33% e a  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  foi mensurada. O biofilme foi classificado de acordo com os critérios estabelecidos por Stepanovic et al. (2000), como segue:

$\text{DO}_A \leq \text{DO}_C$ - Considerada não formadora de biofilme (NF)

$\text{DO}_C < \text{DO}_A \leq 2 \text{DO}_C$ - Fracamente formadora de biofilme (FRF)

$2\text{DO}_C < \text{DO}_A < 4\text{DO}_C$ - Moderadamente formadora de biofilme (MF)

$DO_A \geq 4DO_C$ - Fortemente formadora de biofilme (FF)

$DO_C$  =densidade óptica do controle.

$DO_A$  = densidade óptica da amostra.

### **Análise de microscopia de fluorescência**

A análise por microscopia de fluorescência foi realizada para observar a morte celular de *E. coli* e *Salmonella* após adição de enterocina contendo CFS em biofilme pré-formado em lamínulas (13mm). As lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 15 min em temperatura ambiente no escuro com 30  $\mu\text{g}$  / ml de fluoróforos de iodeto de propídio (PI) (Sigma-Aldrich, Alemanha) em PBS (Johnson e Criss, 2013). Após a incubação, a solução de coloração foi aspirada, as lamínulas foram lavadas em PBS e os biofilmes foram observados usando um microscópio de epifluorescência (Zeiss, Alemanha). As células de cor avermelhada foram consideradas inviáveis.

### **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como densidade óptica (OD). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste T-Student com nível de significância  $p < 0,05$ .



## REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.169–185, 1995.
- ACUÑA, L.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Inhibitory Effect of the Hybrid Bacteriocin Ent35-MccV on the Growth of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in Model and Food Systems. **Food Bioprocess Technol**, v. 8, p. 1063, 2015.
- AHMADOVA, A., S. D. et al. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v.30, p.631–641, 2013.
- AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v. 17, p. 454–461, 2006.
- ANANOU, S.; BAÑOS, A.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁVEZ, A.; VALDIVIA, E. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. **Food Control**, n.21, p.478–486, 2010.
- ALAKOMI H.L., SAARELA, M., HELANDER, I. M. Effect of EDTA on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium involves a component not assignable to lipopolysaccharide release. **Microbiology**, v.149, p.2015–2021, 2003
- AL ATYA, A.K.; ABRIOUEL, H., KEMPF, I.; JOUY, E.; AUCLAIR, E.; VACHÉE, A.; DRIDER, D. Effects of Colistin and Bacteriocins Combinations on the In Vitro Growth of *Escherichia coli* Strains from Swine Origin. **Probiotics & Antimicro. Prot.**, 8: 183, 2016.
- AYMERICH, T.; HOLO, H.; HÅVARSTEIN, L. S.; HUGAS, M.; GARRIGA, M.; NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.5, p.1676–1682, 1996.
- BAE, Y. M., BAEK, S. Y., LEE, S. Y. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**. v.153, p. 465-473, 2012.
- BAE, Y.-M., ZHENG, L., HYUN, J.-E., JUNG, K.-S., HEU, S., LEE, S.-Y. Growth characteristics and biofilm formation of various spoilage bacteria isolated from fresh produce. **Journal of Food Science**, v. 79, 2014.
- BAYLES, K.W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5; p. 721-726, 2007.

BELOIN, C.; et al. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. **Mol Microbiol** 51, 659–674, 2004.

BOWER, C. K. M; McGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 152-157, 1996.

BOZIARIS, I. S , ADAMS M.R. . Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. **International Journal of Food Microbiology**. v. 53, p.105-113, 1999.

BRUNO, M. E. C.; MONTEVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.9, p. 3003–3010, 1993.

CABALLERO, N.; ABRIOUEL, H.; GRANDE, M. J.; LUCAS, R.; GÁLVEZ, A.; CAÑAMERO, M. M. Interactions of the cyclic peptide enterocin AS-48 with biocides. **Collection Symposium Series** , v. 13, p.16-18, 2011.

CALO-MATA, P., ARLINDO, S., BOEHME, K., DE MIGUEL, T., PASCOAL, A., BARROS-VELAZQUEZ, J. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. **Food and Bioprocess Technology**, v.1, p. 43–63, 2008.

CASSENEGO, A.P.V. et al. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. **Pesq. Vet. Bras.** vol.33, p. 1433-1440, 2013

CASTONGUAY, M.; SCHAAF, S. VAN DER; KOESTER, W.; KROONEMAN, J. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. **Res Microbiol.**, v. 157, p. 471–478, 2006.

CASTRO, Marcília Santos Rosado. **Enterococcus spp. e Pseudomonas spp. isolados de ambiente de processamento de produtos lácteos: identificação, formação de biofilmes multi-espécies e controle por agentes sanitizantes.** 2012. 225 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2012.

CHEN, J.; ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D. M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, p. 249-254, 2007.

CHMIELEWSKI, R. A. N., FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p. 22–32, 2003

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins : safe, natural antimicrobials for food preservation. , 2001.

CORNFORTH, D. M.; FOSTER, K. R. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. **Nature Reviews Microbiology**, n. 11, p. 285–293, 2013.

COTTER, P. D. Micro Commentary An “ Upp ” -turn in bacteriocin receptor identification. , v. 92, n. May, p. 1159–1163, 2014.

COTTER, P. D.; ROSS, R.P; HILL, C. Bacteriocins — A viable alternative to antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, n.11, p.95-105, 2013.

DANESE, P.N.; PRATT, L. A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. **Journal Bacteriol**, n.182, p. 3593–3596, 2000.

DAVIES, J.; SPIEGELMAN, G. B.; YIM, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. **Curr Opin Microbiol**, n. 9, p. 445–453, 2006.

DAVIES D: Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov**, v.2, p.114-123, 2003.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A.R.; PALUDI, D.; ZANARDIA, E.; GHIDINIA, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930–936, 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DRENKARD E.. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms **Microbes Infect**, v. 5, p. 1213–1219, 2003.

DUNNE JUNIOR, W. M. Bacterial adhesion: see any good biofilm lately? .**Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p.155-166, 2002.

ELLIOTT, D.; BURNS, J. L.; HOFFMAN, L. R. Exploratory Study of the Prevalence and Clinical Significance of Tobramycin-Mediated Biofilm Induction in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 54, p. 3024–3026, 2010.

EVANS, D. J.; ALLISON, D. G.; BROWN, M. R.; GILBERT, P. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. **Jounal Antimicrob Chemother**, n.27, 177–184, 1991.

FERRER-NAVARRO, M.; TORRENT, G.; MONGIARDINI, E.; CONCHILLO-SOLE, O.; GIBERT, I.; DAURA, X.; Proteomic analysis of outer membrane proteins and vesicles of a clinical isolate and a collection strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Proteomics**, n. 142, p.122-129, 2016.

FONSECA, J. F. S. G. **Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em enterococos clínicos e alimentares**. 2010. Dissertação (Mestrado Microbiologia Aplicada) Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, Portugal.

