MARIA EUGÉNIA RIBEIRO PINTO

ESTUDO DA ACÇÃO ANTIBACTERIANA DA NISINA

PORTO
1996

ESTUDO DA ACÇÃO

ANTIBACTERIANA DA NISINA

MARIA EUGÉNIA RIBEIRO PINTO

Assistente da Faculdade de Farmácia

Universidade do Porto

ESTUDO DA ACÇÃO

ANTIBACTERIANA DA NISINA

PORTO
1996

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor

apresentada à Faculdade de Farmácia

da Universidade do Porto.

(Art. 4º, D. L. 388/70)

Orientador:

Professor Doutor

João Carlos Figueiredo de Sousa

Agradecimentos

No momento final deste trabalho quero agradecer especialmente ao Professor Doutor João Carlos Figueiredo de Sousa todos os ensinamentos na área da Microbiologia ao longo destes anos de aluna, de docência e de investigação. Este trabalho não teria sido possível sem a sua orientação, apoio e, particularmente, estímulo em alguns dos momentos de desânimo no decurso da sua realização.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia quero agradecer a disponibilidade, ajuda e carinho manifestados durante todos estes anos.

A todos os técnicos e auxiliares do Laboratório de Microbiologia deixo o meu obrigado pela colaboração que de diversas formas prestaram.

A todos os Professores ou Colegas que de algum modo ajudaram na execução e discussão deste trabalho o meu sincero reconhecimento.

Ao serviço de Iconografia e especialmente ao Saudoso Eng. Rui Pinto, agradeço o apoio no tratamento do material fotográfico.

Ao Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, na pessoa do Professor Doutor Manuel Teixeira da Silva, agradeço as facilidades e os apoios concedidos para a realização do trabalho de microscopia electrónica. À Paula Macedo e D. Irene Barros os ensinamentos que foram indispensáveis à sua execução.
Agradeço ainda ao Professor Doutor Carlos Azevedo a cedência do microscópio electrónico para a realização de uma parte do trabalho, no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

Por fim mas, não por último, quero agradecer e dedicar este trabalho aos meus filhos, ao meu marido e aos meus pais a quem devo apoio, insentivo e compreensão. Porque tudo na vida implica sacrifícios, estou consciente que a família foi sacrificada em alguns dos momentos da sua realização, quer em tempo quer em disponibilidade de espírito e, por isso, agradeço a compreensão, ajuda e carinho que em todos os momentos me dispensaram.

Ao abrigo do Decreto-Lei nº 388/70, Art. 8º, parágrafo 2, alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam das comunicações:

- Lapa, R. A. S., Lima, J. L. C., Pinto, M. E. R., Sousa, J. C. F. e Faia, A. M.. "Assay of intracellular potassium leakage.Advantages of using a transducer". IV Portuguese-Spanish Biochemestry Congress. Póvoa de Varzim, Setembro de **1991**.

- Pinto, M. E., Sousa, J. C. F., Lapa, R. A., Lima, J., Cortês, I. e Faia, A. M.."Alterações ultraestruturais induzidas por nisina em *Bacillus cereus*. I Congresso Mundial de Farmácia de Expressão de Língua Portuguesa. Lisboa, **1991**.

Resumo

Com o objectivo de estudar a acção da nisina sobre células bacterianas foi efectuado este estudo, tendo sido avaliado o efeito sobre a ultraestrutura e fisiologia de diferentes modelos bacterianos, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*.

O efeito da nisina mostrou-se dependente da sua concentração, da estirpe bacteriana, do PH do meio ou do tampão e do estado fisiológico das células no momento da sua adição.

Em estudos de viabilidade celular, *B. cereus* e *E. faecium* foram as espécies que se mostraram mais sensíveis a uma concentração de 25 UI/ml de nisina. O PH inicial do meio de TSB (7,3 ou 5,0), não influenciou significativamente a cinética de morte, a qual foi semelhante nas duas situações. O estado fisiológico das células mostrou influenciar este parâmetro, sendo observada uma maior sensibilidade das células tratadas numa fase exponencial de crescimento, quando em comparação com as tratadas em fase estacionária. Acompanhando o estudo cinético do efeito sobre o número de células viáveis, verificamos que com o tempo esse número aumentava. Perante este fenómeno verificamos, para *B. cereus*, a possibilidade de uma adaptação das células à presença da nisina, por diminuição progressiva da sensibilidade da estirpe selvagem quando isolada de meio contendo 100 UI/ml do lantibiótico.

Estudos ultraestruturais revelaram um efeito muito rápido sobre a membrana citoplasmática bacteriana e um efeito secundário, posterior no tempo, sobre a parede celular. No entanto, estudos por microscopia óptica, após coloração de Gram, mostraram que esta parede celular embora possa parecer integra se encontra fragilizada, dada a sua reacção Gram negativa. A membrana citoplasmática revelou ser o alvo primário de acção, tendo-se verificado uma precoce alteração no natural perfil assimétrico apresentado por esta estrutura em bactérias Gram positivo. Esta precoce alteração do perfil membranar para simétrico foi acompanhada de uma rápida alteração da permeabilidade selectiva naturalmente apresentada por esta estrutura do invólucro bacteriano. Verificamos, por estudos de cinética do efluxo de potássio, uma rápida e extensa saída deste catião da célula bacteriana. Este efeito directo sobre a membrana citoplasmática foi igualmente verificado ao tratar protoplastos das diferentes espécies bacterianas Gram positivo, com uma concentração de 25 UI/ml de nisina e cinco minutos de actuação, tendo-se verificado uma sensibilidade semelhante de todos os modelos ao efeito de lise pela nisina. Assim, a membrana citoplasmática das diferentes espécies mostrou uma sensibilidade semelhante ao efeito deste lantibiótico.

Sendo grande parte da actividade enzimática da célula bacteriana localizada na membrana citoplasmática, fomos estudar o efeito da nisina na actividade respiratória das células bacterianas e na actividade da desidrogenase succínica em membranas isoladas. A actividade respiratória foi rápida e drasticamente inibida pela nisina, sendo o *B. cereus* a espécie mais sensível. Concentrações inferiores às que causam a morte mostraram-se potentes inibidores da actividade respiratória da bactéria e este fenómeno, juntamente com a deplecção das células em potássio, está provavelmente envolvido na alteração do metabolismo e na inibição do crescimento bacteriano. Não foi registado efeito inibitório significativo sobre a actividade enzimática da desidrogenase succínica em membranas bacterianas isoladas dos diferentes modelos bacterianos.

Foi verificado, durante o estudo do crescimento e morte por estudos de viabilidade e espectrofotométricos, que a descida do número de CFU/ml antecedia a drástica descida verificada na densidade óptica das culturas, o que pode levar a pensar que a lise celular ocorre secundariamente à morte, nestes modelos bacterianos. Este fenómeno, verificado por tratamento de culturas exponenciais obtidas em meio de TSB PH inicial 7,3 não foi contudo verificado quando a cultura se encontrava na fase estacionária ou foi obtida em meio com PH inicial de 5,0. O efeito da nisina na indução da lise celular mostrou-se assim muito dependente do PH do meio e do estado fisiológico das células. O mecanismo de inibição bacteriana da nisina será assim diferente para bactérias com desenvolvimento a PH (5,0) ou (7,3). As características do meio onde se exprime a actividade autolítica mostraram influenciar igualmente o resultado. Na tentativa de avaliarmos a participação das enzimas do sistema autolítico endógeno neste fenómeno, como consequência de possíveis alterações nos processos responsáveis pela sua regulação, estudamos o efeito da NBS, como inibidor da sua actividade. Este composto mostrou inibir a actividade bacteriolítica provocada pela nisina, bem como a autólise espontânea verificada para células de *B. cereus* suspensas em tampão a PH 8,0.

