

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Yasmin Neves Vieira Sabino

**Identificação e caracterização de bactérias bacteriocinogênicas isoladas de líquido
ruminal**

Juiz de Fora
2016

YASMIN NEVES VIEIRA SABINO

Identificação e caracterização de bactérias bacteriocinogênicas isoladas de líquido ruminal

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do título de Farmacêutica.

Orientador: Dr. Humberto Moreira Hungaro

Co-orientadora: Dr^a Aline Dias Paiva

Juiz de Fora

2016

Yasmin Neves Vieira Sabino

Identificação e caracterização de bactérias bacteriocinogênicas isoladas de líquido ruminal

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do título de Farmacêutica.

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

Dr. Humberto Moreira Hungaro – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. João Batista Ribeiro
Embrapa Gado de Leite

Dr^a Analice Cláudia de Azevedo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sabino, Yasmin Neves Vieira.

Identificação e caracterização de bactérias bacteriocinogênicas isoladas de líquido ruminal / Yasmin Neves Vieira Sabino. -- 2016.

54 f. : il.

Orientador: Humberto Moreira Hungaro

Coorientadora: Aline Dias Paiva

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2016.

1. Bacteriocinas. 2. Lantibióticos. 3. Rúmen. 4. Streptococcus. I. Hungaro, Humberto Moreira, orient. II. Paiva, Aline Dias, coorient. III. Título.

À minha mãe, Jucilane, por ter dedicado sua vida à minha.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por tudo!

À minha mãe, ao Marcos, e aos meus avós, Maria Lúcia e José Carlos, por terem me dado todo o suporte necessário para que eu pudesse me formar longe de casa. Certamente, sem vocês eu nada seria!

Ao meu irmão, Arthur, por ser dono do amor mais puro que eu carrego.

À Laiani, por ser a maior companheira que tive em todo esse tempo. Saber que quando eu chegasse em casa, eu teria você, sempre me deu uma força tremenda. Obrigada por ter sido uma verdadeira irmã pra mim!

Aos meus amigos e familiares por estarem sempre dispostos a ajudar, pela presença nos piores e melhores momentos da minha vida.

Ao Cleverson, pelo amor e companheirismo.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pelas ótimas oportunidades oferecidas e por ter me concedido essa formação tão especial.

À FAPEMIG, pela disponibilização do recurso necessário à execução do projeto e à Embrapa Gado de Leite, por fornecer as ferramentas adequadas à sua realização.

Aos pesquisadores, analistas e estagiários do Laboratório de Microbiologia do Rúmen por terem sido uma segunda família para mim. Jailton, Marlice, Junior, Laura, Ranaíla e Marlon, vocês formam uma equipe excepcional e eu tenho um carinho enorme por cada um.

Ao João Batista, por ser esse excelente profissional. Sua paciência, humildade e sabedoria me encantam. Muito obrigada por todos os ensinamentos e amparo dado a mim sempre que precisei. Você se tornou e a partir de agora, sempre vai ser, meu pai científico.

À Gabryella, por me auxiliar na execução dos experimentos no Laboratório de Microbiologia do Leite. Você tem todo o meu respeito e admiração. Muito obrigada por tudo!

Aos colegas de curso, especialmente à Camila e à Isadora, por dividirem comigo os momentos de maiores dificuldades e também de alegrias, durante a faculdade.

Aos professores, farmacêuticos, técnicos e residentes da FU e do HU, que me engrandeceram com tamanho conhecimento transmitido.

E, por fim, à Aline, que esteve ao meu lado em todos os momentos, tornando possível a concretização desse sonho. Muito obrigada por todos os ensinamentos, dúvidas esclarecidas, confiança, companheirismo e amizade. A minha admiração e carinho por você são indescritíveis. Espero que essa parceria não termine por aqui.

“Viva como se fosse morrer amanhã, mas aprenda como se fosse viver pra sempre.”

Mahatma Ghandi

RESUMO

As bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos de síntese ribossomal produzidos por bactérias, têm sido propostas como uma alternativa ao uso de antibióticos convencionais e como conservantes em alimentos. Em estudos anteriores foram analisadas trinta bactérias Gram-positivas isoladas de líquido ruminal e pertencentes ao Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Embrapa Gado de Leite. A produção de substâncias antagonistas por estas bactérias foi avaliada utilizando *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus* sp., *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* como microrganismos indicadores. Após este *screening*, os seis isolados caracterizados como possíveis produtores de bacteriocinas foram selecionados para serem utilizados no presente estudo. Os objetivos deste trabalho foram determinar o espectro de ação das bacteriocinas produzidas, identificar genotipicamente as bactérias ruminais bacteriocinogênicas, determinar a ocorrência de genes envolvidos na modificação pós-traducional de bacteriocinas da classe I (lantibióticos) e realizar a discriminação sub-específica dos isolados. O espectro de ação foi determinado segundo Booth *et al.* (1977), utilizando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A extração do DNA cromossômico foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio. O rDNA 16S obtido amplificado e purificado para posterior sequenciamento. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático MegaBACE 1000 e as sequências consenso obtidas foram comparadas às disponíveis em banco de dados. Para discriminação dos isolados pertencentes às mesmas espécies foi realizada eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). A presença de genes envolvidos na modificação pós-traducional de bacteriocinas da classe I foi avaliada utilizando *primers* degenerados para os genes *lanB*, *lanC* e *lanM*. Resultados positivos foram determinados pela presença de produtos de amplificação com 400-500 pb para *lanB* e 200-300 pb para *lanC* e *lanM*. Os isolados ISO7, C6I8, C6I9, C7I2, ISO37 e AS1.5, selecionados para este trabalho, inibiram o crescimento de linhagens Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando amplo espectro de ação. Três destes isolados foram identificados como *Streptococcus equinus* e os demais como *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus lutetiensis* e *Streptococcus gallolyticus*. Os microrganismos identificados como *Streptococcus equinus* apresentaram diferentes perfis de separação de bandas no PFGE, sendo, portanto, isolados distintos. Em relação à presença de genes de modificação pós-traducional de bacteriocinas da classe I, *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5) apresentou

resultado positivo para *lanB*, *Streptococcus equinus* (ISO7 e C6I8), *Streptococcus lutetiensis* (ISO37) e *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5) para *lanC* e *Streptococcus equinus* (ISO7 e C6I8) para *lanM*. Estudos adicionais são necessários visando o sequenciamento dos fragmentos obtidos para confirmação da presença dos genes analisados, dada a inespecificidade das reações de PCR para *lanB*, *lanC* e *lanM*. Adicionalmente a presença de genes envolvidos na biossíntese das demais classes de bacteriocinas deverá ser analisada nas bactérias bacteriocinogênicas.

Palavras-chave: bacteriocinas, lantibióticos, rúmen, *Streptococcus*.

ABSTRACT

Bacteriocins, ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria, have been proposed as an alternative to conventional antibiotics and food preservatives. In previous studies, thirty Gram-positive bacteria isolated from ruminal liquid and belonging to the Laboratory of Rumen Microbiology, Embrapa Dairy Cattle, were analyzed. The production of antagonistic substances produced by this bacteria were evaluated using *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus sp.*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis* as indicator microorganisms. After this screening, six isolates characterized as possible producers of bacteriocins were selected to be used in the present study. The objectives of this study were to determine the activity spectrum of the bacteriocins, genotypically identify bacteriocinogenic ruminal bacteria, the occurrence of genes involved in post-translational modification of class I bacteriocins (lantibiotics) and to perform the sub-specific discrimination of several isolates. The spectrum of action was determined by Booth et al. (1977), using Gram-positive and Gram-negative bacteria. The extraction of chromosomal DNA was performed using phenol-chloroform method. The obtained 16S rDNA was amplified and purified for further sequencing. The samples were sequenced in an automatic sequencer MegaBACE 1000 and the obtained consensus sequences were compared with a database library. For discrimination of isolates belonging to the same species, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed. The presence of genes involved in the post-translational modification of class I bacteriocins was evaluated using degenerate primers for the genes *lanB*, *lanC* and *lanM*. Positive results were determined by the presence of amplification products with 400-500 bp to *lanB*, 200-300 bp to *lanC* and also to *lanM*. The isolates previously named ISO7, C6I8, C6I9, C7I2, ISO37 and AS1.5, selected for this work, inhibited the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria, showing a broad spectrum of action. Three of these isolates were identified as *Streptococcus equinus* and the others as *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus lutetiensis* and *Streptococcus gallolyticus*. The microorganisms identified as *Streptococcus equinus* showed different profiles in PFGE, being identified as different isolates. Regarding the presence of post-translational modification genes of class I bacteriocins, *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5) showed positive results for *lanB*, *Streptococcus equinus* (ISO7 and C6I8), *Streptococcus lutetiensis* (ISO37) and *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5) for *lanC* and *Streptococcus equinus* (ISO7 and

C6I8) for *lanM*. Given the lack of specificity of PCR reactions to *lanB*, *lanC* and *lanM*, further studies are needed in order to sequence the fragments obtained and confirm the presence of the genes analyzed. Additionally, the presence of genes involved in the biosynthesis of other classes of bacteriocins should be analyzed in bacteriocinogenic bacteria.