FURTADO, D.N. **Isolamento de bactérias lácteas produtora de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra**. Dissertação (mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. 2010.

FUSTER-VALLS, N. et al. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 308-314, 2008.

GIAZZI, A. **Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo Minas artesanais e leite cru**. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.2-3, p.215–222, 2003.

GRANDE BURGOS, M. J.; PÉREZ-PULIDO, R.; GÁLVEZ, A.; LUCAS, R. Biofilms formed by microbiota recovered from fresh produce: Bacterial biodiversity, and inactivation by benzalkonium chloride and enterocin AS-48. **LWT**, n. 77, p. 80–84, 2017.

GRANDE, M. J.; LUCAS, R.; VALDIVIA, E. V. A.; ABRIOUEL, H.; MAQUEDA, M.; OMAR, N. B.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; GÁLVEZI, A. Stability of Enterocin AS-48 in Fruit and Vegetable Juices. **Journal Food Prot.**, v. 68, n. 10, p. 2085–2094, 2005.

GUT, I. M.; BLANKE, S. R.; VAN DER DONK, W. A. Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin. **ACS Chem Biol**, n. 6, p. 744–752, 2011.

HALL-STOODLEY L., COSTERTON J.W., STOODLEY P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology** 2: 95–108, 2004.

HAMMAMI, R., ZOUHIR, A., LE LAY, C., BEN HAMIDA, J., FLISS, I. BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. **BMC Microbiology**, v.10, p. 22, 2010.

HARRIS, L.J., DAESCHEL, M.A., STILES, M.E.; KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal Food Prot.**, v.52, p.384-387, 1989.

HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L.; GONZÁLEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 585-591, 2007.

JAIN, S.; CHEN, J. Attachment and Biofilm formation by various serotypes of *Salmonella* as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. **Journal Food Prot**, n. 70, p. 2473–2479, 2007.

JEEVATATNAM, K. JAMUNA, M., BAWA, A.S. Biological preservation of foods-bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology**. v 4, p 446-454, 2005.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm. **FEMS Microbiology Letters**, n. 236, p. 163-173, 2004.

JENNES, W., DICKS, L. M. T., VERWOERD, D. J., Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 349–357, 2000.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and Desinfection in Meat Processing Plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 265-269, 2003.

JOERGER R. D. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. **Poultry Science Association**, n. 82, p. 640-647, 2003.

JOSEPH, B., OTTA, S.K., KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **Int J Food Microbiol**, v. 64, p.367–372, 2001.

KAPLAN, J.B. Antibiotic-induced biofilm formation. **International Journal of Artificial Organs**, v.34, p.737–751, 2011.

KUDA, T.; YANO, T.; KUDA, M. T. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 988-993, 2008.

LEWIS, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. **Biochemistry (Mosc)**, n. 70, 267–274, 2005.

LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1683-1688, 1991.

LIAQAT, I.; AHMED, S. I.; JAHAN, N. Biofilm formation and sporulation in *Bacillus subtilis*. **International Journal of Microbiology Research and Reviews**, n. 1, p.61-67, 2013.

LINARES, J. F.; GUSTAFSSON, I.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 103, p. 19484–19489, 2006.

LIU, N. T.; NOU, X.; LEFCOURT, A. M.; SHELTON, D. R.; LO, Y. M. Dual-species biofilm formation by *Escherichia coli* O157 : H7 and environmental bacteria isolated

from fresh-cut processing facilities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 15–20, 2014.

MANGALAPPALLI-ILLATHU, A. K.; VIDOVIC, S.; KORBER, D.R. Differential adaptive response and survival of *Salmonella enterica* serovar enteritidis planktonic and biofilm cells exposed to benzalkonium chloride. **Antimicrob Agents Chemother**, n. 52, p. 3669–3680, 2008.

MANSELD, Florian. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, 2007.

MARQUES, E.B.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.1069-1073, 2004.

MÁRQUEZ, M. L. F.; BURGOS, M. J. G.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R. L. Correlations among Resistances to Different Antimicrobial Compounds in *Salmonella* Strains from Hen Eggshells. **Journal of Food Prot.**, v. 81, n. 2, 178–185, 2018.

MARINHO, A.R. **Avaliação fenotípica e genotípica de fatores relacionados com a formação de biofilme por *Enterococcus* isolados de alimentos**. 2010.88f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MARINHO, A.R. et al. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, p. 423-426, 2013.

MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁLVEZ, A. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria*. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 478–486, 2017.

MAUKONEN, J.; MÄTTÖ, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, L.; MATTILASANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p.327-356, 2003.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. Methods for studying bacteriocins. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Eds.) **Methods in Microbiology**, v. 7a. p. 313-342, 1972.

MEIRA, Q. G. S.; BARBOSA, I. M.; ATHAYDE, A. J. A. A.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, v. 25, p. 469-475, 2012.

MINEI, C.C.; GOMES, B.C.; RATTI, R.P.; D'ANGELIS, C.E.M.; DE MARTINIS, E.C.P. Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal Food Prot.**, n. 71, 634- 638, 2008. MOHAMED, J. A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v.12, p.1581-8, 2007.



MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. John Wiley & Sons, Inc. 8, ISBN 978-1-118-14692-7, 2013.

MORETRO, T., et al. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **J Appl Microbiol** 106, 1005–1012, 2009.

MUÑOZ, A.; ANANOU, S.; GÁVEZ, A.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; RODRÍGUEZ, A.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocinAS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. **International Dairy Journal**, n.17, p.760–769, 2007.

MOHAMED, J. A.; HUANG, W. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1581–1588, 2007.

NILSEN, T.; NES, I. F.; HOLO, H. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. **Journal Bacteriol.**, v.180, p. 1848–1854, 1998.

NAGHMOUCHI, N.; BAAH, J.; HOBBER, D.; JOUY, E.; RUBRECHT, C.; SANÉ, F.; DRIDER, D. Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, p. 2719–2725, 2013.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HÅVARSTEIN, L. S.; BRURBERG, M. B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.70, n.2-4, p.113–28, 1996.

OLIVEIRA, N. M.; MARTINEZ-GARCIA, E.; XAVIER, J.; DURHAM, W. M.; KOLTER, R.; KIM, W. Biofilm Formation as a Response to Ecological Competition. **PLoS Biol** v. 13, n. 7, 2015.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Microbial biofilms in the food industry: a review. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.

OKUDA, K.; ZENDO, T.; SUGIMOTO, S.; IWASE, T.; TAJIMA, A.; YAMADA, S.; MIZUNOE, Y. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1-28, 2013.

PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of a anaerobic consortium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 181-186, 2000.

PEREZ, R. H.; ZONDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microb Cell Fact** 13:S3, 2014.

PILLAI, S. K.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C.; JR, MURRAY, B. E.; INOUYE, R. Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, p. 967–970, 2004.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B. M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria, **Current Science**, v. 85, p.1299.-1306, 2003.