Em *E. coli* foi verificado que uma concentração de 1000 UI/ml de nisina não afectou a normal cinética de crescimento, nem alterou a permeabilidade da membrana citoplasmática ao potássio. Considerando que a membrana exterior está implicada nesta insensibilidade das estirpes bacterianas de Gram negativo à nisina, avaliamos o seu efeito sobre células apresentando uma membrana exterior afectada por tratamento prévio com EDTA, ou por mutação em estirpe rugosa ATCC 4157. Verificamos que a adição de EDTA à estirpe selvagem, e mais intensamente à estirpe rugosa, inibiu o crescimento e induziu a lise celular.

Résumé

Cette étude a été effectuée dans le but d'étudier l'action de la nisine sur des cellules bactériennes, en évaluant l'effet produit sur l'ultrastructure et la physiologie de modèles bactériens différents, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli*. L'effet de la nisine s'est montré dépendant de sa concentration, de l'origine bactérienne, du PH du milieu ou du tampon et de l'état physiologique des cellules au moment de son addition.

Dans des études de viabilité cellulaire, *B. cereus* et *E. faecium* ont été les espèces qui se sont montrées les plus sensibles à une concentration de 25 UI/ml de nisine. Le PH initial du milieu de TSB (7,3 ou 5,0) n'a pas influencé, de façon significative, la cinétique de mort, qui a été pareille dans les deux situations. L'état physiologique des cellules a montré une influence sur ce paramètre, puisque l'on a observé une plus grande sensibilité des cellules traitées dans une phase exponentielle de croissance, en comparaison avec celles qui ont été traitées dans une phase stationnaire. En accompagnant l'étude cinétique de l'effet sur le nombre de cellules viables, nous avons vérifié que ce nombre augmentait avec le temps. Face à ce phénomène, nous avons vérifié, pour *B. cereus*, la possibilité d'une adaptation des cellules à la présence de la nisine, par la diminution progressive de la sensibilité de souche sauvage quand elle se trouve isolée du milieu qui contient 100 UI/ml du lantibiotique.

Des études ultrastructurales ont révélé un effet très rapide sur la membrane cytoplasmatique bactérienne et un effet secondaire, postérieurement, sur la paroi cellulaire. Cependent, des études par microscopie optique, après une coloration de Gram, ont montré que cette paroi cellulaire, malgré son intégrité apparente, se trouve fragilisée, étant donné sa réaction Gram négative. La membrane cytoplasmatique s'est révélée être la principale cible d'action, puisque l'on a vérifié un changement précoce dans le profil assymétrique naturel présenté par cette structure en bactéries Gram positif. Ce changement précoce du profil de la membrane vers la symétrie a été accompagné par un changement rapide de la perméabilité sélective présentée de forme naturelle par cette structure de l'enveloppe bactérienne. Nous avons vérifié, par des études de cinétique de l'efflux de potassium, une sortie rapide et étendue de ce cation de la cellule bactérienne. Cet effet direct sur la membrane cytoplasmatique a été vérifié en traitant des protoplastes des souches Gram positif, avec une concentration de 25 UI/ml de nisine et cinq minutes d'action et on a vérifié une sensibilité semblable des tous les modèles à l'effet de lyse par la nisine. Ainsi, la membrane cytoplasmatique des différentes espèces a montré une sensibilité semblable à l'effet de ce lantibiotique.

Étant donné qu'une grande partie de l'activité enzymatique de la cellule bactérienne est localisée dans la membrane cytoplasmatique, nous avons étudié l'effet de la nisine sur l'activité respiratoire des cellules bactériennes et sur l'activité de la déshydrogenase succinique dans les membranes isolées. L'activité respiratoire a été inhibée de façon rapide par la nisine et le *B. cereus* s'est montré l'espèce la plus sensible. Des concentrations inférieures à celles qui causent la mort se sont montrées de puissants inhibiteurs de l'activité respiratoire de la bactérie et ce phénomène, avec la déplétion des cellules dans le potassium, est probablement engagé dans le changement du métabolisme et dans l'inhibition de la croissance bactérienne. Il n'a pas été observé d'effect inhibitoire significatif sur l'activité enzymatique de la déshydrogenase succinique dans des membranes bactériennes isolées des différents souches. On a vérifié, pendent l'étude de la croissance et de la mort (viabilité et densité optique), que la baisse du nombre de CFU/ml précédait la baisse vérifiée dans la densité optique des cultures, ce qui peut mener à penser que la lyse cellulaire est postérieur à la mort, dans ces modèles bactériens. Ce phénomène, vérifié par traitement de cultures exponentielles obtenues dans un milieu TSB PH initial (7,3), n'a pas été cependent vérifié quand la culture se trouvait dans la phase stationnaire ou a été obtenue dans un milieu avec un PH (5,0). L'effet de la nisine sur l'induction de la lyse cellulaire s'est montré ainsi trés dépendent du PH du milieu et de l'état physiologique des cellules. Le mécanisme d'inhibition bactérienne de la nisine sera ainsi différente pour des bactéries avec un développement à PH (5,0) ou (7,3). Les caractéristiques du milieu où s'exprime l'activité autolytique ont également montré une influence sur le résultat. En essayant d'évaluer la participation des enzymes du système autolytique endogène à ce phénomène, comme une conséquence de possibles changements dans les processus responsables de sa régulation, nous avons étudié l'effet de la NBS, comme inhibiteur de son activité. Ce composé a montré inhiber l'activité bactériolitique provoquèe par la nisine, ainsi que l'autolyse spontanèe vérifiée pour des cellules de *B. cereus* suspendues à un tampon (PH 8,0).

Dans *E. coli*, on a vérifié qu'une concentration de 1000 UI/ml de nisine n'a pas affecté la cinétique normale de croissance, ni changé la perméabilité de la membrane cytoplasmatique au potassium. En considérant que la membrane extérieure est impliquée dans cette insensibilité des souches bactériennes de Gram négatif à la nisine, nous avons évalué son effet sur des cellules qui présentaient une membrane extérieure affectée par un traitement préalable avec EDTA, ou par une mutation en souche rugueuse ATCC 4157. Nous avons vérifié que l'addition d'EDTA à le souche sauvage, et plus intensément à le souche rugueuse, a inhibé la croissance et induit la lyse cellulaire.

Abstract

This study was carried out with the aim of studying the action of nisin over bacterial cells, having been evaluated the effect over the ultrastructure and physiology of different bacterial models, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*.

The effect of nisin has shown to depend of its concentration, bacterial strains, environmental PH, buffer and of the physiological state of the cells at the moment of its addition.