Keywords: bacteriocins, lantibiotics, rumen, *Streptococcus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR obtido após amplificação do rDNA 16S, utilizando os *primers* universais 27F e 536R. M- marcador *Lambda Ladder* 100pb; B-branco; 1- ISO7; 2- C6I8; 3- C6I9; 4- C7I2; 5- ISO37; 6- AS1.5..... 36
- Figura 2.** Eletroforese em gel de campo pulsado dos isolados identificados como *Streptococcus equinus* (ISO7, C6I8 e C6I9), após clivagem com *ApaI* (1,2,3) e *SmaI* (4,5,6). M- *Lambda Hind III*; M`- *Lambda Ladder Bio-Rad*; 1 e 4- ISO7; 2 e 5- C6I8; 3 e 6- C6I9..... 39
- Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) das reações de amplificação para o gene *lanB*. M- *Lambda Ladder* 100pb; 1- *Streptococcus equinus* (ISO7); 2- *Streptococcus equinus* (C6I8); 3- *Streptococcus equinus* (C6I9); 4- *Streptococcus macedonicus* (C7I2); 5- *Streptococcus lutetiensis* (ISO37); 6- *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5)..... 40
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) das reações de amplificação para o gene *lanC*. M- *Lambda Ladder* 100pb; C- *Streptococcus salivarius* 20P3 (controle positivo); 1- *Streptococcus equinus* (ISO7); 2- *Streptococcus equinus* (C6I8); 3- *Streptococcus equinus* (C6I9); 4- *Streptococcus macedonicus* (C7I2); 5- *Streptococcus lutetiensis* (ISO37); 6- *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5)..... 41
- Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) das reações de amplificação para o gene *lanM*. M- *Lambda Ladder* 100pb; C- *Lactococcus lactis* 3147 (controle positivo); 1- *Streptococcus equinus* (ISO7); 2- *Streptococcus equinus* (C6I8); 3- *Streptococcus equinus* (C6I9); 4- *Streptococcus macedonicus* (C7I2); 5- *Streptococcus lutetiensis* (ISO37); 6- *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5)..... 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes alvo e <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR para detecção de genes associados à biossíntese de lantibióticos, e tamanho esperado do amplicon de interesse.....	32
Tabela 2. Atividade antagonista observada nos testes de sobrecamada (FOCHAT, 2014).....	33
Tabela 3. Espectro de ação das bacteriocinas produzidas pelos microrganismos avaliados.....	34
Tabela 4. Identificação dos isolados bacteriocinogênicos pelo sequenciamento do rDNA 16S.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Bacteriocinas – aspectos gerais	19
2.2 Bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram-positivas	20
2.3 Bacteriocinas produzidas por bactérias isoladas do rúmen	22
2.4 Aplicações e perspectivas	23
2.5 Genes envolvidos na biossíntese de bacteriocinas	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Microrganismos e condições de cultivo	27
4.2 Determinação do espectro de ação das bacteriocinas produzidas pelos isolados ruminais	27
4.3 Extração de DNA dos isolados bacteriocinogênicos	28
4.4 Amplificação do rDNA 16S	29
4.5 Purificação do rDNA 16S	29
4.6 Sequenciamento do rDNA 16S	30
4.7 Análise do polimorfismo genético por <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	30
4.8 Detecção de genes envolvidos na modificação pós-traducional de bacteriocinas pertencente à Classe I	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Atividade antimicrobiana dos isolados selecionados	33
5.2 Espectro de ação das bacteriocinas	34
5.3 Extração de DNA dos isolados bacteriocinogênicos e amplificação do rDNA 16S	35
5.4 Purificação e sequenciamento dos fragmentos de rDNA 16S	36
5.5 Polimorfismo genético por PFGE	38
5.6 Genes envolvidos na modificação pós-traducional de bacteriocinas pertencentes à Classe I	39

6 CONCLUSÕES.....	44
REFERENCIAS.....	45
APÊNDICE.....	54

1 INTRODUÇÃO

Com o uso abusivo da quimioterapia antimicrobiana, são frequentes os relatos de patógenos resistentes a antibióticos. Dessa forma, aumenta-se a demanda por alternativas ao controle de microrganismos, o que, associado à crescente busca por alimentos com menos aditivos químicos, coloca em evidência uma classe de peptídeos antimicrobianos denominada bacteriocina (CAVALCANTE *et al.*, 2013).

Bacteriocinas são peptídeos produzidos ribossomicamente por bactérias e que apresentam ação bactericida ou bacteriostática contra células alvo. As bactérias produtoras, por sua vez, possuem mecanismos específicos de imunidade e são resistentes à ação das próprias bacteriocinas (RASI, 2010).

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas são classificadas em 4 grupos principais: a classe I é composta por bacteriocinas do tipo lantibióticos, peptídeos com peso molecular inferior a 5kDa, que apresentam aminoácidos modificados pós-tradução por complexos multi-enzimáticos (aparato de modificação *lanB/lanC*, responsável pelas reações de desidratação e formação de lantionina, respectivamente, ou *lanM*, uma única proteína que realiza as reações de modificação); a classe II inclui peptídeos com peso molecular inferior a 10kDa e que não sofrem extensas modificações pós-traducionais; a classe III engloba as bacteriolisinas, peptídeos maiores (peso molecular superior a 30kDa) e termolábeis; já a classe IV engloba as bacteriocinas complexas, que necessitam de lipídeos ou carboidratos para sua atividade (COTTER *et al.*, 2005).

As bacteriocinas possuem uma ampla gama de utilizações, destacando-se o potencial uso como conservantes de alimentos, como terapia coadjuvante contra patógenos multi-resistentes a antibióticos e na manipulação de comunidades microbianas complexas, como aquela presente no ambiente ruminal (CAVALCANTE *et al.*, 2013).

A produção de bacteriocinas ocorre em grande frequência em bactérias isoladas do rúmen possivelmente devida à alta competição microbiana que ocorre nesse ambiente, haja vista a presença de uma complexa microbiota residente. Promotores de crescimento, incluindo antibióticos, têm sido utilizados há vários anos visando à alteração de produtos da fermentação ruminal e o aumento da eficiência da conversão alimentar (RUSSEL e STROBEL, 1989). Entretanto, o uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais é discutido em função da disseminação de genes

de resistência e da presença de resíduos de antibióticos nos produtos de origem animal. Nesse contexto, as bacteriocinas têm sido avaliadas como uma classe de moléculas promissoras para serem utilizadas como substitutos ou co-adjuvantes ao uso de antibióticos, sendo úteis no controle de infecções, na redução ou eliminação de patógenos entéricos, assim como na redução das perdas durante a fermentação ruminal (redução da produção de metano e amônia) e melhora na conversão alimentar por meio da manipulação da fermentação ruminal (JOERGER, 2003).

A maioria das pesquisas que visam a caracterização de peptídeos antimicrobianos produzidos por isolados ruminais são baseadas em ensaios de antagonismo direto *in vitro*; poucos trabalhos têm enfatizado as análises moleculares desses isolados e a avaliação da presença de genes de biossíntese de bacteriocinas (OLIVEIRA, 2014). Assim, diante das vantagens do potencial uso desses peptídeos na manipulação do ecossistema e fermentação ruminal, além de outros possíveis usos no controle de patógenos e na conservação de alimentos, justifica-se a prospecção de bactérias ruminais produtoras de bacteriocinas e a detecção e caracterização de genes envolvidos na biossíntese dessas moléculas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bacteriocinas – aspectos gerais

Os microrganismos são capazes de produzir uma série de substâncias que auxiliam nos seus sistemas de defesa, como antibióticos, ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio, agentes líticos, exotoxinas e bacteriocinas (JACK *et al.*, 1995; RILEY e WERTZ, 2002).

De acordo com Jack *et al.* (1995), o estudo do antagonismo entre bactérias teve início após Pasteur e Joubert relatarem que o isolamento de uma linhagem bacteriana (provavelmente *Escherichia coli*) teria inibido o crescimento de *Bacillus anthracis*, assim como Babes observou que uma espécie de *Staphylococcus* estaria inibindo o crescimento de *Corynebacterium diphtheriae*. Contudo, o passo inicial do estudo de bacteriocinas foi dado por Gratia (1925), ao descobrir que um isolado de *Escherichia coli* produzia um composto termoestável capaz de inibir, em baixas concentrações, o crescimento de um outro isolado da mesma espécie (SIRTORI, 2006).

As bacteriocinas diferem dos antibióticos em vários aspectos, dentre eles, destacam-se a forma como são sintetizadas, o mecanismo de resistência e o espectro de atividade. As bacteriocinas são sintetizadas ribossomicamente e normalmente tem espectro de ação restrito, agindo em espécies filogeneticamente relacionadas. A resistência das células se deve a alterações na membrana celular. Já os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de microrganismos, geralmente possuem espectro de ação amplo e podem apresentar diferentes mecanismos de resistência; dentre eles a ação de enzimas que degradam antibióticos ou genes que promovem alterações em diferentes sítios dependendo do mecanismo de ação de cada fármaco (MORAES, 2011).

A produção de bacteriocinas é influenciada por alguns fatores, como a fase de crescimento e a atividade fisiológica da bactéria produtora. Logo, a composição do meio de cultura, a temperatura e o pH são parâmetros importantes a serem correlacionados com a produção do peptídeo, embora nenhuma generalização possa ser feita a respeito das condições ótimas para a sua produção (FERREIRA, 2005; OLIVEIRA, 2012).

A atividade das bacteriocinas pode variar conforme a espécie bacteriana sensível e o ambiente em que se encontram. De maneira geral, as bacteriocinas podem apresentar um efeito bactericida, com ou sem lise celular, ou um efeito bacteriostático (OLIVEIRA, 2012). Normalmente as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à

ação de bacteriocinas, principalmente em função da presença da membrana externa que garante uma menor permeabilidade a moléculas como essas (FERREIRA, 2005).

2.2 Bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram-positivas

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas podem ser classificadas em quatro grupos principais de acordo com a estrutura primária, o peso molecular, a estabilidade térmica e a similaridade funcional:

1) Classe I: também chamada de lantibióticos, são peptídeos pequenos, com 19 a 38 resíduos de aminoácidos, termoestáveis, e que possuem resíduos de lantionina ou β -metilantionina. A formação dos anéis de lantionina, importantes para a estabilidade térmica do peptídeo, ocorre pela desidratação seguida por ciclização de aminoácidos. Resíduos de serina e treonina são desidratados formando deidroalanina (Dha) e deidrobutilina (Dhb), respectivamente. Posteriormente, resíduos de cisteína são adicionados às duplas ligações dos aminoácidos Dha e Dhb, resultando em pontes covalentes intramoleculares, os denominados anéis de lantionina. Em geral, os lantibióticos catiônicos anfifílicos alongados (subgrupo Ia), como por exemplo a nisina, agem por meio da formação de poros que conduzem à dissipação do potencial de membrana e ao efluxo de pequenos metabólitos. Em contraste, lantibióticos globulares como a mersacidina (subgrupo Ib), atuam por meio da inibição enzimática (COTTER *et al.*, 2005). Os genes relacionados à biossíntese de lantibióticos pertencem ao *locus lan* e são classificados como: pré-peptídeo (*lanA*), modificação enzimática (*lanB*, *lanC* /*lanM*, *lanD*, e *lanJ*), protease de processamento (*lanP* e *lanT*), transportador ABC (*lanT*), proteína de imunidade (*lanFEG*, *lanI* e *lanH*) e proteínas regulatórias (*lanR*, *lanK*, *lanQ* e *lanX*) (NAGAO *et al.*, 2006).