PRIGENT-COMBARET, C.; PRENSIER, G.; LE THI, T.T.; VIDAL, O.; LEJEUNE, P.; DOREL, C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. **Environ Microbiol**, v. 2, p. 450–464, 2000.

REN, D.; BEDZYK, L.A.; THOMAS, S.M.; YE, R.W.; WOOD, T.K. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p. 515–524, 2004.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C.; Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 3-16, 2002.

RUSSELL, A.D.; FURR, J.R. Susceptibility of porin- and lipopolysaccharide-deficient strains of *Escherichia coli* to some antiseptics and disinfectants. **Journal Hosp Infect.**, v.8, 47–56, 1986.

SCHER, K., ROMLING, U., YARON, S. Effect of heat acidification, and chlorination on *Salmonella* entérica serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. **Appl Environ Microbiol**, v.71, p.1163– 1168, 2005

SCHRÖDTER K, et al. Phosphoric acid and phosphates. **Ullmann's Enc Ind Chem**, v. 26, p. 679–721, 2008.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407-413, 2009.

SOLANO, C.; GARCIA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. **Mol Microbiol** v. 43, p. 793–808, 2002.

SOUZA, E. L.; MEIRA, Q. G. S.; DE MEDEIROS BARBOSA, I.; ATHAYDE, A. J. A. A.; DA CONCEIÇÃO, M. L.; DE SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, p. 67–75, 2014.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**, v. 56, p. 187–209, 2002.

SHI, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 9, p. 407–413, 2009.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Bio fi lm formation in food industries : A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.



STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. v. 5, p.687-690, 2007.

TASHIRO, Y.; UCHIYAMA, H.; NOMURA, N. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 14, n.6, p.1349-1362, 2012.

TURNBULL, L.; TOYOFUKU, M.; HYNEN, A. L.; KUROSAWA, M.; PESSI, G.; PETTY, N. K.; ET AL. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. **Nature Communications**, v. 7, p. 11220, 2016.

VAN HOUTT, R., MICHIELS C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p.1117–1131, 2010.

VIANA, Eliseth de Souza. **Moléculas sinalizadoras de Quorum Sensing em biofilmes formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite**. 2006. 176 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

WANG, Q.; SUN, F. J.; LIU, Y.; XIONG, L. R.; XIE, L. L., et al. Enhancement of Biofilm Formation by Subinhibitory Concentrations of Macrolides in icaADBC-Positive and-Negative Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 2707–2711, 2010.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview – Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2675-2679, 2000.

WINKELSTRÖTER, L. K.; TULINI, F. L.; DE MARTINIS, E. C. P. Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 586–592, 2015.

WIRAWAN, R.E.; SWANSON, K.M.; KLEFFMANN, T.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. **Microbiology**, New York, v.153, p.1619-1630, 2007.

YARON, S.; ROMLING, U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. **Microbial Biotechnology**, v. 7, p.496-516, 2014.

YETHON, J. A., WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide as a Target for the Development of Novel Therapeutics in Gram-Negative Bacteria. **Current Drug Targets - Infectious Disorders**, v.1, 2001.

YILDIRIM, Z.; ILK, Y.; YILDIRIM, M.; TOKATLI, K.; ÖNCÜL, N. Inhibitory effect of enterocin KP in combination with sublethal factors on *Escherichia coli* O157:H7 or *Salmonella* Typhimurium in BHI broth and UHT milk. **Turk Journal Biol**, v. 38, p. 412-419, 2014.

YIM, G.; WANG, H. M. H.; DAVIES, J. Antibiotics as signalling molecules. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 362, p. 1195–1200, 2007.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3996–4003, 2004.

ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZ, W.; ROMLING, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Mol Microbiol**, v. 39, 1452–1463, 2001.

ZOTTOLA, E.A., SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry – should they be a concern? **Int J Food Microbiol**, v.23, p. 125–148, 1994.

## 5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados em língua inglesa e na forma de artigo científico.

### **EFFECT OF ENTEROCINS ON PLANKTONIC CELLS AND BIOFILM OF *Salmonella* TYPHIMURIUM AND *ESCHERICHIA COLI* SEROVARS**

#### **ABSTRACT**

*Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium are bacteria that present risks to human health, being able to form biofilms on abiotic surfaces, constituting an important source of contamination in the food industry. An alternative for their control are the bacteriocins, because they are able to eliminate bacteria through the formation of pores in the cellular membrane. The objective of this study was to evaluate the action of bacteriocins produced by *Enterococcus* in planktonic cells and biofilm cells formed by *Salmonella* and sorovars *Escherichia coli*. Cell-free supernatant (CFS) containing enterocin produced by 3 *Enterococcus* isolates (MF2, MF5 and L3) were used in the plate antagonism test. Subsequently, the enterocin was tested in formed biofilm, being measured by the biomass measurement after application of violet crystal. The synergistic action among the enterocins was verified by the construction of a response surface by mixing planning. The crude CFS containing enterocin showed inhibition against the indicator bacteria at all times of contact tested (6h and 18h). The enterocin expressed by the L3 isolate showed the best inhibition profile on planktonic cells. In the biofilm, the best time of inhibition occurred in the time 18h. The response surface for the synergism test showed that there was small synergistic binary interaction between the CFS MF2 and MF5 against one of the pathogens. The results show that the enterocins produced by these lactic acid bacteria (BAL) have potential for use as preservatives in foods, since the action spectrum also encompasses Gram negative bacteria in contrast to nisin, which is currently used.

#### **INTRODUCTION**

Foodborne pathogens, such as *Escherichia coli* or *Salmonella* spp. may be introduced into food processing facilities through different routes (eg raw materials, water, air and personnel) (FINN et al, 2013) and can contaminate food during industrial processing (LIN et al, 2006). Inadequate storage temperatures allow these microorganisms to multiply in ready-to-eat foodstuffs and pose a significant problem

for human health if pathogens reach high levels during storage. Therefore, it is essential to minimize the prevalence and level of bacteria in these food products.

*Escherichia coli* and *Salmonella spp* are highly virulent and are also considered major foodborne pathogens worldwide, both for its pathogenic characteristic and for the ability to form biofilm.

The formation of biofilms by *Salmonella spp* and pathogenic *Escherichia coli* has attracted a great deal of attention, since these microorganisms in biofilms are protected from the action of sanitizers, increasing the likelihood of survival and subsequent contamination of food (VAN HOUDT & MICHIELS, 2010; YARON & ROMLING, 2014).

Alternatively, the use of protective cultures or their products (natural antimicrobials) particularly from Lactic Acid Bacteria (LAB) might extend the shelf-life of processed products without any detrimental effect on their organoleptic qualities (SIROLI et al, 2015). Bacteriocins are natural antimicrobials produced by Gram-negative and -positive bacteria (DRIDER & REBUFFAT, 2011).

Bacteriocins are antimicrobial peptides ribosomally synthesized that are able to kill or inhibit phylogenetically close (narrow-spectrum) or distant (broad-spectrum) bacteria (COTTER et al, 2005). Many bacteria produce at least one bacteriocin, thus having an impact on control competing and surrounding bacteria in a food niche (RILEY & WERTZ, 2002).