In studies of cellular viability, *B. cereus* and *E. faecium* were the strains that appeared to be more sensitive to a concentration of 25 UI/ml of nisin. The initial PH of TSB (7,3 or 5,0) did not influence significatively the death kinetics which was similar in both situations. The physiological state of the cells demonstrated to influence this parameter, having been noticed a greater sensitivity of the cells treated in an exponential growth phase, when compared to the ones treated in a stationary phase. Accompanying the kinetic study of the effect over the number of viable cells, one verified that with time, this number rises. In presence of this phenomenon one verifies, for *B. cereus*, the possibility of an adaptation of the cells to the presence of nisin, by progressive decrease of the wild strain sensitivity when isolated from cultures containing 100 UI/ml of the lantibiotic.

Ultrastructural studies have demonstrated a faster effect over the cytoplasmic membrane and a secondary effect, further in time, over the bacterial wall. However, optical microscopic studies, after Gram stain, reveal that, although this bacterial wall may seem complete, it is fragilized, due to its stain Gram negative. The cytoplasmic membrane revealed to be the primary target of action, with a premature change in the natural asymmetrical profile of Gram-positive bacteria.

This early change of the membrane profile into symmetric was accompanied by a fast change of the selective permeability of the cytoplasmic membrane. One verifies, through kinetics studies of potassium efflux, a quick and extensive leakage of this cation from treated bacterial cells. This direct effect on the cytoplasmic membrane was equally verified with protoplasts of the different strains, treated with 25 UI/ ml of nisin for five minutes, having been verified a similar sensitivity of all models. So, the cytoplasmic membrane of the different species has demonstrated a similar sensitivity to the effect of this lantibiotic.

As great part of the enzymatic activity of the bacterial cell is located in the cytoplasmatic membrane, we studied the effect of nisin in the respiratory activity of the bacterial cells and in the activity of succinic dehydrogenase of isolated membranes. The respiratory activity was rapid and drastically inhibited by nisin, being *B. cereus* the most sensitive species. Lower concentrations to those that cause death revealed to be powerful inhibitors of the respiratory activity of the bacteria. This phenomenon, together with the depletion of the cells in potassium, is probably involved in the alteration of the metabolism and in the inhibition of bacterial growth. A significant inhibitory effect over the enzymatic activity of the succinic dehydrogenase in different isolated bacterial membranes was not observed.

During the study of growth and death (number of viable cells and absorbancy), it was verified that the decrease of the CFU/ml number preceded a drastic fall in the optical density of the cultures, which can lead one to think that the cellular lysis occurs secondarily to death, in these bacterial strains. This phenomenon, verified through the treatment of cultures in exponential phase obtained in TSB PH initial (7,3), was not verified however when the culture was in a stationary phase or was obtained in TSB PH initial (5,0). The effect of nisin in the induction of the cellular lysis demonstrated being very dependent of the PH and of physiological state of the cells. The mechanism of bacterial inhibition of nisin is different for bacteria with a development at PH (5,0) or (7,3). The characteristics of the environment where the autolytic activity expressed itself demonstrated to equally influence the result. In the attempt to estimate the participation of the autolysins in this phenomenon, as a consequence of changes in the processes for its regulation, we have studied the effect of NBS as an inhibitor of its activity. This compound demonstrated inhibiting the expression of nisin-induced cell lysis, as well as the spontaneous autolysis verified for *B. cereus* cells suspended in buffer (PH 8,0).

It was verified that, in *E. coli*, a concentration of 1000 UI/ml of nisin did not affect the normal kinetic of growth, nor did it change the permeability of the cytoplasmatic membrane to potassium. Considering that the outer membrane is implicated in this insensibleness of the Gram-negative bacteria to nisin, we estimate its effect over the cells by presenting an outer membrane affected by previous treatment with EDTA, or by mutation in rugous ATCC 4157 strain. We verify that the addition of EDTA to the wild strain, and more intensily to the rugous strain, inhibited growth and led to cellular lysis.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....1

MATERIAL E MÉTODOS.....23

RESULTADOS.....35

A - *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecium*, *L. monocytogenes*.....36

1 - Efeito da nisina na morte celular e inibição do crescimento bacteriano.....37

1.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3.....38

1.1.1 - *B. cereus*.....38

1.1.2 - *B. subtilis*.....43

1.1.3 - *E. faecium*.....48

1.1.4 - *L. monocytogenes*.....53

1.2 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0.....58

1.2.1 - *B. cereus*.....58

1.2.2 - *B. subtilis*.....62

1.2.3 - *E. faecium*.....65

1.2.4 - *L. monocytogenes*.....69

1.3 - Culturas na fase estacionária em meio de TSB PH 7,3.....73

1.3.1 - *B. cereus*.....73

1.3.2 - *B. subtilis*.....74

1.3.3 - *E. faecium*.....75

1.3.4 - *L. monocytogenes*.....76

1.4 - Culturas das diferentes espécies bacterianas, em meio de TSB PH 7,3, na presença de nisina.....77

1.5 - Estudo espectrofotométrico do efeito da nisina sobre *B. cereus* sucessivamente isolado de culturas em TSB PH 7,3 adicionadas de 100 UI/ml de nisina.....79

2 - Variação do PH durante o crescimento das culturas.....81

3 - Estudo das alterações ultraestruturais induzidas pela nisina.....83

3.1 - *B. cereus*.....83

3.1.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3.....83

3.1.2 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0.....88

3.1.3 - Culturas estacionárias em meio de TSB PH 7,3.....88

3.2 - *B. subtilis*.....91

3.2.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3.....91

3.2.2 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0.....91

3.3 - *E. faecium*.....94

3.3.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3.....94

3.3.2 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0.....94

3.4 - *L. monocytogenes*.....98

3.4.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3.....98

3.4.2 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0.....98

3.5 - Efeito da nisina sobre protoplastos bacterianos.....101

4 - Alterações fisiológicas induzidas pela nisina.....104

4.1 - Alterações de permeabilidade da membrana citoplasmática.....104

4.2 - Inibição da actividade enzimática localizada na membrana citoplasmática.....108

4.2.1 - Inibição da actividade respiratória.....108

4.2.2 - Actividade da desidrogenase succínica em membranas isoladas.....113

5 - Efeito da N-bromossuccinimida na lise celular induzida pela nisina 115

5.1 - Estudo espectrofotométrico.....115

5.1.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3.....115

5.1.2 - Suspensões celulares em tampão Tris-HCl.....117

5.1.2.1 - Tampão Tris-HCl 0,05M; PH 8,0.....117

5.1.2.2 - Tampão Tris-HCl 0,05M; PH 5,0.....120

5.1.3 - Suspensões celulares em tampão de fosfatos.....122

5.1.3.1 - Tampão de fosfato de sódio 0,05M; PH 8,0.....122

5.1.3.2 - Tampão de fosfato de sódio 0,05M; PH 5,0.....123

5.2 - Estudo morfológico....126
5.2.1 - Suspensões celulares em tampão Tris-HCl....126
5.2.1.1 - Tampão Tris-HCl 0,05M; PH 8,0....126
5.2.1.2 - Tampão Tris-HCl 0,05M; PH 5,0....131
B - *E. coli*....135
1 - Efeito da nisina em culturas exponenciais de *E. coli*....136
1.1 - Inibição do crescimento bacteriano e avaliação do PH das culturas....136
1.2 - Alterações fisiológicas induzidas pela nisina....137
1.2.1 - Efluxo de potássio....137
1.2.2 - Actividade respiratória....138
2 - Efeito da nisina em culturas exponenciais de *E.coli,* tratadas com EDTA....139
3 - Efeito da nisina em culturas exponenciais de uma estirpe rugosa de *E. coli*....141
3.1 - Estudo espectrofotométrico....141
3.2 - Estudo de viabilidade....143
DISCUSSÃO....144
RESUMO E CONCLUSÕES....182
BIBLIOGRAFIA....189