De acordo com a distribuição das enzimas de modificação, Willey e Van Der Donk (2007) classificam os lantibióticos em três classes. A classe I inclui lantibióticos com estrutura linear em que o pré-peptídeo é modificado pelas enzimas *lanB*, *lanC*, *lanP* e *lanT*, como a nisina A de *Lactococcus lactis* e epidermina de *Staphylococcus epidermidis* (SOUSA, 2016). Os lantibióticos da classe II, como lacticina 3147 de *L. lactis* 3147, são modificados pós-traducionalmente apenas por *lanM* e *lanT* (OLIVEIRA, 2014). A classe III foi estabelecida para os peptídeos que contêm o aminoácido lantionina, porém que não apresentam atividade antimicrobiana, mas sim

outras funções para a célula produtora, como é o caso da enzima SapB produzida por *Bacillus pumilus* CBS (WILLEY E VAN DER DONK, 2007).

O grande interesse científico no estudo de bacteriocinas, principalmente os lantibióticos, se deve ao fato de que esses peptídeos apresentam atividade antimicrobiana em concentrações nanomolares (COTTER *et al.*, 2005). Segundo o BACTIBASE (banco de dados dedicado a bacteriocinas), já foram descritos 64 diferentes lantibióticos sintetizados em sua maioria por bactérias Gram-positivas, sendo que destes, 14 são produzidas por bactérias do gênero *Streptococcus*.

2) Classe II: compreende peptídeos pequenos, com menos de 10 kDa, catiônicos, hidrofóbicos, estáveis ao calor e não sujeitos a grandes modificações pós-traducionais. A maioria das bacteriocinas dessa classe induz a permeabilização da membrana, ocasionando a perda de moléculas intracelulares. Pode ser dividida em cinco subgrupos com base em suas estruturas primárias: classe IIa, similares à pediocina e que possuem um motivo consenso YGNGVXC N-terminal e duas cisteínas formando uma ponte dissulfeto, possuem proeminente atividade anti-*Listeria* sp.; classe IIb, bacteriocinas compostas por dois peptídeos que possuem atividades complementares, como a lantocina G e a lacticina; classe IIc, peptídeos que apresentam regiões N e C-terminais covalentemente ligadas, resultando em estruturas cíclicas, como a acidocina B, que são ativados por grupos tióis que necessitam de resíduos de cisteína reduzidos para apresentarem ação; classe IId, incluem as demais bacteriocinas, bacteriocinas *sec*-dependentes com peptídeos únicos e lineares (COTTER *et al.*, 2005; GRAY *et al.*, 2006; NES *et al.*, 2007; MARTINS, 2012; TEIXEIRA, 2007).

3) Classe III: conhecidas como bacteriolisinas, são proteínas termosensíveis com peso molecular acima de 30kDa. Agem catalisando a hidrólise da parede celular bacteriana, o que causa a lise de espécies sensíveis. Bacteriocinas como lisostafina, enterolisina A, helveticina J e lactacina B representam essa classe (ÓSCARIZ E PISABARRO, 2001; TEIXEIRA, 2007).

4) Classe IV: Envolvem proteínas complexas, associadas a carboidratos e/ou lipídeos. A classe é representada por leuconocina S e lactocina 27 (VERMEIREN *et al.*, 2006; TEIXEIRA, 2007).

2.3 Bacteriocinas produzidas por bactérias isoladas do rúmen

Geralmente, 1 a 10% dos isolados ambientais apresentam capacidade de produzir bacteriocinas (TEATHER *et al.*, 1999) e esta estimativa é aumentada de 2 a 5 vezes para microrganismos isolados do rúmen (MANTOVANI *et al.*, 2001). Os principais gêneros de bactérias do rúmen produtores de bacteriocinas são *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (SOUZA, 2016). Dentre as bacteriocinas sintetizadas por estes gêneros destacam-se a albusina B de *Ruminococcus albus* (CHEN *et al.*, 2004), butirivibriocina AR10 e butirivibriocina OR79A de *Butyrivibrio fibrisolvens* (KALMOKOFF *et al.*, 1999), enterocina F4-9 de *Enterococcus faecalis* F4-9 (MAKY *et al.*, 2015) e enterocina AS- 48 de *E. faecalis* UGRA10 (BURGOS *et al.*, 2014).

O rúmen é um ambiente habitado por vários tipos de microrganismos, porém são as bactérias que desempenham o papel mais importante em relação à fermentação. Existe uma relação simbiótica entre o rúmen e as bactérias, visto que estas podem degradar a celulose, a hemicelulose e matérias fibrosas, enquanto o ruminante fornece um *habitat* propício para o crescimento bacteriano (HUNGATE, 1966). No entanto, a fermentação ruminal é relativamente ineficiente; há perda de energia e nitrogênio devido à produção de metano e amônia, respectivamente. O metano é um gás relacionado ao fenômeno de aquecimento global e por isso a sua eliminação pelo rebanho pode acarretar em alto impacto ambiental. Além disso, o excesso de amônia excretado na urina sob a forma de uréia pode contaminar os lençóis freáticos. Dessa forma, substâncias exógenas têm sido utilizadas para modificar a fermentação ruminal e aumentar a eficiência da digestão de alimentos (RUSSEL e STROBEL, 1989).

Experimentos indicaram que a bacteriocina nisina poderia diminuir a produção de metano e amônia *in vitro*. A inibição do crescimento de bactérias produtoras de hidrogênio e desaminadoras de aminoácidos diminui a produção de hidrogênio (um precursor de metano) e o acúmulo de amônia, aumentando assim a retenção de energia e proteínas pelo animal ruminante (RUSSEL e STROBEL, 1989). Dessa forma, bacteriocinas produzidas por isolados ruminais poderiam ser utilizadas como aditivos *in vivo*, com o objetivo de induzir mudanças nos parâmetros de fermentação ruminal de modo semelhante aos ionóforos (MANTOVANI *et al.*, 2001).

2.4 Aplicações e perspectivas

Diferentes aplicações têm sido sugeridas para as bactérias produtoras de bacteriocinas ou mesmo para as bacteriocinas purificadas. Na área de alimentos, um grande destaque tem sido dado à nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, e que tem sido usada há décadas por inibir a proliferação de uma série de bactérias patogênicas em alimentos. Além disso, essa bacteriocina tem sido testada também em formulações dermatológicas, já que inibe o crescimento de bactérias que causam infecções de pele. Outra bacteriocina utilizada na conservação de alimentos é a pediocina, produzida por *Pediococcus acidilactici* (SANTOS, 2005).

Na odontologia, bacteriocinas têm sido testadas contra a bactéria *Streptococcus mutans*, reconhecidamente envolvida na etiologia da cárie (BALAKRISHNAN *et al.*, 2001). Na medicina veterinária, uma bacteriocina purificada de *Lactobacillus plantarium* demonstrou atividade contra *Escherichia coli* patogênica, prevenindo a colibacilose em frangos (OGUNBANWO *et al.*, 2004). Em cães, bacteriocinas isoladas de *Enterococcus* mostraram-se capazes de inibir bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que normalmente causam infecções intestinais nestes animais (STROMPFÁVA *et al.*, 2004). Na medicina humana, a epidermina e a galidermina, isoladas de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus gallinarum*, respectivamente, têm sido utilizadas no tratamento de infecções cutâneas e a ancovenina, isolada de *Streptomyces* sp., tem grande potencial para ser utilizada no tratamento de doenças relacionadas com a alteração da pressão arterial, por agir como um inibidor de enzimas que convertem a angiotensina (KIDO *et al.*, 1983). Na agricultura, também há um grande número de bacteriocinas em experimentação, como a agrocina 84, sintetizada por *Agrobacterium vitis*, que é capaz de inibir linhagens patogênicas de *Agrobacterium*, e a entemocina 9, produzida por *Bacillus thuringiensis*, utilizada no controle de *Fusarium gramineis* (SANTOS, 2005).

2.5 Genes envolvidos na biossíntese de bacteriocinas

Os genes que codificam as bacteriocinas de bactérias Gram-positivas das mais diferentes classes podem estar presentes no DNA plasmidial, cromossômico, ou, ocasionalmente, em elementos móveis do tipo transposon ou DNA derivado de bacteriófago. O conjunto gênico relacionado a esses peptídeos incluem genes

estruturais, de imunidade, regulatórios, que promovem modificações pós-traducionais e ainda que codificam o aparato de exportação desses peptídeos (SANTOS, 2005).

As bacteriocinas são comumente sintetizadas como pré-peptídeos inativos, que possuem uma sequência N-terminal. O pré-peptídeo é transportado à superfície celular e transformado na forma ativa através do transportador, que contém uma porção proteolítica N-terminal responsável pela clivagem do peptídeo, e uma porção C-terminal, que quebra o ATP e fornece a energia necessária ao transporte do peptídeo para o meio externo (NASCIMENTO, 2008). Na região C-terminal pode ocorrer modificações pós-traducionais, tais como desidratação de resíduos de serina e/ou treonina específicos, resultando na formação do componente 2,3-dideidroaminoácidos, e/ou adição de grupos tióis de resíduos de cisteína às ligações duplas de alguns aminoácidos, gerando resíduos de lantionina e β -metil lantionina (AUCHER *et al.*, 2005).