Bacteriocins produced by LAB may be classified into four groups based on their structure, such as, for example, similarities between the primary sequence, physicochemical properties, leader sequence and number of peptides that constitute their activity, and mainly based on their mode of action based on their modification status (COTTER et al, 2013). Bacteriocins produced by enterococci are referred to as enterocins and have a specific spectrum of inhibitory activity, mode of action, molecular weight and chemical structures (FOULQUIE MORENO et al, 2003; FRANZ et al, 2007).

Enterocins form pores in the cytoplasmic membrane of bacterial cells and provoke loss of internal compounds leading to cell death (ZHAO et al, 2004; GUT et al, 2011). The interest in enterocins has significantly increased because of their activity against several foodborne pathogens Gram positive and Gram negative (JENNES et al, 2000). Further studies permitted the broadening of this spectrum as inhibitory activities were reported against *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Shigella spp.* and *Escherichia coli* (BURGOS et al, 2017; LEVKUT et al, 2009).

Considering the benefits and positive results that enterocins have on the inhibition of pathogenic microorganisms in food products, new tests and studies related to the antimicrobial activity, production and characterization of bacteriocins are of great interest and are also necessary for the development of new strategies for control food contamination. Therefore, the present work consisted in evaluating the inhibitory action of enterocin on biofilms formed by serotypes of *Escherichia coli* sorovars and *Salmonella* Typhimurium.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Biological Material**

In this study, 9 bacterial isolates belonging to the group of lactic acid bacteria (BAL), previously identified and characterized as bacteriocin producers (GIAZZI, 2017) were evaluated. The indicator bacteria were *Salmonella* Typhimurium UK-1 ATCC 68169, *Escherichia coli* BAC 49LT ETEC (enterotoxigenic), EHEC (enterohemorrhagic) and EPEC (enteropathogenic), isolated from food outbreaks. The cultures were stored in a freezer -20°C.

### **Screening for antagonistic activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium**

Screening for antibacterial activity of enterocin was performed according to a previously described method by Ogaki et al. (2016). The LAB strains were streaked on plates containing BHI agar (Himedia) and were incubated at 37°C for 24 h. The plates were inverted to receive 1 ml of chloroform in the plate covers and remained closed for 20 min. The residual chloroform was evaporated by opening the plates. Through the pour plate method, *E. coli* sorovars ETEC, EPEC, EHEC and *Salmonella* Typhimurium ( $10^8$  cells/ml) were inoculated into soft BHI agar (0.8%) and was poured into the LAB plates forming an overlay. The plates were incubated at 37°C for 24 h. The sensitivity of the strain in question was evaluated by checking for clear zones around the spots.

### **Determination of bacteriocin production and antimicrobial activity**

The cell free supernatants (CFS) of the isolates previously select, followed as described by Tomé et al (2009), with modification. Preparation of cell-free supernatant (CFS) isolates were cultured in Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Acumedia- Neogen) broth medium at 37 °C for 18 h. Cultures were adjusted to 0.5 McFarland standard in MRS broth at pH 6.2 following incubation at 37 °C, 180 rpm for 24 h. The respective CFS was obtained by centrifugation at 12,000xg for 15 min, neutralization with 1 M NaOH to a pH of 6.5, and filtered through a 0.22-µm filter (Millipore). The CFS was stored at -20°C.

The antimicrobial activity of CFS was confirmed in agar well diffusion assay (AWDA). In the AWDA, 30 µL of the CFS were deposited in 5 mm wells on the BHI agar plates containing *E. coli* sorovars or *Salmonella* Typhimurium in the concentration of  $1 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>. Finally, the plates were incubated for 24 h at 37 °C and after this period the inhibition zones were detected by clear region around the well, in which halo was measured. Each determination was carried out in duplicates.

### **Antagonic action of enterocins against planktonic *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium cells**

Antagonistic action of enterocin on target bacteria was performed according to microtiter plates (TOBA et al, 1991); 100 µL of bacterial inoculum ( $1 \times 10^8$  CFU / mL) were transferred to the polystyrene microplate along with 100 µL of each enterocin (in CFS), incubation occurred at 37 °C for 6 and 18 h and the results were measured by optical density at OD<sub>540nm</sub>.

### **Activity of enterocin on preformed biofilm**

The activity of enterocin on biofilm formation was quantified in a microtiter plate assay according to Camargo et al. (2016), with modifications. Briefly, overnight culture of the indicator bacteria were adjusted to 0.5 McFarland standard in BHI and 100 µL transferred to a 96- well polystyrene microtitre with addition of 100 µL of CFS of each indicator bacteria, and the plates were incubated at 37 °C for 24 h. For the control, 100 µL of MRS broth was added to each well. After incubation culture media were discarded, and the wells were washed with NaCl (0.85%) three times to remove nonattached cells, and 100 µL of enterocins produced by the isolates MF2, MF5 and

L3 were added and maintained for 6 or 18 hours. The inhibitory activity of on developing biofilm was determined based on determination of biofilm biomass. For this, after incubation, the enterocin were discarded, and the wells were washed. Cells were fixed by addition of 200  $\mu$ L of methanol (Synth) for 15 min. Then, crystal violet (1.0% solution) was added and after 15 min, the plates were washed with NaCl (0.85%). After drying, 33% acetic acid for 20 min was added to solubilize the crystal violet. The absorbance was measured at OD<sub>540nm</sub> in spectrophotometer (Biotek EL808). Anti-biofilm activity was presented as percentage of biofilm reduction compared to control (biofilm without CFS exposure). For each strain, the experiment was performed in triplicate with three replicate wells per microtitre plate.

### **Determination of synergistic activity between combined enterocins**

The study of the interaction between enterocins was performed by the Statistical Method of Simplex - Centroid blends with internal points, where X1, X2 and X3 refer to MF2, MF5 and L3, respectively. Statistica 10.1 software was used. For this, an antagonistic action of enterocin on target bacteria was performed according to microtiter plates (TOBA et al, 1991).

### **Fluorescence microscopy analysis**

Fluorescence microscopy analysis was done to observe cell death of the *E. coli* and *Salmonella* following addition of CFS-containing enterocin on developing biofilm and on preformed biofilm on coverslips (13mm). The coverslips were washed twice with PBS and incubated for 15 min at room temperature in the dark with 30  $\mu$ g/ml of fluorophores propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, Germany) in PBS (Johson and Criss, 2013). After incubation the staining solution was aspirated, the coverslips were washed in PBS and biofilms were observed using an epifluorescence microscope (Zeiss, Germany). The cells with reddish color were considered not viable.