INTRODUÇÃO

A utilização de alimentos fermentados faz parte da história do Homem há 6000 a 12000 anos. O objectivo foi desde então a obtenção, embora empírica, de métodos que permitissem controlar as fermentações, de modo a evitar a deterioração indesejável de produtos de origem animal ou vegetal e, ao mesmo tempo, favorecendo os microrganismos indispensáveis à obtenção dos produtos desejados. Conhecidas as bebidas fermentadas (como o vinho e a cerveja) e produtos lácteos fermentados (como o queijo e o iogurte), surgiram mais recentemente as fermentações aplicadas a carnes e a vegetais (Pederson, 1971). Na Europa, cerca de 25% da nossa dieta é constituída por alimentos fermentados, mesmo desenvolvidas que estão as técnicas de conservação como a refrigeração (Holzapfel e col., 1995).

Bactérias ácido-lácticas (BAL) foram usadas empiricamente pelo Homem, durante séculos, para a conservação mas, hoje é conhecido o papel importante de muitas destas BAL na produção dos alimentos fermentados e conhecido também o efeito de algumas delas na inibição de uma larga variedade de microrganismos responsáveis pela alteração dos alimentos (Ray e Daeschel, 1992; Stiles e Hastings, 1991). Assim, nas fermentações alimentares, a conversão de açúcares em ácidos orgânicos tem a finalidade de beneficiar as propriedades organolépticas do produto e promover a sua conservação.

A classificação mais recente do Manual Bergey's (1986) inclui nas BAL os géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. De uma grande variabilidade em termos de *habitat,* as BAL são frequentemente encontradas em produtos lácteos, vegetais, carnes e bebidas alcoólicas. Sendo consideradas como microrganismos da classe alimentar tornam-se promissoras, pelo facto de se considerarem seguras quando usados nas fermentações alimentares. As referências a infecções humanas cujos agentes etiológicos foram identificados como BAL são muito esporádicas, embora existentes (Aguirre e Collins, 1993).

A utilização de culturas *starter,* particularmente de BAL, contribui para controlar o desenvolvimento de microrganismos responsáveis pela alteração dos alimentos (evitando perdas económicas), eliminar ou impedir o desenvolvimento de agentes patogénicos (contribuindo para a saúde pública), aumentar o tempo de armazenamento dos produtos e favorecer as suas qualidades nutricionais e sensoriais.

As BAL são produtoras de uma larga variedade de factores antagónicos, resultantes do metabolismo, capazes de inibirem o crescimento de outros microrganismos: ácidos orgânicos, principalmente o láctico e o acético, resultantes da fermentação ácida dos açúcares, com a consequente descida de PH (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Russell, 1992); metabolitos do oxigénio como o peróxido de hidrogénio e radicais livres, produzidos em condições de aerobiose (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Piard e Desmazeaud, 1991); outros produtos finais do metabolismo dos carbohidratos (diacetilo, etanol e acetaldeído), embora em menor quantidade podem actuar em sinergismo com os outros factores (Lindgren e Dobrogosz, 1990). Para além das substâncias inibidoras descritas, muitas BAL segregam proteínas antimicrobianas designadas de bacteriocinas (Klaenhammer, 1988; Piard e Desmazeaud, 1992).

A maioria dos géneros de bactérias Gram positivo são produtoras de bacteriocinas. As bacteriocinas são pequenas proteínas bacterianas ou peptídeos, biologicamente activas, com propriedades bactericidas, habitualmente activas contra estirpes bacterianas taxonomicamente próximas do organismo produtor e para ele inactivas (Tagg e col., 1976). Esta designação de bacteriocina engloba uma classe muito heterogénea de antagonistas bacterianos, os quais variam consideravelmente no peso molecular, modo de acção, propriedades bioquímicas, espectro de actividade e nos determinantes genéticos (Klaenhammer, 1988; Tagg e col., 1976). As bacteriocinas, produzidas por bactérias Gram positivo, têm sido alvo de muita atenção pelo facto de apresentarem um espectro de actividade bastante alargado. Efectivamente, as colicinas, produzidas por bactérias Gram negativo, apresentam uma actividade limitada praticamente às estirpes relacionadas com a produtora enquanto que a maioria das produzidas por bactérias Gram positivo, de baixo peso molecular, exibem actividade contra outros géneros e espécies de bactérias Gram positivo (Tagg e col., 1976). Especial importância tem sido dada às bacteriocinas produzidas por BAL pertencentes aos géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (Klaenhammer, 1988; Klaenhammer, 1993; Stiles e Hastings, 1991).

Klaenhammer (1993), definiu quatro classes distintas nas bacteriocinas produzidas por BAL: Classe I. Lantibióticos; Classe II. Proteínas pequenas (< 10 KDa), relativamente estáveis ao calor, sem lantionina e membranoactivas; Classe III. Moléculas de grandes dimensões (> 30 KDa), termoláveis, incluindo muitas enzimas bacteriolíticas extracelulares; Classe IV.

Bacteriocinas complexas, contendo porções lipídicas ou açucaradas, em associação com a porção proteica e indispensáveis para a sua actividade biológica.