Três componentes são responsáveis pela regulação da produção de bacteriocinas: o peptídeo indutor (feromônio ou fator de ativação), a histidina quinase transmembrana (receptor do feromônio) e o regulador de resposta. O peptídeo indutor, conforme citado acima, é sintetizado como pré-peptídeo, clivado e secretado externamente pelo transportador. Quando este composto atinge certa concentração, a histidina quinase transmembrana é ativada e isso conduz a uma autofosforilação do resíduo de histidina, transferindo um grupamento fosfato para a proteína reguladora de resposta. O regulador fosforilado ativa a transcrição da bacteriocina e os elementos que compõem o sistema regulador, iniciando um *feedback* positivo (NASCIMENTO, 2008).

As bactérias produtoras de bacteriocinas apresentam um mecanismo de imunidade que garante resistência frente aos próprios peptídeos produzidos. A proteção pode ser conferida por uma proteína específica e/ou pelo sistema transportador: ambos atuam por meio do sequestro da proteína estrutural ou por competição antagônica pelo receptor de bacteriocina (NASCIMENTO, 2008).

Dessa forma, quatro genes estão envolvidos na produção das bacteriocinas, desempenhando papéis essenciais na sua síntese e atividade celular: o gene estrutural, que codifica para a produção do pré-peptídeo (responsável pela emissão de um sinal ao sistema transportador e que previne que o peptídeo se torne ativo dentro da célula); o gene envolvido com a imunidade, que confere à bactéria produtora imunidade contra a própria bacteriocina; e os genes responsáveis pela externalização das proteínas, que

codificam as proteínas acessórias e o transportador ABC (FERREIRA, 2005; OLIVEIRA, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar, por meio de técnicas moleculares, e caracterizar bactérias Gram-positivas produtoras de bacteriocinas previamente isoladas de líquido ruminal e pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Rúmen - Embrapa Gado de Leite.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o espectro de ação das bacteriocinas analisadas;
- Identificar genotipicamente as bactérias ruminais bacteriocinogênicas;
- Determinar a ocorrência de genes envolvidos na modificação pós-traducional de bacteriocinas pertencentes à classe I (lantibióticos);
- Realizar a discriminação sub-específica dos isolados bacteriocinogênicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e condições de cultivo

O Laboratório de Microbiologia do Rúmen, da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora - MG, possui uma coleção de culturas microbianas com aproximadamente 250 bactérias isoladas do rúmen (de bovinos, ovinos e outros animais). Todos os isolados encontram-se armazenados em freezer -80 °C, em meio de congelamento específico acrescido de glicerol (concentração final de 10%).

A partir desta coleção de culturas, em um trabalho realizado anteriormente (FOCHAT, 2014), foram selecionados, de forma aleatória, 30 isolados de bactérias Gram-positivas, anaeróbias, para avaliação da capacidade de produção de bacteriocinas. Tais isolados foram submetidos a testes de sobrecamada (BOOTH *et al.*, 1977), utilizando como indicadores da atividade antagonista os microrganismos *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus* sp., *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*, provenientes também do banco de culturas do Laboratório de Microbiologia do Rúmen. Destes 30 isolados, aqueles que apresentaram inibição do crescimento das bactérias indicadoras testadas (halos de inibição com diâmetro superior a 6 mm), foram submetidos a testes de exclusão de fatores interferentes (presença de bacteriófagos e produção de ácidos).

Ao final deste *screening*, seis isolados, denominados ISO7, ISO37, C6I8, C6I9, AS1.5 e C7I2, foram identificados como bacteriocinogênicos e, então, selecionados para serem utilizados no presente projeto.

Todos os isolados foram cultivados em meio *Brain Heart Infusion* (BHI), anaeróbio, preparado sob atmosfera de CO₂, livre de oxigênio, distribuídos em tubos vedados com rolhas de borracha e selados com lacre de alumínio. Quando necessário, os meios sólidos foram distribuídos em placas, utilizando a câmara de anaerobiose (atmosfera: 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂).

4.2 Determinação do espectro de ação das bacteriocinas produzidas pelos isolados ruminais

O espectro de ação foi realizado utilizando-se a metodologia da sobrecamada (BOOTH *et al.*, 1977). Os microrganismos foram cultivados em meio BHI sólido e apenas uma colônia foi transferida para uma nova placa de BHI. Após crescimento em

câmara de anaerobiose, a 37 °C por 24 horas, 8 mL de meio BHI semi-sólido (0,8% de ágar), previamente fundido e inoculado com o microrganismo indicador, foi vertido sobre as placas contendo as colônias pontuais. As placas foram novamente incubadas, desta vez em aerobiose (atmosfera adequada para os microrganismos indicadores), e a leitura foi realizada após 24 horas de crescimento a 37°C.

O espectro de ação foi realizado utilizando os seguintes indicadores: *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas fluorescens* NCTC 10038, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus equinus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 00303, *Streptococcus salivarius* ATCC 20P3 e *Lactococcus lactis* ATCC 3147. Resultados positivos foram determinados pela presença de halos de inibição de crescimento do microrganismo indicador ao redor das colônias pontuais dos isolados bacteriocinogênicos.

4.3 Extração de DNA dos isolados bacteriocinogênicos

Para extração do DNA total dos seis isolados produtores de bacteriocinas foi utilizada a metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2002), com modificações. As bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio BHI anaeróbio, *overnight*. A cultura foi centrifugada (10000 g, 5 min.) e o pellet foi ressuscitado em 500 µL de TE (10 mM de Tris-HCl; pH 8.0, 1 mM EDTA). As células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 200 µL de TE. Após adição de lisozima (50 µL, 50 mg/mL) e mutanolisina (30 µL, 1 mg/mL), a mistura foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados SDS (150 µL, 10%) e proteinase K (50 µL, 20 mg/mL) e a mistura foi novamente incubada a 55 °C por 30 minutos. Após incubação, acetato de potássio (500 µL, 5 M) e etanol absoluto (1 mL) foram adicionados, a solução foi homogeneizada e centrifugada (14000 g, 5 min.). Após descarte do sobrenadante, o pellet foi lavado rapidamente com etanol 70% e o tubo foi deixado aberto até a secagem completa do *pellet*. O *pellet* foi ressuscitado em água milli-Q (600 µL) e foi adicionado fenol-clorofórmio (600 µL, pH 8.0). A mistura foi incubada em gelo por 5 min., com agitação intermitente, e centrifugada (14000 g, 10 min.). A fase aquosa foi coletada e novamente acrescida de fenol-clorofórmio, repetindo o procedimento anterior. O DNA foi precipitado pela adição de acetato de amônio (200 µL, 7 M) e etanol (600 µL, 100%). Os tubos foram incubados a -20 °C por 30 minutos e centrifugados (12000 g, 10 min.). O sobrenadante

foi descartado e o *pellet* de DNA foi lavado com etanol 70% gelado (1 mL); ao final, o DNA foi ressuspendido em TE (150 µL) e estocado a -20 °C até a utilização.

As amostras de DNA extraídas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,0%), utilizando o tampão TBE 1X (Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 0,1 mM - pH 8,0). O gel foi corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*) e as amostras foram posteriormente diluídas para 50 ng/µL para a realização das reações em cadeia da polimerase (PCR).

4.4 Amplificação do rDNA 16S

O rDNA 16S foi amplificado utilizando os *primers* universais 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) e 536R (GTA TTA CCG CGG CTG CTG) (Suzuki *et al.*, 1998). As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL, utilizando-se 17,8 µL de água milli-Q, 2,5 µL de tampão 10x, 0,625 µL de dNTP's (10mM), 1,25 µL de MgCl₂ (50mM), 1 µL de *primer* F (10 pM/µL), 1 µL de *primer* R (10 pM/µL), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 0,6 µL de DNA (50ng/µL).

A PCR foi realizada utilizando as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos para a desnaturação, 60 °C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72 °C por 30 segundos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72 °C por 7 minutos e os tubos foram mantidos sob refrigeração à 4 °C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), o gel foi corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

4.5 Purificação do rDNA 16S

Os amplicons obtidos através da PCR foram purificados utilizando o kit *EasyGen (EasyPath)*, de duas formas distintas: o produto de PCR foi diretamente purificado, e os amplicons, após visualização em gel de agarose (1,5%), foram excisados do gel e purificados.

Para a purificação diretamente do produto de PCR, 100 µL da reação foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL. Tampão de lise/ligação (500 µL) foi adicionado à amostra e, em seguida, a solução foi transferida para uma coluna com sílica acoplada a um tubo coletor e centrifugada (10000 g, 30 s.). O filtrado foi descartado e o tampão de lavagem acrescido de etanol (750 µL) foi adicionado à coluna. Após nova centrifugação (10000 g, 3min.), o filtrado foi descartado e a coluna centrifugada novamente. Posteriormente, acoplou-se a mesma coluna em um novo microtubo de 1,5 mL. Tampão de eluição (40 µL) foi adicionado à sílica, a coluna foi deixada na posição vertical por 2 minutos e depois centrifugada (10000 g, 2 min.) para eluição do DNA. O material genético purificado foi estocado a -20 °C até a sua utilização.

Para a purificação do amplicon em gel de agarose, o fragmento recortado do gel (máximo 300 mg) foi incubado a 55 °C com o tampão de lise/ligação (500 µL) até que a fração do gel se dissolvesse completamente. A amostra foi transferida para a coluna acoplada a um tubo coletor (até 800 µL/coluna) e centrifugada (10000 g, 3 min.). As etapas de lavagem e eluição foram feitas conforme descrito acima.

4.6 Sequenciamento do rDNA 16S

Após a purificação do rDNA 16S pelas duas metodologias descritas, as amostras, juntamente com o produto de PCR não purificado, foram sequenciadas pelo método de terminação da cadeia, em sequenciador automático MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare). Foram realizadas 2 reações, uma utilizando o *primer forward* e outra o *primer reverse*. Todas as sequências consenso obtidas foram comparadas àquelas disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* para nucleotídeos (BLASTn) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

4.7 Análise do polimorfismo genético por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

Para realizar a discriminação dos isolados pertencentes à mesma espécie e eliminar possíveis réplicas de clones, o DNA genômico foi incluso em blocos de agarose de baixo ponto de fusão, clivado com endonucleases específicas e submetido à separação eletroforética em gel de campo pulsado (PFGE).