### **Statistical analysis**

The results are expressed as Optical Density (OD). The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by T-Students with the level of significance  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The antagonistic potential of 9 bacterial isolates, previously identified and characterized as belonging to the lactic acid bacteria group (LAB) and bacteriocin producers (GIAZZI, 2017) was evaluated. In our tests we performed platelet antagonism experiments against *Escherichia coli* serotypes ETEC, EPEC, EHEC and *Salmonella* Typhimurium for initial screening (Table 1). The diameter of the inhibition halos were measured between 6 to 17 mm, classified as weak, medium and strong inhibitors.

**Table 1.** Antagonistic activity of the isolates Bacteria Lactic Acids against *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* serovars.

LAB isolate	<i>Salmonella</i> Typhimurium	EHEC	EPEC	ETEC
<i>Enterococcus</i> sp. F4-2	++	++	+	-
<i>Enterococcus</i> sp. I	+	-	+++	++
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> K1	+	-	++	++
<i>Enterococcus durans</i> K5	-	++	+	++
<i>Enterococcus faecium</i> K6	+	+	+++	-
<i>Enterococcus</i> sp. L3	+	+++	++	++
<i>Enterococcus durans</i> MF2	++	+++	++	+
<i>Enterococcus durans</i> MF5	++	+++	+	++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P	+	-	++	+

(-) not inhibition; Halos: (+) 6 mm / weak; (++) 7 to 16 mm / medium; (+++)  $\geq 17$  mm / strong; EHEC - enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EPEC - Enteropathogenic *Escherichia coli*; ETEC - enterotoxigenic *Escherichia coli*.

*Enterococcus* sp (L3), *Enterococcus durans* (MF2) and *E. durans* (MF5) were selected for inhibiting concomitantly all target bacteria tested and presenting medium to strong inhibition halos. In previous studies, these isolates were characterized with the presence of two or more genes expressing enterocins. MF2 isolate has *entA* and *entB* genes; MF5 has *entA*, *entB* and *entX* gene, both isolated from cheese; the L3 isolate is derived from milk and has the *entA* and *entB* gene. Enterocin from isolates MF2, MF5 and L3 were obtained from the crude cell culture, treated with catalase and pH adjusted to 6.5, to exclude possible inhibition by acids and peroxides, and in the sequence we proceeded with the inhibitory confirmation of enterocin on the indicator bacteria by the AWDA technique. We emphasize that the enterocin present in the CFS did not undergo any process of concentration or purification, nor did we quantify its presence in the medium.



The OD values of the inhibition of the MF2, MF5 and L3 CFS on planktonic cells and biofilm of the indicator isolates are presented in Figure 1. The biofilm formation results of the indicator isolates were ranked according to the classification of Stepanovic et al (2000), being classified as weak tracer for *Salmonella* Typhimurium and EHEC, and moderate tracer for EPEC and ETEC.

The inhibition of planktonic cells was confirmed after 6 and 18 hours of incubation, however, the inhibitory action varied between the microorganisms and incubation time. In the first 6 hours of incubation there was a significant decrease in the cellular development of all the target microorganisms; at 18 h, we observed that enterocin from the L3 isolate significantly reduced the cellular development of all bacteria tested ( $p < 0.05$ ).

Biomass of *Salmonella* Typhimurium, EHEC, EPEC and ETEC preformed biofilm was inhibited by the addition of all four enterocin producing enterococci, however, only—with 18h of incubation. On the other hand, at 6 h of incubation there was no difference in the measurement of biofilm, showing an increase in the formation of these depending on the enterocin applied.

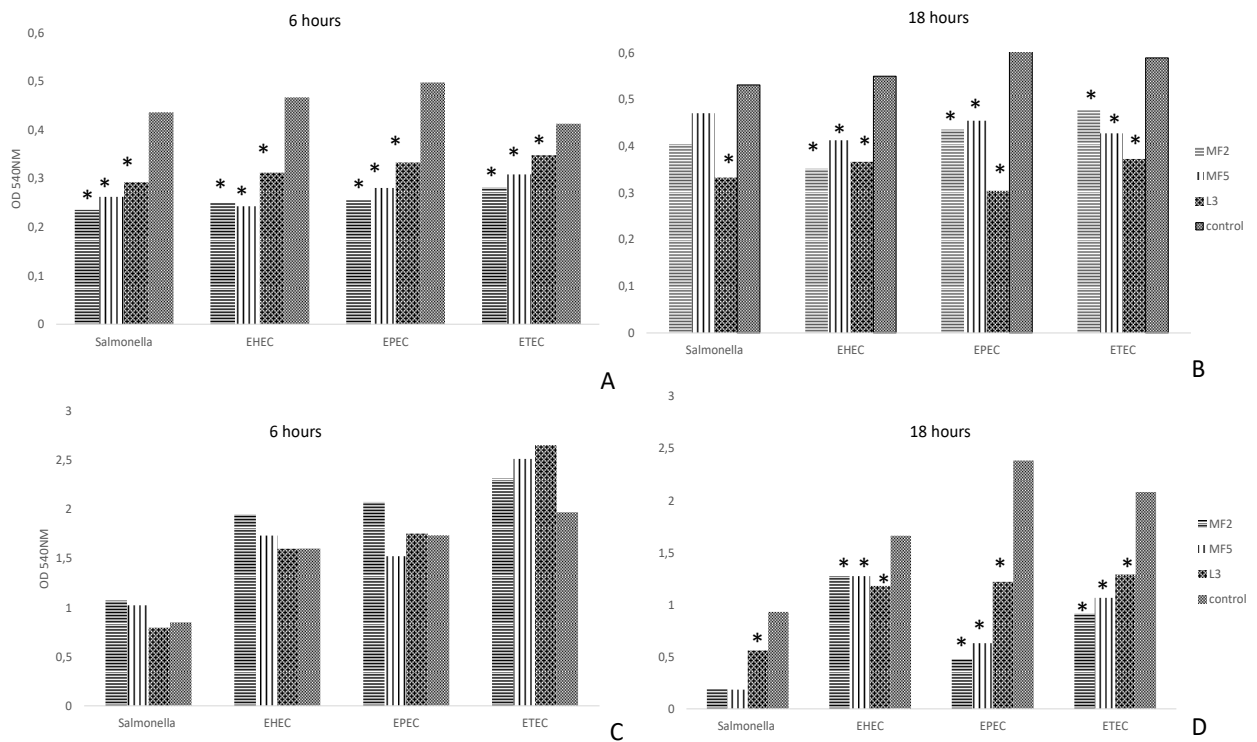


Figure 1. Effect of enterocin on cell-free supernatant (CFS) from *Enterococcus* sp (L3), *Enterococcus durans* (MF3) and *E. durans* (MF5) on planktonic cells (A,B) and preformed biofilm (C,D) at 6 and 18 h incubation. Asterisk represent significance level  $p < 0.05$

It was noteworthy that there was a distinct action between the enterocins tested against the indicator bacteria, when they were in free form and in biofilm. These data suggest that these enterocins affect the cells differently and can be used in combination.