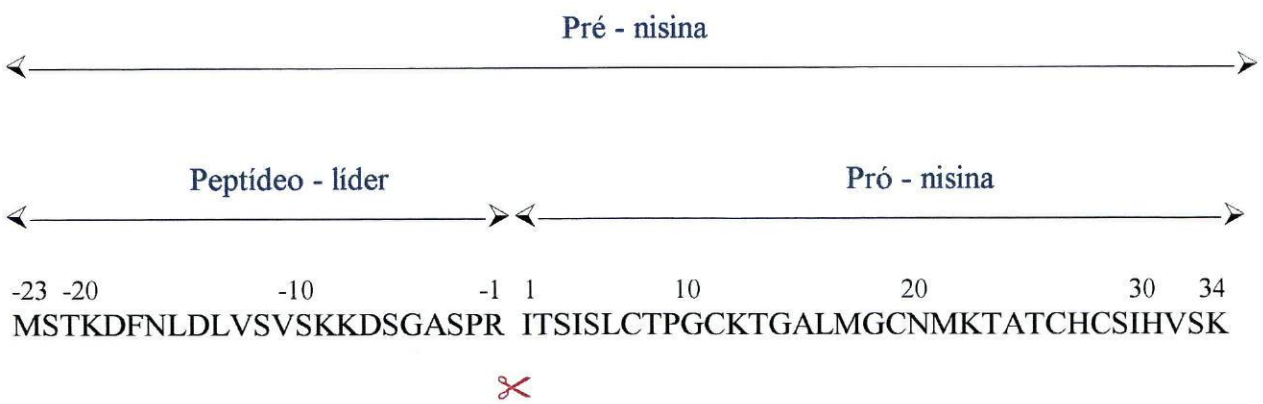
À classe I, dos lantibióticos, tem sido dado particular destaque. Os lantibióticos são definidos como pequenos peptídeos antibióticos, biologicamente activos, com actividade antimicrobiana e, que diferem de outras bacteriocinas pelo facto de apresentarem lantionina e outros aminoácidos não proteicos na sua estrutura (Jung, 1991b; Schnell e col., 1988). Jung (1991a), subdividiu os lantibióticos nos tipos A e B, de acordo com a sua estrutura em anel e o seu modo de acção. Os lantibióticos do tipo A são polipeptídeos anfifílicos, de peso molecular compreendido entre 2164 e 3488 Da, de forma em hélice alongada, catiónicos (2 a 7 cargas positivas) e que parecem formar poros na membrana citoplasmática por um processo dependente da sua voltagem. São exemplos a nisina, subtilina, epidermina, entre outros. O autor considera a mersacidina e a actagardina num subgrupo dentro do tipo A, como compostos anfifílicos e hidrofóbicos com 0 a -1 de carga, um peso molecular de 1825-1890 Da e apresentando uma acção de inibição da biossíntese da parede celular. Sahl (1994), classificou este subgrupo do tipo A como sendo do tipo C. Os lantibióticos do tipo B são polipeptídeos anfifílicos, quase todos neutros, apresentando uma forma globular e compacta, com um peso molecular de 1959 a 2041 Da e que actuam como inibidores da actividade enzimática. São exemplo a duramicina e a cinamicina.

Rogers e Whittier (1928), ao verificarem uma actividade antibiótica exercida por culturas de *Streptococcus*, deram início ao estudo de uma substância inibibidora, de natureza peptídica, com actividade do tipo bacteriocina, produzida por *Streptococcus lactis* presente na flora do leite e habitualmente usado na indústria de lacticínios. A designação de nisina para esta bacteriocina polipeptídica, produzida por diferentes estirpes de *Streptococcus lactis* (*Lactococcus lactis*), pertencentes ao grupo N de Lancefield, deve-se a Mattick e Hirsch (1944). A designação de nisina é aplicada a um conjunto de polipeptídeos (nisinas A, B, C, D, E), com idêntica composição em aminoácidos e com diferentes actividades biológicas (Berridge e col., 1952; Jarvis e Farr, 1971).

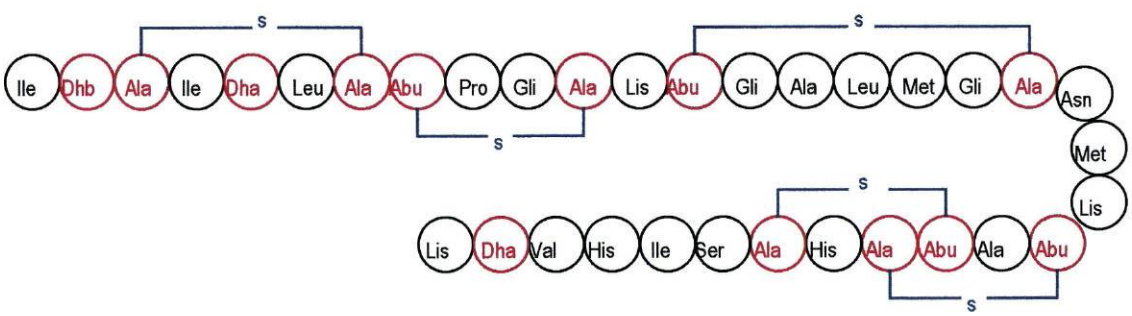
A nisina, uma bacteriocina produzida por BAL, pertencente ao grupo I dos lantibióticos e ao tipo A, descoberta há aproximadamente 60 anos, ainda não perdeu a actualidade pois tem sido

objecto de intenso estudo devido às suas potencialidades de utilização como bioconservante alimentar (Delves-Broughton, 1990; Jack e col., 1995).

Ao contrário de outros antibióticos peptídicos bacterianos (como a gramicidina e a bacitracina), produzidos por reacções multienzimáticas complexas (Kleinkauf e Von Döhren, 1990), a nisina é sintetizada por um processo ribossomal (Ingram, 1969; Ingram, 1970). Considerando que nenhum código genético normal codifica aminoácidos não proteicos, do tipo dos apresentados pela nisina, foi proposto que este lantibiótico fosse sintetizado como um precursor (pré-peptídeo), o qual seria enzimaticamente modificado (Hurst e Paterson, 1971; Ingram, 1969). Este precursor peptídeo, contendo resíduos de serina, treonina e cisteína, sofre duas reacções enzimáticas de modificação em 13 dos 34 aminoácidos: A- uma reacção de desidratação a partir dos aminoácidos hidroxilados específicos (serina e treonina), com a formação dos respectivos desidroaminoácidos (desidroalanina e desidrobutirina); B- estes aminoácidos α,β-insaturados podem reagir estereoespecificamente com grupos sulfidrilo vizinhos, das moléculas de cisteína, para formar uma ligação tioéter e dando origem à lantionina e β-metil-lantionina (Ingram, 1969; Jung, 1991b; Schnell e col., 1988). Assim, a nisina A tem origem num pré-peptídeo (pré-nisina), com 57 aminoácidos e dividido em duas regiões: o peptídeo líder, com 23 resíduos de aminoácidos, de natureza predominantemente acídica e uma região terminal amina, o qual se encontra ligado a uma pró-nisina, com 34 resíduos de aminoácidos, de natureza predominantemente básica e uma região terminal carboxilo (Jung, 1991b; Kaletta e Entian, 1989). A estrutura primária da pré-nisina foi assim esquematizada:



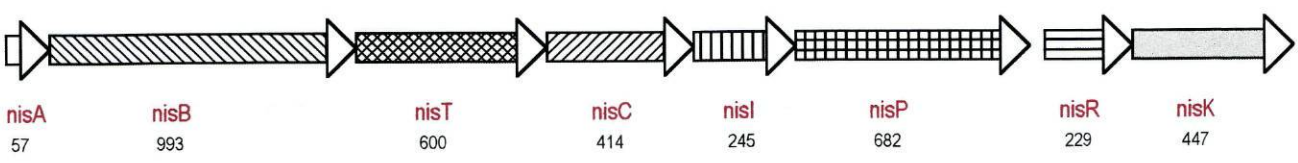
A pró-nisina sofreria então modificações enzimáticas, pós-tradução, com a formação dos aminoácidos raros nela contidos, precedendo esta reacção a separação do peptídeo líder (Bierbaum e Sahl, 1993; Dodd e col., 1990; Klaenhammer, 1993). Os precursores das bacteriocinas parecem não apresentar actividade biológica (Schnell e col., 1988). A separação do peptídeo líder, por quebra proteolítica, parece constituir o último passo na maturação da nisina, de forma a obter a molécula biologicamente activa, já que, o pré-peptídeo não é encontrado fora da célula e que a sequência N-terminal do peptídeo líder não está presente no peptídeo maduro (Van der Meer e col., 1993; Van der Meer e col., 1994). Este peptídeo líder, embora sem actividade biológica e não modificado, parece ter um papel fundamental durante as reacções de modificação do pró-peptídeo. Parecem ser suas competências, o direccionamento e estabilização da molécula pré-peptídica, o transporte eficiente, e a manutenção da molécula biologicamente inactiva dentro da célula (Jack e col., 1995; Jung, 1991a; Sahl e col., 1995; Schnell e col., 1988). Todo este processo complicado de biossíntese dá origem a um produto biologicamente activo, no exterior da célula produtora, cuja estrutura primária foi estudada e apresentada por Gross e Morell (1971). Esta estrutura foi posteriormente confirmada por outros autores (Liu e Hansen, 1990) e pode representar-se do seguinte modo:



A nisina A é assim um peptídeo contendo 34 resíduos de aminoácidos, dos quais 8 são raros na natureza: desidroalanina (×2), desidrobutirina (×1), e 5 estruturas internas em anel com ligação tioéter dando origem à lantionina (×1), e β-metil-lantionina (×4). Esta molécula apresenta um peso molecular de 3354 Da e um elevado teor em enxofre. Resultante do significado comercial da nisina, numerosos esforços foram feitos para estabelecer a sua estrutura tridimensional e os

mecanismos moleculares relacionados com a sua função biológica, pressupondo-se que as suas propriedades anfifílicas e a conformação da molécula estejam na base da despolarização de membranas energizadas e na formação de poros na membrana citoplasmática (Lian e col., 1991; Van de Ven e col., 1991).

Referimos já que a síntese da nisina ocorre ao nível dos ribossomas. O facto de a sua biossíntese ter surgido geneticamente associada ao metabolismo da sacarose e à imunidade da célula produtora, e a observação de que estas características eram co-transdutíveis e co-eliminadas por cura, levou a sugerir a localização dos determinantes genéticos em plasmídeos conjugativos (Gasson, 1984; Gonzalez e Kunka, 1985; Steele e Mckay, 1986; Tsai e Sandine, 1987). Contudo, a evidência física destes plasmídeos nunca foi obtida, ao contrário do que aconteceu para as colicinas e muitas outras bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivo (Jack e col., 1995). Estudos mais recentes indicam que a localização dos determinantes genéticos, responsáveis pela biossíntese da nisina e pela fermentação da sacarose, é cromossómica, e a identificação do gene estrutural que codifica para o precursor da nisina A (*nis* A) foi possível (Buchman e col., 1988; Dodd e col., 1990; Kaletta e Entian, 1989). Foi posteriormente observado que este gene estrutural é o primeiro de um conjunto de genes contidos num transposão conjugativo com 70 Kb (Dodd e col., 1991; Klaenhammer, 1993; Rauch e de Vos, 1992; Rauch e col., 1991) e que codificam múltiplos produtos indispensáveis à obtenção do produto final, no exterior da célula - a nisina. Sahl e col. (1995), representaram esquematicamente este conjunto de genes do seguinte modo:



As proteínas, codificadas por estes genes, são indispensáveis para: 1- as modificações enzimáticas pós-tradução e respectiva maturação da pré-nisina - NisB e NisC (Engelke e col., 1992); 2- a separação do peptídeo líder da molécula de pré-nisina modificada - NisP (Van der Meer e col., 1993); 3- a regulação da biossíntese da nisina - NisR e NisK (Engelke e col., 1994; Van der Meer e col., 1993); 4- o transporte da nisina para fora da célula - NisT (Engelke e col., 1992); 5- a

imunidade da estirpe produtora à nisina - NisI (Engelke e col., 1994; Klein e Entian, 1994; Kuipers e col., 1993). Recentemente foram referidos 3 novos genes, adjacentes ao gene *nis*K, codificando para as proteínas NisF, NisE e NisG, as quais se pensa igualmente envolvidas na imunidade à nisina, embora as bases moleculares para esta resistência específica da célula produtora não sejam completamente conhecidas (Siegers e Entian, 1995).

A nisina ocorre em dois variantes naturais (A e Z), codificadas pelos genes estruturais *nis*A e *nis*Z, respectivamente (de Vos e col., 1993; Graeffe e col., 1991; Kuipers e col., 1991). A actividade biológica e a especificidade hospedeira foi semelhante para as duas variantes, as quais diferem no aminoácido da posição 27 (His / Asp) (Mulders e col., 1991). As limitações de aplicação da nisina A, impostas pelas suas propriedades físicas e químicas são, particularmente, a sua baixa solubilidade e estabilidade a valores de PH neutro e superiores (Hurst, 1981). A utilização de variantes com propriedades adaptadas aos fins desejados, como a nisina Z, apresentando melhor solubilidade e estabilidade para estes valores de PH, pode obviar essa desvantagem (Rollema e col., 1995). A engenharia genética aplicada à obtenção de mutantes, por mutagénese direccionada para os genes estruturais, pode permitir obter produtos com espectro de aplicação mais alargado, ou seja, maior actividade biológica e melhores propriedades funcionais (Kuipers e col., 1991; Kuipers e col., 1992).

O conhecimento da biossíntese dos lantibióticos, da sua regulação e das bases genéticas nela implicada, têm permitido a obtenção de polipeptídeos similares, mas modificados, os quais poderão conduzir a uma nova evolução na aplicação destes produtos.

A propriedade mais importante da nisina é a sua actividade antibacteriana. O espectro de acção alargado, quando comparado com outras bacteriocinas como as colicinas é, no entanto, limitado às bactérias Gram positivo. Mostraram-se sensíveis à nisina espécies dos géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Actinomyces*, *Clostridium* e *Mycobacterium tuberculosis*, se bem que com diferentes sensibilidades entre os géneros e as espécies e variáveis com as condições utilizadas (Hurst, 1981). A insensibilidade foi verificada para bactérias Gram negativo intactas e para fungos (Hurst, 1981), embora, a *Neisseria* tenha sido descrita como susceptível (Mattick e Hirsch, 1947). A actividade da nisina sobre os endosporos de *Bacillus* e *Clostridium* foi verificada e particular sensibilidade foi

registada em esporos tratados com doses sub-letais de calor (Campbell e Sniff, 1959; Campbell e col., 1959; Mattick e Hirsch, 1947; O'Brien e col., 1956). Por outro lado, o tratamento pelo calor em esporos tratados com nisina também se mostrou mais eficaz (Hurst, 1981). Assim, a utilização da nisina como coadjuvante do tratamento térmico pode tornar o processo da sua destruição mais eficaz e menos drástico, beneficiando a sua utilização (Hurst, 1981; Ray e Daeschel, 1992). O efeito da nisina nos produtos contaminados com endosporos destas bactérias será o de impedir o desenvolvimento de células vegetativas, após a germinação dos esporos (Campbell e Sniff, 1959; Scott e Taylor, 1981).