As bactérias identificadas como pertencentes à mesma espécie foram cultivadas em meio BHI líquido, *overnight*, com duas ativações consecutivas. A absorbância das culturas foi medida em espectrofotômetro (610 nm) e o volume de cultura correspondente a uma absorbância de 1,0 foi centrifugado (12000 g, 3 min.). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em TE (350 µL). A solução foi incubada a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente, gel de agarose *low melting point* a 2% foi fundido e 350 µL do mesmo foi adicionado a cada uma das amostras. A mistura foi colocada em um molde de *plugs*. Após solidificação, os *plugs* foram retirados do molde e colocados em tubo contendo 1,5 mL de tampão EC (6mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% de Brij-L23, 0,2% *sodium deoxycholate*, 0,5% *sodium lauroylsarcosine*), 10 µL de mutanolisina e 10 µL de lisozima. A solução foi incubada por 4 horas a 37 °C. Posteriormente, 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados a cada amostra e estas incubadas a 50 °C, *overnight*. Decorrido esse tempo, os *plugs* foram lavados 5 vezes utilizando o tampão TE. Foram utilizados 3 mL em cada lavagem, com intervalo de 20 minutos entre elas. Os *plugs* foram armazenados a 4 °C em 1,5 mL de TE. A digestão foi feita com as endonucleases *SmaI* e *ApaI*, separadamente. Para a clivagem com *SmaI*, meio *plug* foi colocado em contato com uma solução contendo 80 µL de água milli-Q, 10 µL de tampão BSA (soroalbumina bovina) e 10 µL de tampão T. Para a clivagem com *ApaI*, meio *plug* foi colocado em contato com uma solução contendo 90 µL de água mili-Q e 10 µL de tampão A (BSA incluso em tampões de reação). As misturas da reação contendo os blocos de agarose com DNA foram incubadas a 37 °C por 30 minutos para ambientação. Posteriormente, as soluções foram retiradas e adicionadas novamente, porém acrescidas de 1,5 µL das endonucleases (enzimas *SmaI* e *ApaI*). A incubação foi feita a 37 °C por 4 horas. Após esse tratamento, os *plugs* foram submetidos à corrida eletroforética sob as seguintes condições: tempo de pulso inicial de 1 segundo, tempo de pulso final de 8 segundos, corrida de 20 horas, velocidade de 6 V/cm, angulação de 120°.

Como padrão de tamanho de bandas foi utilizado o marcador *Lambda Ladder Bio-Rad* e *Lambda Hind III*. Os géis foram corados com brometo de etídeo e sua imagem fotodocumentada em transluminador ultravioleta. A análise dos perfis de restrição foi feita por inspeção visual da imagem do gel.

4.8 Detecção de genes envolvidos na modificação pós-traducional de bacteriocinas pertencentes à Classe I

Para a detecção dos genes envolvidos na modificação pós-traducional de lantibióticos (bacteriocinas pertencentes à classe I), *lanB*, *lanC* e *lanM*, foram utilizados *primers* degenerados (**Tabela 1**) (WIRAWAN *et al.*, 2006; HYINK *et al.*, 2005).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL, utilizando-se 17,8 µL de água milli-Q, 2,5 µL de tampão 10x, 0,625 µL de dNTP's (10mM), 1,25 µL de MgCl₂ (50mM), 1 µL de *primer* F (10 pM/µL), 1 µL de *primer* R (10 pM/µL), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 0,6 µL de DNA (50 ng/µL).

A PCR foi realizada utilizando as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos para a desnaturação, 40 °C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 65 °C por 30 segundos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 65 °C por 10 minutos e os tubos foram mantidos em refrigeração a 4 °C. Foram utilizadas as bactérias *Streptococcus salivarius* 20P3 como controle para *lanC* e *Lactococcus lactis* ATCC 3147 como controle para *lanM*. Os tamanhos esperados dos produtos de amplificação para cada gene estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Genes alvo e *primers* utilizados nas reações de PCR para detecção de genes associados à biossíntese de lantibióticos, e tamanho esperado do amplicon de interesse.

Gene alvo	<i>Primers</i>	Amplicon esperado (pb)
<i>lanB</i>	F 5`-TATGATCGAGAARYA KAWAGATATGG-3` R 5`-TTATTAIRCAIATGIAYDAWACT-3`	400-500
<i>lanC</i>	F 5`-TAATTTAGGATWISYIMAYGG-3` R 5`-ACCWKGKIIICCRTRRCACCA-3`	200-300
<i>lanM</i>	F 5`- ATGCWAGWYWTGCWCATGG-3` R 5`-CCTAATGAACCRTRRYAYCA-3`	200-300

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados selecionados

A atividade antimicrobiana dos isolados escolhidos foi avaliada por Fochat (2014), utilizando *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus* sp., *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*. Os isolados ISO 37, C6I8 e C6I9 demonstraram atividade contra quatro destes microrganismos indicadores, o isolado AS1.5 contra três destes, ao passo que ISO7 e C7I2 inibiram somente o crescimento de *Streptococcus* sp. (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antagonista observada nos testes de sobrecamada (FOCHAT, 2014).

Isolados	Microrganismo indicador				
	<i>Streptococcus macedonicus</i>	<i>Streptococcus equinus</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ISO 7	-	-	+	-	-
C6I8	+	+	-	+	+
C6I9	+	+	-	+	+
C7I2	-	-	+	-	-
ISO37	+	+	-	+	+
AS1.5	+	+	-	-	+

(+: presença de atividade antimicrobiana; -: ausência de atividade antimicrobiana)

O gênero *Streptococcus* abrange um grupo heterogêneo de microrganismos, sendo alguns membros da microbiota normal, enquanto outros são patógenos importantes que podem causar uma ampla variedade de infecções em homens e animais (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

Os *Enterococcus* são microrganismos que vêm se destacando nos últimos anos como patógenos oportunistas associados a infecções hospitalares. *Enterococcus faecalis* é uma espécie frequentemente isolada em humanos e que tem gerado preocupações devido à resistência intrínseca aos principais grupos de antimicrobianos utilizados na terapêutica (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

Listeria monocytogenes, causadora da doença conhecida como listeriose, é um patógeno ubíquo, adaptado a diversos ambientes, e que pode ser veiculado por alimentos contaminados. Pode estar presente em alimentos e ingredientes crus, mas também em alimentos submetidos a tratamentos térmicos, equipamentos, utensílios, superfícies de manipulação de alimentos, além de ração animal, esgoto, solo e água. (ZUNABOVIC *et al.*, 2011).

5.2 Espectro de ação das bacteriocinas

De acordo com a visualização dos halos de inibição de crescimento dos microrganismos indicadores a partir das colônias pontuais dos isolados, observou-se que C6I8, C6I9 e ISO37 inibiram o crescimento de todos os indicadores testados (n=10), enquanto ISO7 e AS1.5 inibiram o crescimento de nove indicadores e C7I2 inibiu cinco bactérias indicadoras. É importante ressaltar que todos os isolados inibiram o crescimento de pelo menos uma bactéria indicadora Gram-negativa, o que, aliado à inibição do crescimento de bactérias pertencentes a diferentes gêneros, demonstra o amplo espectro de ação das bacteriocinas produzidas pelos isolados ruminais avaliados (**Tabela 3**).

Tabela 3. Espectro de ação das bacteriocinas produzidas pelos isolados ruminais avaliados.

Isolados	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>E.coli</i>	<i>S. uberis</i>	<i>S. equinus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>L. lactis</i>
ISO7	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
C6I8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C6I9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C7I2	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
ISO37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AS1.5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

(+: presença de atividade antimicrobiana; -: ausência de atividade antimicrobiana)

A maioria das bactérias utilizadas como indicadores, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, as espécies de *Streptococcus*, *Lactococcus lactis* e *Klebsiella*

sp., pertencem à microbiota normal de humanos ou animais, porém, em condições adversas podem causar doenças. *Pseudomonas* sp. é um microrganismo oportunista muito comum em ambientes hospitalares e *Bacillus cereus* está frequentemente associado à intoxicações alimentares.

O amplo espectro de atividade dos peptídeos antimicrobianos produzidos pelos isolados ruminais avaliados indica que tais bacteriocinas poderiam ser utilizadas como uma possível alternativa ao uso de antimicrobianos na medicina humana e animal e também como conservante de alimentos.

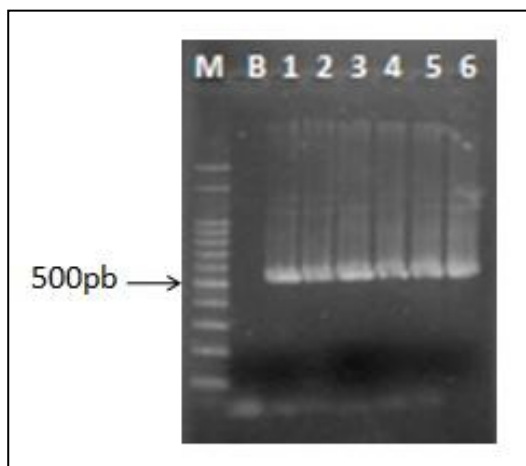
5.3 Extração de DNA dos isolados bacteriocinogênicos e amplificação do rDNA 16S

O DNA genômico dos seis isolados selecionados como bacteriocinogênicos foi eficientemente extraído, resultando em uma concentração final média de 2000 ng/μL. Os índices de pureza (relação 260/280 e 260/230) se mostraram adequados, com baixa contaminação das amostras por proteínas e sais.

A extração de DNA pelo método do fenol-clorofórmio, apesar de ser mais trabalhosa, resulta em um material genético de alta concentração e qualidade, principalmente quando comparada aos kits comerciais. Os kits são ideais para análises de um volume grande de amostras em função da rapidez na obtenção de resultados, porém resultam em uma baixa concentração final de DNA e de qualidade inferior.