Later in our study, the interaction of the three CFS against the four indicator pathogens was evaluated. The evaluation was done by mixing planning, where the results gave rise to the response surface that has as components all possible binary interactions, and ternary interactions (Figure 2). However, little synergistic action was observed when combining the MF2 and MF5 enterocines when tested against *Salmonella* and EHEC. For the other isolates, no synergism was observed.

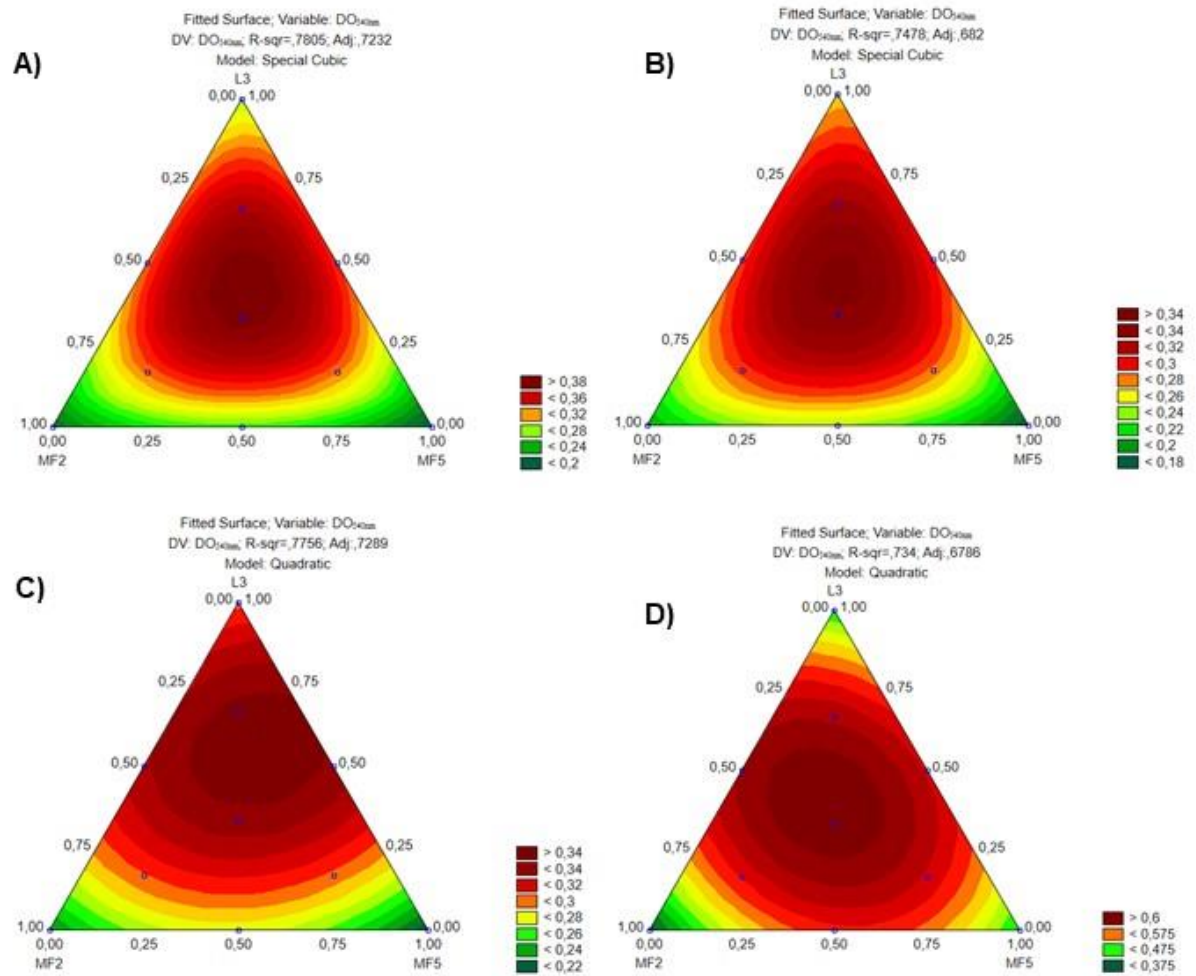


Figure 2. Response surface of the mixture planning for evaluation of synergistic activity among enterocin against: (A) *Salmonella Typhimurium*; (B) EHEC; (C) EPEC and (D) ETEC

The images obtained by the fluorescence microscopy confirmed the reducing viability of development biofilm and preformed biofilm of *Salmonella* Typhimurium, EHEC, EPEC and ETEC exposed to CFS-containing enterocin (Figure 3). In the absence of enterocin (control) it can be observed a reduced amount of dead cells compared to treated biofilms, while the addition of CFS on preformed biofilm resulted in grouping of cells and a larger number of dead cells (reddish color)