A utilização de *Lactococcus lactis* no fabrico de queijo não é recente e foi referida por Hirsch e col. (1951), mantendo-se o seu uso para o fabrico de queijos curados. Sendo a nisina produzida por microrganismos considerados alimentares, poderá ter um potencial uso como conservante alimentar natural e, de facto, tem uma extensa aplicação como aditivo no fabrico de queijo de barrar e em comida enlatada. São vários os aspectos que a tornam atractiva para aplicação na indústria alimentar: não ser usada na terapêutica medicamentosa, na promoção do crescimento animal, não apresentar toxicidade e não induzir o uso abusivo por não permite a eliminação de bactérias Gram negativo por vezes associadas. Para além destas, outras características bioquímicas constituem vantagens e desvantagens na sua utilização. Como peptídeo que é, qualquer resíduo que permaneça no alimento é digerido, já que, apresenta sensibilidade para enzimas proteolíticas como a quimiotripsina pancreática, não entra na corrente sanguínea e não altera a ecologia do tracto digestivo, até porque não é activa contra os Gram negativos aí presentes, não causando os efeitos descritos para os antibióticos comuns (Piard e Desmazeaud, 1992). No entanto, a nisina também pode ser inactivada por proteases presentes nos alimentos ou por nisinases produzidas por algumas espécies bacterianas, como *Bacillus* (Jarvis, 1967; Jarvis e Farr, 1971). A nisina é, no entanto, resistente a tratamentos com pronase, à digestão pela tripsina e calor em meio ácido. A termorresistência (10 min/100^{0}C), como na pasteurização, é um factor favorável embora dependente do PH (Hurst, 1981). Mas, a estabilidade da nisina nos alimentos de armazenamento prolongado é limitada, particularmente a elevadas temperaturas e para determinados produtos alimentares (Delves-Broughton, 1990; Rayman e col., 1981). A natureza dos alimentos pode condicionar a actividade da nisina, protegendo ou inibindo a sua acção.

Moléculas proteicas presentes no soro e no leite parecem proteger o efeito da nisina e daí que a actividade possa ser superior no alimento, em relação a um tampão (Hurst, 1981; Jack e col., 1995; Schillinger e col., 1991). A presença de iões di- e trivalentes nos alimentos pode reduzir a eficácia da nisina (Ray e Daeschel, 1992). Uma das grandes limitações imposta pela nisina A é o PH dos alimentos aos quais é aplicada. Apresentando uma estabilidade e solubilidade máximas a baixo PH (2,0), as quais decrescem significativamente com a sua elevação, e apresentando uma actividade antibacteriana que igualmente é mais acentuada a PH mais baixo (5,5), tem a sua utilização condicionada a alimentos ácidos (PH <5,0) (Hurst, 1981). No entanto, este efeito do PH é dependente da força iónica do meio (Liu e Hansen, 1990; Rollema e col., 1995). Esta desvantagem poderá ser resolvida com a produção de variantes naturais ou mutagénicos, activos, estáveis e solúveis a PH neutro (Piard e Desmazeaud, 1992; Rollema e col., 1995).

A adição directa de nisina como aditivo, ou o uso de culturas de BAL produtoras de nisina e associadas aos alimentos poderão constituir uma forma de conservar diversos produtos, para além dos lácteos e bebidas. Este efeito de conservação verifica-se pela inibição de microrganismos responsáveis pelas suas alterações e de bactérias potencialmente patogénicas eventualmente presentes, particularmente *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Listeria* (Daeschel, 1989; Delves-Broughton, 1990; Harris e col., 1992; Ogden e Waites, 1986; Schillinger e col., 1991). De facto, trata-se da única bacteriocina aprovada para tal fim, se bem que novas prespectivas se aguardem para outras bacteriocinas (Spelhaug e Harlander, 1989; Vandenbergh, 1993).

A nisina foi aprovada para uso como conservante alimentar pelos Britânicos (Anonymous, 1959), tendo aceitação Internacional em 1969 (W.H.O., 1969). Rejeitada que foi a sua utilização pela FDA (Food Drug Administration), apenas em 1988 os E.U. lhe concederam o estatuto de GRAS (Generally Regarded As Safe), permitindo a sua aplicação em queijos de barrar (FDA/Federal Register, 1988). É hoje utilizada em numerosos alimentos e em 46 países, embora com diferentes restrições (Delves-Broughton, 1990; Sahl e col., 1995). A aplicação da nisina tem sido estudada em conjunto com outros tratamentos conservantes (p.ex.calor e nitratos). O objectivo será diminuir os efeitos indesejáveis desses tratamentos, pela possibilidade de redução da severidade desses processos, ou mesmo a sua substituição, sem com isso comprometer a saúde pública, a

qualidade do produto e a qualidade de conservação, e mesmo aumentar a qualidade dos alimentos fermentados (Rayman e col., 1981; Sahl e col., 1995). O tratamento com nitratos, especialmente aplicados contra *Clostridium* em alimentos enlatados, queijos e carnes, tem sido desencorajado. O conhecimento de que os nitritos, formados por redução bacteriana a partir dos nitratos ou directamente adicionados, podem ser potencialmente tóxicos devido ao poder carcinogénico descrito para as N-nitrosaminas, formadas por reacções que ocorrem naturalmente nos alimentos entre os nitritos e aminas secundárias ou terceárias, são disso o motivo (Molitor e Sahl, 1991). Os nitritos, quando ingeridos ou reduzidos dos nitratos *in vivo*, podem ainda interactuar com a hemoglobina formando a metamoglobina, reduzindo a capacidade de transportar o oxigénio (Jones, 1993, citado por Oliveira e col., 1995). A sua substituição pela nisina ou a associação desta com baixas doses de nitratos parece poder resolver o problema do *Clostridium* e de outros microrganismos indesejáveis (Daeschel e col., 1991; Lipinska, 1977; Rayman e col., 1981). Para além da substituição ou associação com tratamentos como o calor ou os nitratos, tem sido avaliada a substituição de outros conservantes tradicionais como o ácido benzóico e sórbico, a salmoura (Einarsson e Lauzon, 1995), o dióxido de enxofre na produção de vinhos (Radler, 1990a; 1990b). A associação da nisina com métodos físicos, não térmicos, como *Ultrahigh Hydrostatic Pressure* (UHP) e *Pulsed Electric Field* (PEF), os quais apresentam eficácia antimicrobiana, foi igualmente estudada (Knorr, 1993; Mertens e Knorr, 1992). Kalchayanand e col. (1994), mostraram que os métodos físicos referidos provocam uma alteração sub-letal nas células bacterianas o que aumenta a actividade antibacteriana quando em associação com bacteriocinas, podendo ser usados, em vez do calor, para aumentar a segurança e o armazenamento dos produtos. Estes mesmos métodos e juntamente com um agente quelante, como o EDTA, têm sido ensaiados para aplicação no controlo de bactérias Gram negativo (Kordel e Sahl, 1986; Kordel e col., 1989; Schved e col., 1994; Stevens e col., 1991).

A nisina tem sido aplicada como aditivo, ou usando culturas *starter* produtoras, a diversos produtos e com diversas finalidades. Uma nova prespectiva é a da utilização de produtos alimentares nos quais ocorreu naturalmente a produção de nisina, como ingredientes em outros alimentos, de forma a controlar os microrganismos indesejáveis (Zottola e col., 1994).