Após amplificação do rDNA 16S utilizando os *primers* universais 27F e 536R foram obtidos amplicons com tamanho entre 500 e 600pb, corroborando com o tamanho de amplicon esperado para este par de *primers* (aproximadamente 527 pb) (**Figura 1**).

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR obtido após amplificação do rDNA 16S, utilizando os *primers* universais 27F e 536R. M- marcador *Lambda Ladder* 100pb; B-branco; 1- ISO7; 2- C6I8; 3- C6I9; 4- C7I2; 5- ISO37; 6- AS1.5.



5.4 Purificação e sequenciamento dos fragmentos de rDNA 16S

Dos três procedimentos aos quais os amplicons foram submetidos para serem sequenciados (purificados do gel, purificados diretamente da PCR e PCR não purificado), os amplicons purificados do PCR foram os que apresentaram melhores resultados no sequenciamento.

As sequências do rDNA 16S dos isolados bacteriocinogênicos foram comparadas às sequências disponíveis no banco de dados GenBank e as porcentagens de identidade para os melhores *scores* no GenBank foram sempre iguais a 100% com o tamanho de fragmento analisado (**Apêndice 1**). A comparação das sequências de rDNA 16S indicaram que todos os seis isolados pertenciam ao gênero *Streptococcus*, sendo eles das espécies *Streptococcus equinus* (n=3), *Streptococcus macedonicus* (n=1), *Streptococcus lutetiensis* (n=1) e *Streptococcus gallolyticus* (n=1) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Identificação dos isolados bacteriocinogênicos pelo sequenciamento do rDNA 16S.

Isolados	Identificação inicial*	Identificação rDNA 16S
ISO7	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus equinus</i>
C6I8	-	<i>Streptococcus equinus</i>
C6I9	-	<i>Streptococcus equinus</i>
C7I2	-	<i>Streptococcus macedonicus</i>
ISO37	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus lutetiensis</i>
AS1.5	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>

*: identificação bioquímica disponível no Laboratório de Microbiologia do Rúmen, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora.

-: ausência de identificação

O complexo “*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*” inclui espécies muito relacionadas, cuja diferenciação é difícil utilizando os métodos de identificação convencionais. Os isolados caracterizados como *S. equinus* e *S. bovis* compreendem um cluster, e, por questão de prioridade nomenclatural, prevalece à designação *S. equinus* (NEVES, 2008).

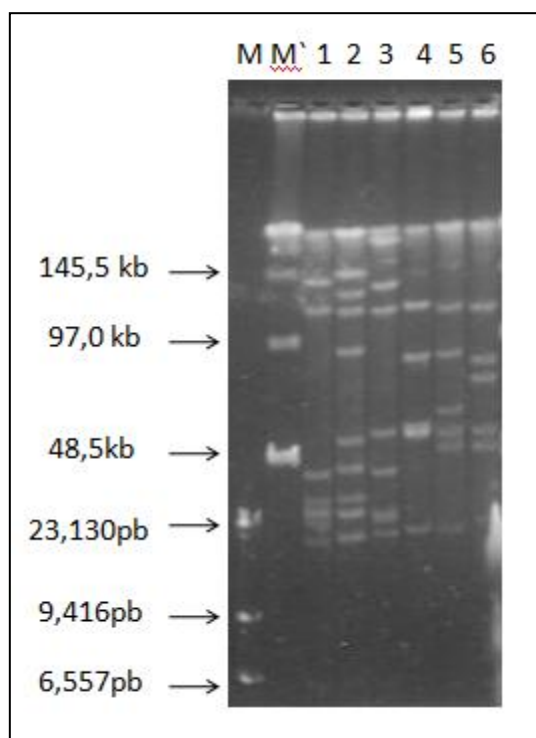
Bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* são comumente encontradas na cavidade oral e no trato respiratório de animais, assim como no ambiente ruminal (SOUZA, 2016). Diferentes espécies desse gênero têm sido caracterizadas como produtoras de bacteriocinas de amplo espectro de ação, como o peptídeo G32 produzido por *S. salivarius* (WESCOMBE *et al.*, 2012), a mutacina 1140 de *S. mutans* JH1000 (HILLMAN *et al.*, 1998; ESCANO *et al.*, 2015), a termofilina 1277 de *S. thermophilus* SBT1277 (KABUKI *et al.*, 2011) e a suicina 3908 de *S. suis* (VAILLANCOURT *et al.*, 2015). *Streptococcus equinus* é bastante prevalente no rúmen de bovinos (WHITFORD *et al.*, 2001) e, segundo alguns autores, mais de 20% dos isolados apresentam atividade antimicrobiana (MANTOVANI *et al.*, 2001; WHITFORD *et al.*, 2001; JOACHIMSTHAL *et al.*, 2009). Dentre as bacteriocinas produzidas por *S. equinus* destacam-se a bovicina HJ50 de *S. equinus* HJ50 (WANG *et al.*, 2014), a bovicina HC5 de *S. equinus* HC5 (MANTOVANI *et al.*, 2001) e a bacteriocina SB15 produzida por *S. bovis/equinus* Sb15 (JOACHIMSTHAL *et al.*, 2009).

Bovicina HC5, produzida pelo isolado ruminal *S. equinus* HC5, é um lantibiótico de 2,449 kDa, que se destaca por apresentar amplo espectro de ação e possíveis aplicações na medicina veterinária, principalmente no controle de microrganismos causadores de mastite bovina (PINTO, 2008). LEE *et al.*, (2002) e LIMA *et al.*, (2009) verificaram ainda que a bovicina HC5 reduz a produção de metano e amônia por bactérias ruminais, podendo também ser utilizada como aditivo já que tornaria mais eficiente a conversão alimentar pelo animal ruminante. Sua aplicação industrial é facilitada devido à estabilidade térmica, resistência a ampla faixa de pH e a enzimas proteolíticas, como proteinase K e α -quimiotripsina (MANTOVANI *et al.*, 2002).

5.5 Polimorfismo genético por PFGE

A discriminação sub-específica dos três isolados identificados como *Streptococcus equinus* resultou em diferentes perfis no polimorfismo de bandas gerado pela técnica de PFGE, o que sugere que esses isolados não são clones, representando diferentes linhagens bacterianas (**Figura 2**).

Figura 2. Eletroforese em gel de campo pulsado dos isolados identificados como *Streptococcus equinus* (ISO7, C6I8 e C6I9), após clivagem com *ApaI* (1,2,3) e *SmaI* (4,5,6). M- *Lambda Hind III*; M'- *Lambda Ladder Bio-Rad*; 1 e 4- ISO7; 2 e 5- C6I8; 3 e 6- C6I9.



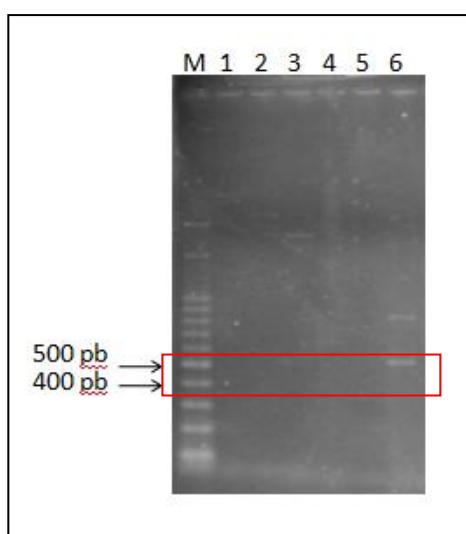
Tal resultado aumenta a probabilidade dos produtos sintetizados por essas bactérias serem distintos, corroborando com os resultados do espectro de atividade que evidenciou diferenças no que se refere aos microrganismos inibidos por tais bacteriocinas.

5.6 Genes envolvidos na modificação pós-traducional de bacteriocinas pertencentes à Classe I

A presença de genes de modificação pós-traducional de lantibióticos foi avaliada no DNA genômico extraído dos isolados ruminais selecionados. Foi identificada a presença de pelo menos um gene de modificação pós-traducional em quatro (66,67%) dos seis isolados bacteriocinogênicos avaliados.

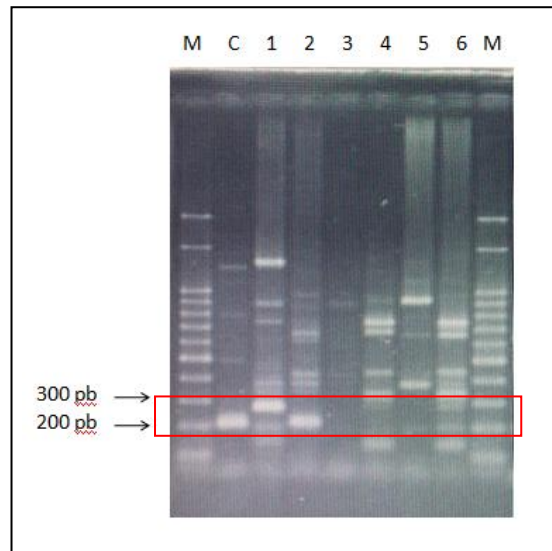
Apenas o isolado identificado como *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5) apresentou amplicon de 400 a 500 pb, o qual é sugestivo da presença do gene *lanB* (**Figura 3**).

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) das reações de amplificação para o gene *lanB*. M- *Lambda Ladder* 100pb; 1- *Streptococcus equinus* (ISO7); 2- *Streptococcus equinus* (C6I8); 3- *Streptococcus equinus* (C6I9); 4- *Streptococcus macedonicus* (C7I2); 5- *Streptococcus lutetiensis* (ISO37); 6- *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5).



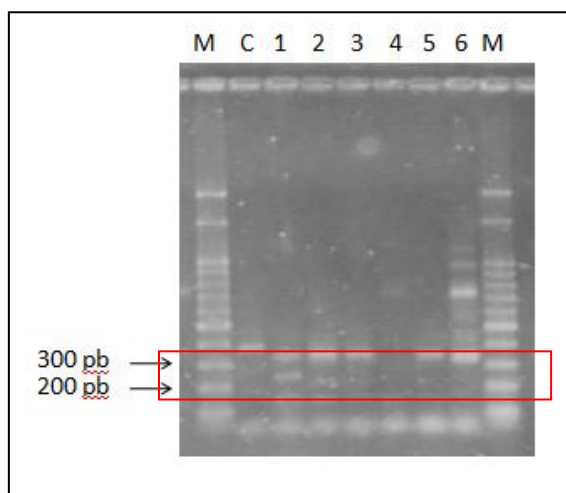
Quatro isolados, dois *Streptococcus equinus* (ISO7 e C6I8), *Streptococcus lutetiensis* (ISO37) e *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5), apresentaram fragmentos com tamanho entre 200 e 300 pb, o que sugere a presença do gene *lanC* (**Figura 4**).