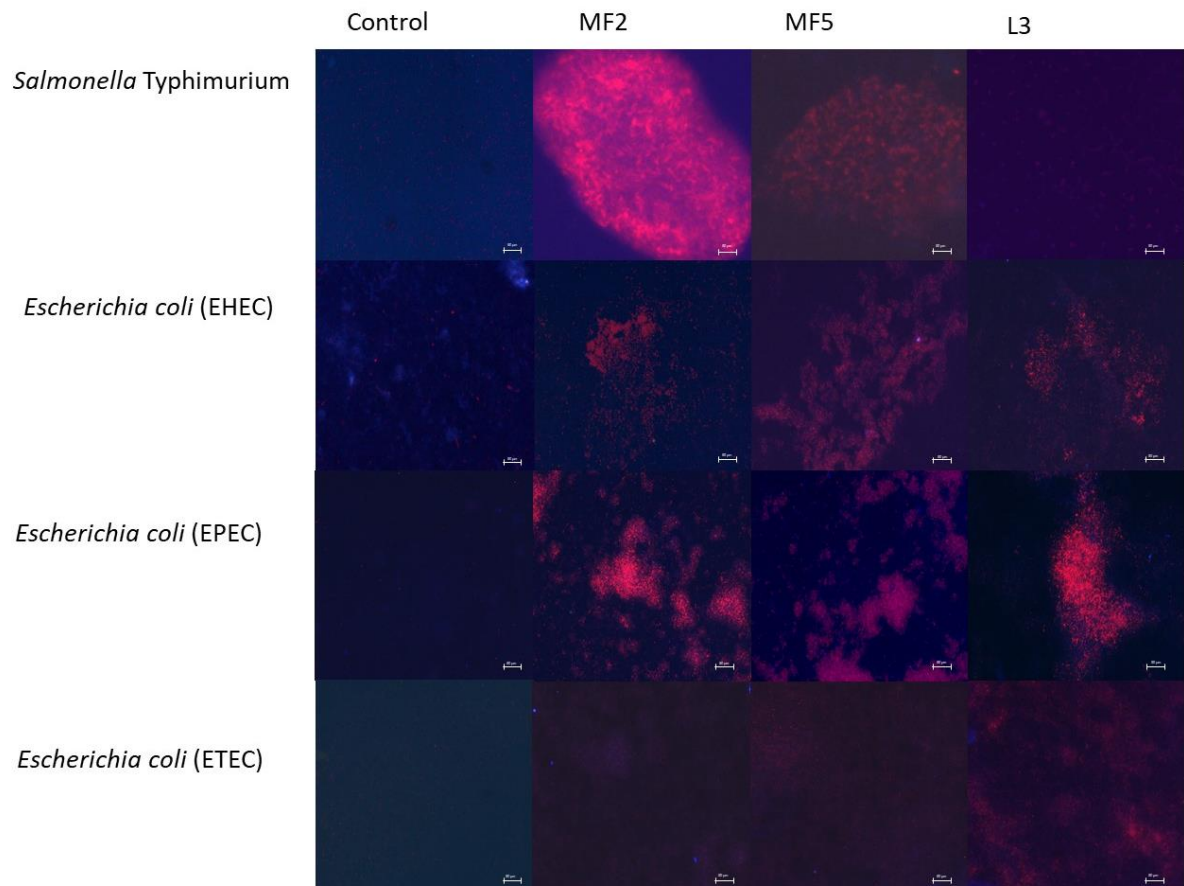


Figure 3 . Fluorescence microscopy images 1000x. Anti-biofilm activity of enterocin MF2, MF5 and L3 (cell-free supernatant). Preformed biofilm, stained with propidium iodate. The reddish fluorescence labelled cells with damaged membranes.

## DISCUSSION

Consumer quest for healthy foods has increased the demand for natural preservatives rather than chemical additives. Preservatives must meet certain criteria to be considered natural, such as low toxicity, stability during processing and storage, low concentration efficiency, and no deleterious effects on economic and food viability. In this context, the bacteriocins (JEEVARATNAM et al, 2005) are the most common criteria.

In this study, enterocins were present in crude CFS produced by three *Enterococcus* isolates. MF2, MF5 and L3 were counted against Gram negative bacteria *Salmonella* Typhimurium and *E. coli* ETEC, EPEC and EHEC serotypes. In general, all CFS showed inhibitory activity, varying in intensity between the indicator isolates and the time tested, thus being considered a dependent (cell-time dependent) condition (Figure 1).

The use of *Enterococcus* species in food, in contrast to other LAB species, remains to be clarified. In fact, some species were implicated in several infections (KAYSER, 2003), however, Khan et al (2010) and Franz et al (2011) reported their use in fermented foods and also as bioprotective limit the development of food-borne pathogens and deteriorating microorganisms.

Only two bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB), nisin and pediocin, are commercially used as food preservatives (PEREZ et al, 2014). However, these bacteriocins are not usually active against Gram-negative bacteria (CALO-MATA et al, 2008; HAMMAMI et al, 2010). Therefore, there is a need to characterize other bacteriocins produced by other LAB genera and to elucidate their potential application in food safety.

*Enterococcus* isolates evaluated showed more than one gene for the expression of enterocins. Still, these bacteriocins were characterized as to their protein characteristics, having their action inhibited after the action of proteolytic enzymes. They also presented thermal resistance, maintaining their antagonistic action even after treatment at 100°C for 20 minutes (methodology and data not shown). These data suggest that the enterocins MF2, MF5 and L3 belong to group II, according to classification proposed by Cotter et al (2013). Enterocin-containing CFS was also treated with catalase and pH adjusted to discard the possible action of acid and carbon dioxide, as described by Jeenes et al. (2000).

In addition, the fact that enterocines are inactivated after treatment with different proteolytic enzymes (trypsin and chymotrypsin) indicate the potential use as food preservatives, since they can be inactivated *in vivo* and are not intended to affect host intestinal flora in case incorporation into food.

Satisfactory inhibition against planktonic cells of *Salmonella* and *E. coli* has been demonstrated, even enterocin being diluted in the culture medium. We also observed a synergistic interaction between the enterocines MF2 and MF5 for some indicator microorganisms. Although these results are interesting, new analysis strategies are needed to confirm synergism.

These results differ from several authors, who reported the difficulty of inhibition against Gram negative bacteria. Ahmadova et al (2013) and Acuña & Barros-Velázquez (2015) did not observe an inhibitory effect of purified enterocins against strains of *E. coli* and *Salmonella*. Alakomi et al. (2003), Schrödter et al. (2008) and Yildirim et al. (2014) reported the antagonistic action of enterocin KP against *E. coli* O157: H7 and *Salmonella* only when it was combined with EDTA or sodium tripolyphosphate. These studies differ from the results obtained in these experiments, where the action of the enterocin MF2, MF5 and L3 on the *Salmonella* isolates and *E. coli* serotypes without addition of ion chelator was observed. This indicates that enterocins produced by our isolates have more satisfactory inhibitory activity.

One of the hypotheses of the difficulty of action of bacteriocins against Gram negative bacteria is the presence of LPS (lipopolysaccharide) anchored in the outer membrane of the microorganism (FURTADO, 2010; ANANOU et al, 2010; MUÑOZ et al, 2007). The outer membrane acts as a permeability barrier to the action of antimicrobial compounds, preventing the penetration of bacteriocin and making it difficult to bind to the site of action (YETHON & WHITFIELD, 2001).

For several decades, biofilm formation in the food industry has attracted a great deal of attention, mainly by pathogens such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, pathogenic *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* (CHMIELEWSKI & FRANK 2003; YARON & ROMLING, 2014).

The isolates used in the experiments were presented as weak and moderate biofilm builders, as ranked by Stepanovic et al (2000). However, the action of the enterocines MF2, MF5 and L3 was independent of the ranking presented by the isolates. Enterocin was deposited after the biofilm formed, and after 6 and 18 h the

total biofilm biomass was evaluated. The results showed that the action was time dependent and not the biofilm forming profile, and the best action of the enterocin occurred with 18 h of contact with the cell.

Our results, no synergistic inhibitory action was observed between the three CFS containing enterocins, only binary synergistic interaction between MF2 and MF5. Others, show that the use of nisin and na enterocin combination toward *L. monocytogenes* strain required four-fold less nisin and enterocin, showing a novel strategy to fight against food pathogens (AL-SERAIH et al, 2017). An alternative would be to test the synergistic action between different classes of bacteriocins, for example enterocin (class II) and nisin (class I).

This study allowed us to show the effective action of enterocin against planktonic cells and biofilm of *E. coli* and *Salmonella*. Still, it allowed us to show a small synergistic action among the tested enterocines. Regardless of this, our results show very promossores, since our tests were carried out with enterocin diluted in the supernatant of the culture medium. We imagine that the concentration and purification of the same will bring us even more expressive results in the reduction of food pathogen.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Fundação \_Araucária Paraná—Brazil and Technological Federal University of Paraná. N.F.T was fellowshipholder of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The target microorganisms were kindly donated by Dr Renata Katsuko T. Kobayashi (Department of Microbiology, State University of Londrina).

## REFERENCE

ACUÑA, L.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Inhibitory Effect of the Hybrid Bacteriocin Ent35-MccV on the Growth of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in Model and Food Systems. **Food Bioprocess Technol**, v. 8, p. 1063, 2015.