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) das reações de amplificação para o gene *lanC*. M- Lambda Ladder 100pb; C- *Streptococcus salivarius* 20P3 (controle positivo); 1- *Streptococcus equinus* (ISO7); 2- *Streptococcus equinus* (C6I8); 3- *Streptococcus equinus* (C6I9); 4- *Streptococcus macedonicus* (C7I2); 5- *Streptococcus lutetiensis* (ISO37); 6- *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5).



Para o gene *lanM*, dois isolados identificados como *Streptococcus equinus* (ISO7 e C6I8) apresentaram fragmentos com tamanho entre 200 e 300pb, resultados estes sugestivos da presença do referido gene (**Figura 5**).

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) das reações de amplificação para o gene *lanM*. M- *Lambda Ladder* 100pb; C- *Lactococcus lactis* 3147 (controle positivo); 1- *Streptococcus equinus* (ISO7); 2- *Streptococcus equinus* (C6I8); 3- *Streptococcus equinus* (C6I9); 4- *Streptococcus macedonicus* (C7I2); 5- *Streptococcus lutetiensis* (ISO37); 6- *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5).



Nenhum dos isolados bacteriocinogênicos avaliados apresentou somente o gene *lanM*, que codifica uma proteína capaz de realizar as reações de desidratação e formação dos anéis de lantionina conjuntamente, nas bacteriocinas da classe I. Resultados positivos para esse gene parecem ser mais específicos para indicar a capacidade de produção de lantibióticos, por não apresentarem reação cruzada com os demais genes, e, quando encontrados isoladamente, estão relacionados à produção de lantibióticos da subclasse II (MORAES, 2011).

O aparato de modificação completo *lanB/lanC*, responsável pelas reações de desidratação e formação de lantionina, respectivamente, foi detectado somente no isolado identificado como *Streptococcus gallolyticus* (AS1.5), o único a apresentar amplicons sugestivos da presença mútua dos genes *lanB* e *lanC*. Seria esperada a presença simultânea desses genes devido ao fato dos mesmos estarem frequentemente localizados no mesmo operon em linhagens produtoras de lantibióticos (MORAES, 2011; OLIVEIRA, 2014). Contudo, Wirawan et al. (2006) também observaram que a amplificação de *lanB* e *lanC* não ocorre conjuntamente em diversas linhagens produtoras de bacteriocinas, sendo comum a amplificação por apenas um dos oligonucleotídeos.

Segundo alguns autores, a amplificação de qualquer um dos genes de modificação pós-traducional de lantibióticos já é suficiente para considerar um isolado bacteriano como potencialmente produtor de bacteriocinas da classe I (HYINK *et al.*, 2005; WIRAWAN *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2014). Desta forma, no presente trabalho, quatro dos seis isolados ruminais bacteriocinogênicos avaliados podem ser considerados produtores de lantibióticos se confirmada a presença dos genes por seqüenciamento. Os outros dois isolados, *S. equinus* (C6I9) e *S. macedonicus* (C7I2), não apresentaram produto de amplificação correspondente a nenhum dos genes de modificação pós-traducional de lantibióticos analisados. Como esses isolados bacteriocinogênicos inibiram o crescimento de diferentes bactérias indicadoras, a não detecção dos genes *lanB*, *lanC* e *lanM* pode indicar que esses isolados ruminais apresentam outras enzimas de modificação pós-traducional de lantibióticos ou ainda que os mesmos produzam bacteriocinas pertencentes a outras classes.

A presença do gene nem sempre está correlacionada com a atividade antimicrobiana, uma vez que vários fatores estão envolvidos na regulação da expressão gênica (MCAULIFFE *et al.*, 2001; CHEIGH *et al.*, 2002; MORAES, 2011). A composição do meio de cultura, por exemplo, pode não simular as condições ótimas para a produção de bacteriocinas, inclusive alguns componentes dos meios, como agentes geleificantes e emulsificantes, podem inibir a produção de algumas bacteriocinas (CHEN e HOOVER, 2003). A produção desses peptídeos também está relacionada com a fase de crescimento microbiano, e, para determinadas linhagens bacteriocinogênicas, condições ambientais desfavoráveis podem estimular a produção (DE VUYST *et al.*, 1996; GALVEZ *et al.*, 2007).

Vale ressaltar ainda que as reações de amplificação para *lanB*, *lanC* e *lanM* realizadas apresentaram como limitação a formação de bandas inespecíficas devido a utilização de *primers* degenerados. Entretanto, os demais fragmentos gerados apresentam tamanhos diferentes quando comparados aos tamanhos esperados dos fragmentos das sequências alvo.

6 CONCLUSÃO

- As bacteriocinas produzidas pelas bactérias ruminais avaliadas apresentam amplo espectro de ação, já que inibiram o crescimento da maioria dos indicadores testados, sendo estes indicadores pertencentes ao mesmo gênero e a gêneros diferentes das bactérias produtoras de bacteriocinas;
- As seis bactérias ruminais bacteriocinogênicas analisadas pertencem ao gênero *Streptococcus*, sendo três *Streptococcus equinus* e as demais identificadas como *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus lutetiensis* e *Streptococcus gallolyticus*;
- As bactérias identificadas como *Streptococcus equinus* apresentaram variabilidade no perfil de bandas gerado pela técnica de PFGE e, portanto, apesar de pertencerem à mesma espécie, são linhagens geneticamente distintas;
- Em relação aos genes avaliados de modificação pós-traducional de lantibióticos, foram detectados amplicons correspondentes ao gene *lanC* na maioria dos isolados bacteriocinogênicos (n=4), enquanto apenas um isolado apresentou amplicon correspondentes a *lanB* e dois isolados amplicons correspondentes a *lanM*;
- A ausência de detecção dos genes *lanB*, *lanC* e *lanM* nos isolados *Streptococcus equinus* (C6I9) e *Streptococcus macedonicus* (C7I2) pode indicar que outras enzimas de modificação pós-traducional estejam presentes ou ainda que esses isolados produzam bacteriocinas não-lantibióticos;

REFERÊNCIAS

- AUCHER, W.; LACOMBE, C.; HÉQUET, A.; FRÈRE, J.; BERJEAUD, J. M. Influence of amino acid substitutions in the leader peptide on maturation and secretion of mesentericin Y105 by *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 6, p. 2218-2223, 2005.
- AYMERICH, T.; HOLO, H.; HAVERSTAIN, L.S.; HUGAS, H.; 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. 62, n. 5, p. 1676-1682, 1996.
- BALAKRISHNAN, M.; SIMMONDS, R.S.; TAGG, J.R. Diverse activity against mutants *streptococci*. **Carles Research**, v.35, p.75-80, 2001.
- BOOTH, S.J.; JOHNSON, J.L.; WILKNNS, T.D. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.11, n.4, p. 718-724, 1977.
- BURGOS, M. J. G.; PULIDO, R. P.; AGUAYO, M. D. C. L.; GÁLVEZ, A.; LUCAS, R. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 22706-22727, 2014.
- CAVALCANTE, M.P.; LOPES, H.F.S.; SILVEIRA, I.A.; SANTOS, E.C.G. **Investigação de substância tipo bacteriocinas em amostras não humanas e ambientais**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal – RN.
- CHEIGH, C.; CHOI, H.; KIM, S.; KOOK, M.; KIM, T.; HEANG, J.; PYUN, Y. Influence of grow conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. **Journal of Biotechnology**, v. 95, p. 225-235, 2002.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews Food Science**, v. 2, p. 82-100, 2003.

CHEN, J.; STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Albusin b, a bacteriocin from the ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7 that inhibits growth of *Ruminococcus flavefaciens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3167-3170, 2004.

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777– 788, 2005.

DE VUYST, L.; FOULQUI' e M.R.; REVETS, H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 299-318, 2003.

ESCANO, J.; STAUFFER, B.; BRENNAN, J.; BULLOCK, M.; SMITH, L. Biosynthesis and transport of the lantibiotic mutacin 1140 produced by *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, p. 1173–1184, 2015.

FERREIRA, A.E. **Estudos de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus***. 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do meio ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2005.

FIELD, D.; HILL, C.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P. The dawning of a ‘Golden era’ in lantibiotic bioengineering. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1077-1087, 2010.

FOCHAT, R.C. **Prospecção de bacteriocinas produzidas por isolados ruminais**. 2014. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2014.

GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; BEN OMAR, N.; Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70, 2007.

GRAY, E.J.; DI FALCO, M.; SOULEIMANOV, A.; SMITH, D.L. Proteomic analysis of the bacteriocin thuricin 17 produced by *Bacillus thuringiensis* NEB17. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, p. 27-32, 2006.

HILLMAN, J. D.; NOVÁK, J.; SAGURA, E.; GUTIERREZ, J. A.; BROOKS, T. A.; CROWLY, P. J.; HESS, M.; AZIZI, A.; LEUNG, K. P.; CVITKOVITCH, D.; BLEIWEIS, A. S. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 2743–2749, 1998.

HUNGATE, R.E. The rumen microbial ecosystem. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 6, p. 39- 66, 1975.

HYINK, O.; BALAKRISHNAN, M.; TAGG, J.R. *Streptococcus rattus* strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 235–241, 2005.

JOACHIMSTHAL, E. L.; REEVES, R. K. H.; HUNG, J.; NIELSEN, L. K.; OUWERKERK, D.; KLIEVE, A. V.; VICKERS, C. E. Production of bacteriocins by *Streptococcus bovis* strains from Australian ruminants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 428-436, 2009.

JOERGER, R.D. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 640-647, 2003.

KABUKI, T.; KAWAI, H.; UENISHI, H.; SETO, Y.; KOK, J.; NAKAJIMA, H.; SAITO, T. Gene *cluster* for biosynthesis of thermophilin 1277 - a lantibiotic produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277, and heterologous expression of TepI, a novel immunity peptide. **Journal of Applied Microbiology**, v.110, p. 641- 649, 2011.

KALMOKOFF, M. L.; LU, D.; WHITFORD, M. F.; TEATHER, R. M. Evidence for production of a new lantibiotic (butyriovibriocin OR79A) by the ruminal anaerobe *Butyriovibrio fibrisolvens* OR79: characterization of the structural gene encoding

butyrivibriocin OR79A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2128-2135, 1999.

KIDO, Y.; HAMAKADO, T.; YOSHIDA, T.; ANNO, M.; MOTOKI, Y.; WAKAMIYA, T. SHIBA, T. Isolation and characterization of ancovenin, a new inhibitor of angiotensin I converting enzyme, produced by actinomycetes. **Journal of Antibiotics**, v.36, p.1295-1299, 1983.

LEE, S. S.; HSU, J. T.; MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production *in vitro*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, p. 51-55, 2002.

LIMA, J. R.; RIBON, A. O.; RUSSELL, J. B.; MANTOVANI, H. C. Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria *in vitro*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 292, p. 78-84, 2009.

MAKY, M. A.; ISHIBASHI, N.; ZENDO, T.; PEREZ, R. H.; DOUD, J. R.; KARMI, M.; SONOMOTO, K. Enterocin F4-9, a novel O-linked glycosylated bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 4819-4826, 2015.

MANTOVANI, H.C.; KAM, D.K.; HA, J.K.; RUSSELL, J.B. The antibacterial activity and sensitivity of *Streptococcus bovis* strains isolated from the rumen of cattle. **FEMS Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 223-229, 2001.

MANTOVANI, H.C.; RUSSELL, J.B. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, n. 4, p. 347-355, 2002.

MARTINS, E. **Associação de bacteriocinas e bactérias lácticas para inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal**. 2012. Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

MCAULIFFE, O.; RYAN, M.P.; ROSS, R.P.; HILL, C.; BREEUWER, P.; ABEE, T. Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 438-445, 1998.

MOLINA, M.P.; ALTHAUS, R.L.; BALASCH, S.; TORRES, A.; PERIS, C.; FERNÁNDEZ, N. Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk. **Journal of Dairy Science**, n. 86, p. 1947–1952, 2003.

MORAES, P.M. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo, e pesquisa de genes de bacteriocinas**. 2011. Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

NAGAO, J.; ASADUZZAMAN, S. M.; ASO, K.; OKUMA, K.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, p. 139–149, 2006.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, K.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NES, I. F.; YOON, S.; DIEP, D. B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, p. 675 – 690, 2007.

NEVES, F.P.G. **Complexo “*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*”:** Uma **Avaliação Fenotípica e Genotípica de Caráter Taxonômico e Epidemiológico**. 2008. Dissertação (Doutorado em Ciências - Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

NILSEN, T.; NES, I.F.; HOLO, H. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 7, p. 1848–1854, 1998.

NILSEN, T. **Novel enterococcal bacteriocins: optimization of production, purification, biochemical and genetic organization.** Tese (Pós-Doutorado) - Agricultural University of Norway, 1999.

OGUNBANWO, S.T.; SANNI, A.I.; ONILUDE, A. Influence of bacteriocin in the control of *Escherichia coli* infection of broiler chickens in Nigeria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.51-56, 2004.

OLIVEIRA, S.D.; JUNIOR, J.P.S.; SILVA, J.A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. **Revista Verde**, Mossoró, v.7, n.1, p. 09-15, 2012.

OLIVEIRA, I.M.F. **Potencial bacteriocinogênico de *Streptococcus bovis* isolados de rúmen de bovinos.** 2014. Monografia (Estágio Supervisionado em Microbiologia II) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; CANAL, C.W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 25-35, 2002.

ÓSCARIZ, J.C.; PISABARRO, A.G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. **International Microbiology**, v.4, n.1, p.13-19, 2001.

PINTO, M. S. **Atividade de própolis verde e bovicina HC5 sobre bactérias isoladas de mastite bovina.** 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

RASI, G.C. **Estudo de atividade de peptídeos tipo bacteriocina de *Bacillus thurigiensis*.** 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Mini-Review: The effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–6, 1989.

SANTOS, L.C. **Produção de bacteriocinas por endófitos de citros e caracterização da endoficina L de *Curtobacterium flaccumfaciens* endofítico.** 2005. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2005.

SIRTORI, L.R. **Purificação e caracterização de uma bacteriocina produzida por *Bacillus* sp.** 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

SOUZA, B.L. **Distribuição e Atividade antimicrobiana e diversidade de genes de biossíntese de bovicina HC5 e bovicina 255 em *Streptococcus* sp. isolados do rúmen de bovinos.** 2016. Dissertação (Pós-graduação em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

STROMPFOVÁ, V.; LAUROKOVA, A.; OUWEHAND, A.C. Selection of enterococci- for potential canine probiotic additives. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.107-114, 2004.

SUZUKI, M., RAPPE, M.S., GIOVANNONI, S.J. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 64, p. 4522 – 4529, 1998.

TEIXEIRA, M.L. **Purificação e caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus liqueniformis*.** 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal no Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

TEATHER, R. M.; KALMOKOFF, M. L.; WHITFORD, M. F. The Role of Bacteriocins in Rumen Microbial Ecology. In: **Proceedings of the 8 th International Symposium on Microbial Ecology.** 1999. Atlântica, Sociedade Canadense de Ecologia Microbiana, 1999.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ª edição. São Paulo: Atheneu, 2015.

VAILLANCOURT, K.; LEBEL, G.; FRENETTE, M.; GOTTSCHALK, M.; GRENIER, D. Suicin 3908, a new lantibiotic produced by a strain of *Streptococcus suis* serotype 2 isolated from a healthy carrier pig. **PLOS ONE**, v. 10, p. e0117245, 2015.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; VANDEKINDEREN, I.; DEBEVERE, J. The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactocinS producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. **Food Microbiology**, v.23, n.6, p.511-518, 2006.

WANG, J.; MA, H.; GE, X.; ZHANG, J.; TENG, K.; SUN, Z.; ZHONG, J. Bovicin HJ50-like lantibiotics, a novel subgroup of lantibiotics featured by an indispensable disulfide bridge. **PLOS ONE**, v. 9, p. e97121, 2014.

WESCOMBE, P. A.; DYET, K. H.; DIERKSEN, K. P.; POWER, D. A.; JACK, R. W.; BURTON, J. P.; INGLIS, M. A.; WESCOMBE, A. L.; TAGG, J. R. Salivaricin G32, a homolog of the prototype *Streptococcus pyogenes* nisin-Like lantibiotic SAFF22, produced by the commensal species *Streptococcus salivarius*. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 10, 2012.

WHITFORD, M. F.; MCPHERSON, M. A.; FORSTER, R. J.; TEATHER, R. M. Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 569-574. 2001.

WILLEY, J. M.; VAN DER DONK, W. A. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 477-501, 2007.

WIRAWAN, R.E.; KLESSE, N.A.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n.2, p. 1148–1156, 2006.

ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K.J.; KNEIFEL, W. Practical relevance of methodologies for detecting and tacing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review. *LWT – Food Sciente and Technology*, v.44, n.2, p.351-362, 2011.

APÊNDICE

Apêndice 1. Resultados da pesquisa de similaridade de sequências para comparação de sequências de rDNA 16S dos isolados ruminais bacteriocinogênicos avaliados com sequências de rDNA 16S de bactérias disponíveis no banco de dados de sequência GenBank. Foram listadas somente as sequências com os melhores *scores*.

Identificação rDNA 16s	Score	E-value	Identidade	Tamanho
Isolado ISO7				
Streptococcus equinus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: BP1-15	965	0.0	100%	522/522
Streptococcus sp. W10 gene for 16S rRNA, partial sequence	965	0.0	100%	522/522
Streptococcus bovis strain MPR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	965	0.0	100%	522/522
Isolado C6I8				
Streptococcus equinus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: BP1-15	950	0.0	100%	514/514
Streptococcus sp. W10 gene for 16S rRNA, partial sequence	950	0.0	100%	514/514
Streptococcus bovis strain MPR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	950	0.0	100%	514/514
Isolado C6I9				
Streptococcus equinus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: BP1-15	955	0.0	100%	517/517
Streptococcus sp. W10 gene for 16S rRNA, partial sequence	955	0.0	100%	517/517
Streptococcus bovis strain MPR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	0.0	100%	517/517
Isolado C7I2				
Streptococcus macedonicus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: W66	953	0.0	100%	516/516
Streptococcus sp. W14 gene for 16S rRNA, partial sequence	953	0.0	100%	516/516
Streptococcus sp. LRC 0253 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	953.	0.0	100%	516/516
Isolado ISO37				
Streptococcus lutetiensis 16S ribosomal RNA, complete sequence	966	0.0	100%	523/523
Streptococcus sp. JKAS-CD2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	966.	0.0	100%	523/523
Streptococcus sp. VAMC-2818 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	966	0.0	100%	523/523
Streptococcus bovis DNA for 16S rRNA, strain ATCC 27960	996.	0.0	100%	523/523
Isolado AS1.5				
Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus strain USC83-LHICA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	0.0	100%	516/516
Streptococcus gallolyticus UCN34 strain UCN34 16S ribosomal RNA, complete sequence	953	0.0	100%	516/516
Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus ATCC 43143 DNA, complete genome	953	0.0	100%	516/516
Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus ATCC BAA-2069 complete chromosome sequence, strain ATCC BAA-2069	953	0.0	100%	516/516
Streptococcus gallolyticus UCN34 complete genome	953	0.0	100%	516/516
Streptococcus bovis isolate F00130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	0.0	100%	516/516
Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus strain ATCC 43143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	0.0	100%	516/516