AHMADOVA, A., S. D. et al. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v.30, p.631–641, 2013.

ANANOU, S.; BAÑOS, A.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁVEZ, A.; VALDIVIA, E. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. **Food Control**, n.21, p.478–486, 2010.

ALAKOMI H.L., SAARELA, M., HELANDER, I. M. Effect of EDTA on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium involves a component not assignable to lipopolysaccharide release. **Microbiology**, v.149, p.2015–2021, 2003

AL-SERAIH, A.; BELGUESMIA, Y.; BAAH, J.; SZUNERITS, S.; BOUKHERROUB, R.; DRIDER, D. Enterocin B3A-B3B produced by LAB collected from infant faeces: potential utilization in the food industry for *Listeria monocytogenes* biofilm management. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, p. 205–219, 2017.

BURGOS, M. J. G.; PÉREZ-PULIDO, R.; GÁLVEZ, A.; LUCAS, R. Biofilms formed by microbiota recovered from fresh produce: Bacterial biodiversity, and inactivation by benzalkonium chloride and enterocin AS-48. **LWT**, v. 77, p. 80–84, 2017.

CALO-MATA, P., ARLINDO, S., BOEHME, K., DE MIGUEL, T., PASCOAL, A., BARROS-VELAZQUEZ, J. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. **Food and Bioprocess Technology**, v.1, p. 43–63, 2008.

CAMARGO AC, DE PAULA OA, TODOROV SD, NERO LA. In vitro evaluation of bacteriocins activity against *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 178(6):1239-1251, 2016.

CHMIELEWSKI, R. A. N., FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p. 22–32, 2003

COTTER PD, HILL C, ROSS RP Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology** 10:777–788, 2005.

COTTER, P. D.; ROSS, R.P; HILL, C. Bacteriocins — A viable alternative to antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, n.11, p.95-105, 2013.



Drider D, Rebuffat S (2011) **Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications**. Springer, New York

FINN, S.; CONDELL, O.; MCCLURE, P.; AMÉZQUITA, A.; FANNING, S. Mechanisms of survival, responses, and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. **Front Microbiol**, v.4, p.331, 2013.

FOULQUIE-MORENO MR, CALLEWAERT R, DEVREESE B, VAN BEEUMEN J, DE VUYST L. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. **Appl Environ Microbiol** 94:214–229, 2003.

FRANZ CMAP, VAN BELKUM MJ, HOLZAPFEL WH, ABRIOUEL H, GALVEZ A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiol** 31:293–310, 2007.

FRANZ CMAP, HUCH M, ABRIOUEL H, HOLZAPFEL W, GALVEZ A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **Int J Food Microbiol** 151:125–140, 2011.

FURTADO, D.N. **Isolamento de bactérias lácteas produtora de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra**. Dissertação (mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. 2010.

GIAZZI, A. **Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo Minas artesanais e leite cru**. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

GUT, I. M.; BLANKE, S. R.; VAN DER DONK, W. A. Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin. **ACS Chem Biol**, n. 6, p. 744–752, 2011.

HAMMAMI, R., ZOUHIR, A., LE LAY, C., BEN HAMIDA, J., FLISS, I. BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. **BMC Microbiology**, v.10, p. 22, 2010.

JEEVATATNAM, K. JAMUNA, M., BAWA, A.S. Biological preservation of foods-bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology**. v 4, p 446-454, 2005.

JENNES, W., DICKS, L. M. T., VERWOERD, D. J., Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 349–357, 2000.

KAYSER FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **Int J Food Microbiol** 88:255–262, 2003.

KHAN H, FLINT S, YU PL. Enterocins in food preservation. **Int J Food Microbiol** 141:1–10, 2010.

LEVKUT M, PISTL J, LAUKOVA A, REVAJOVA V, HERICH R, SEVCIKOVA Z, STROMPFOVA V, SZABOOVA R, KOKINCA T. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* EF 55 against *Salmonella enteritidis* in chicks. **Acta Vet Hung** 57:13–24, 2009

LIN, C.M.; TAKEUCHI, K.; ZHANG, L.; DOHM, C. B.; MEYER, J. D.; HALL, P. A. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. *J Food Protect*, v. 69, p.71–79, 2006.

MUÑOZ, A.; ANANOU, S.; GÁVEZ, A.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; RODRÍGUEZ, A.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocinAS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. **International Dairy Journal**, n.17, p.760–769, 2007.

OGAKI, M. B.; ROCHA, K.R.; TERRA, M.R.; FURLANETO, M.C.; FURLANETO-MAIA, L. Screening of the enterocina-encoding genes and antimicrobial activity in *Enterococcus* species. **J Microbiol Biotechnol**, v.26, 1026-1034, 2016.

PEREZ, R. H.; ZONDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microb Cell Fact** 13:S3, 2014.

RILEY MA, WERTZ JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annu Rev Microbiol** 56:117–137, 2002.

TOBA, T. et al. Assay for detecting bacteriocin in microdilution wells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, p. 102-104, 1991.

SCHRÖDTER K, et al. Phosphoric acid and phosphates. **Ullmann's Enc Ind Chem**, v. 26, p. 679–721, 2008.

SIROLI L, PATRIGNANI F, SERRAZANETTI DI, TABANELLI G, MONTANARIVC, GARDINI F, LANCIOTTI R. Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. **Food Microbiol** 47:74–84, 2015.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. v. 5, p.687-690, 2007.

VAN HOUTT, R., MICHIELS C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p.1117–1131, 2010.

YARON, S.; ROMLING, U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. **Microbial Biotechnology**, v. 7, p.496-516, 2014.

YETHON, J. A., WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide as a Target for the Development of Novel Therapeutics in Gram-Negative Bacteria. **Current Drug Targets - Infectious Disorders** , v.1, 2001.

YILDIRIM, Z.; ILK, Y.; YILDIRIM, M.; TOKATLI, K.; ÖNCÜL, N. Inhibitory effect of enterocin KP in combination with sublethal factors on *Escherichia coli* O157:H7 or *Salmonella* Typhimurium in BHI broth and UHT milk. **Turk Journal Biol**, v. 38, p. 412-419, 2014.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3996–4003, 2004.

## 6 CONCLUSÃO

O CFS bruto dos isolados MF2, MF5 e L3 apresentaram atividade inibitória contra células planctônicas, variando a intensidade entre as patógenas e os tempos testados. Devido ao seu espectro de ação, que se estende às Gram negativas, as enterocinas estudadas oferecem potencial ao uso como conservantes em alimentos, em substituição à nisina.

Não foi observado ação inibitória sinérgica entre os três CFS contendo enterocinas, apenas interação sinérgica binária entre MF2 e MF5.

A ação contra o biofilme formado foi observada em 18h; em 6h não houve redução da biomassa total

Os resultados obtidos neste trabalho servem de base para futuros experimentos, como a concentração e purificação das enterocinas estudadas, o uso em sinergismo com sanitizantes de uso industrial.