Os alimentos mais frequentemente ensaiados para a utilização destes processos de conservação são: A- Queijos processados, diminuindo a concentração de outros agentes na inibição de *Clostridium*; em queijos naturalmente produzidos (Lipinska, 1977; Somers e Taylor, 1987); outros produtos lácteos. B- Vegetais e frutos enlatados e fermentados permitindo um tratamento moderado pelo calor e a obtenção de produtos nutricionalmente mais ricos (vitaminas), e apresentando melhores características sensoriais (Harris e col., 1992). C- Carnes e derivados, permitindo reduzir o nível dos nitratos (Rayman e col., 1981). Os enchidos são particularmente sensíveis às alterações (Hurst, 1981). É, no entanto, de referir que várias limitações são impostas à sua utilização nestes produtos. As carnes são frequentemente alteradas por bactérias Gram negativo, para as quais a nisina é inactiva, não devendo por isso ser usada como um processo de conservação isolado (Chung e col., 1989). Estes produtos apresentam um valor de PH habitualmente superior ao desejado para a acção da nisina (Rayman e col., 1983). A nisina mostra baixa estabilidade nestes produtos, particularmente se à temperatura ambiente, talvez devido à sua associação com as partículas da carne na sua superfície, o que leva a uma distribuição irregular. Talvez tenha sido este fenómeno o responsável por resultados controversos, considerando alguns autores que a sua aplicação não é muito eficiente (Taylor e Somers, 1985). A utilização de produtos cárneos prontos-a-comer, crús ou cozinhados, poderá trazer problemas de saúde pública. A refrigeração e a branda cozedura poderão não ser suficientes para eliminar bactérias patogénicas resistentes ao calor e à refrigeração, como a *Listeria monocytogenes*, e que por vezes se encontram a eles associada (Farber e Daley, 1994; Glass e Doyle, 1989; Johnson e col., 1990). O uso da nisina poderá ser considerado útil nestas situações e a aplicação de culturas de BAL produtoras de nisina também tem sido ensaiada (Leisner e col., 1995; Stiles e Hastings, 1991). D- Em peixe fresco, evitando as quantidades letais de toxinas produzidas por *Clostridium botulinum* em peixe contaminado, principalmente quando não é respeitada a temperatura de conservação (Einarsson e Lauzon, 1995). A produção de toxinas antecede a evidência organoléptica de danificação do alimento, daí decorrendo maior perigo de intoxicação. E- Nas bebidas alcoólicas. Na indústria cervejeira previne alterações como o cheiro, acidez e turvação, provocadas pelo diacetilo e butanodiol, resultantes do desenvolvimento de BAL indesejáveis (*Lactobacillus* e *Pediococcus*), sem que ocorram perdas de qualidade para as leveduras

fermentativas (Ogden, 1987; Ogden e Waites, 1986; Ogden e col., 1988). Na produção de vinhos pode substituir ou reduzir o dióxido de enxofre. Este aditivo químico, eficaz e permitido, é usado com a finalidade de inibir BAL responsáveis por fermentações malolácticas indesejáveis, principalmente em vinhos brancos (Cortês e col., 1991; Mendes-Faia e Radler, 1990; Radler, 1990a e 1990b). Uma vez que a fermentação maloláctica é indispensável à produção do vinho, a BAL por ela responsável terá que ser obrigatoriamente resistente à acção da nisina. Por este motivo, tem sido ensaiada a utilização de mutantes de *Leuconostoc oenos* resistentes à nisina (Daeschel e col., 1991).

Mesmo após a introdução de tecnologias modernas na indústria alimentar e dos conceitos de segurança e higiene exigidos, o facto é que o número de casos de doenças com origem alimentar e intoxicações têm vindo a aumentar. Uma das razões que parece justificar este fenómeno é a alteração dos hábitos alimentares. De facto, a popularidade no consumo de alimentos prontos-a-comer não cozinhados ou sujeitos a branda cozedura, a utilização de micro-ondas, embalagens sob vácuo, baixo teor de sal e, particularmente, a linha de alimentos minimamente processados e sujeitos a refrigeração (Farber e Peterkin, 1991; Lechowich, 1988), podem contribuir para este fenómeno de explosão de doenças com origem alimentar. Em contrapartida, os consumidores conscenciosos e preocupados com a sua saúde começam a preferir alimentos minimamente processados, com baixo teor de açúcar e gordura e isentos de conservantes químicos (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; Notermans e col., 1990). Esta tendência, em reduzir total ou parcialmente o uso de aditivos químicos, tem conduzido à procura de novos métodos que permitam a estabilidade microbiológica de alimentos e bebidas. A adição directa de bacteriocinas, o uso de culturas *starter* bacteriocinogénicas, o desenvolvimento de culturas *starter* manipuladas geneticamente e as bacteriocinas por elas produzidas constituem potenciais alternativas para aumentar a qualidade e a segurança dos alimentos, conservando as suas características organolépticas como a textura, o aroma e o sabor. A utilização de culturas *starter* comerciais seleccionadas, nas quais foi introduzida a informação genética para a produção de nisina e para a imunidade, foi ensaiada na indústria de lacticínios Alemã (Hugenholtz e de Veer, 1991; Rauch e de Vos, 1992). A indústria alimentar, e particularmente a de lacticínios, representam, de facto, o

mais alto potencial de aplicação dos lantibióticos, quer usados isoladamente quer em associação com outros processos físicos ou químicos.

Sendo muitas das mastites de bovinos provocadas por patogénicos Gram positivos, incluindo *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, tem sido proposta a utilização da nisina como desinfectante na sua prevenção (Broadbent e col., 1989; Sahl e col., 1995). O uso da nisina, não constituindo uma ameaça para a saúde dos consumidores, poderá evitar os custos económicos de renúncia ao leite por utilização de tratamentos antibióticos clássicos (Morse e col., 1987), fornecendo uma alternativa.

A aplicação de bacteriocinas tem sido tentada noutras áreas, nomeadamente a terâpeutica e a cosmética (Jack e col., 1995; Molitor e Sahl, 1991): em infecções por *Helicobacter pylori*; no tratamento do acne, e em desodorizantes e cosméticos (epidermina); no tratamento de infecções sistémicas por *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes e por *Enterococcus* vancomicina resistentes (mersacidina). A aplicação da nisina nestas áreas é limitada a pomadas cosméticas. Esta limitação resulta de várias características inerentes à sua molécula e à sua aplicação: por via oral ela é degradada no intestino e por via injectável lisa os eritrócitos (Gross e Morell, 1971); o PH dos líquidos orgânicos, próximo da neutralidade, não é favorável à sua actividade e estabilidade; a sua composição proteica poderá induzir o organismo à produção de anticorpos que neutralizem a sua acção; possíveis mutações com o aparecimento de estirpes resistentes (Klaenhammer, 1988); incompatibilidade com o seu uso como aditivo alimentar. Uma aplicação proposta é a da utilização como um agente inibidor em meios selectivos, permitindo isolar bactérias Gram negativo (Molitor e Sahl, 1991).

O estudo do antagonismo microbiano no combate à infecção foi um pouco posto de parte com o aparecimento da era antibiótica mas, o seu interesse volta a instalar-se em consequência dos problemas resultantes do uso indescriminado de antibióticos e o consequente aumento das resistências. Assim, ressurge o interesse na implantação de uma microflora indígena de estirpes bacterianas produtoras de bacteriocinas, de baixa virulência, que sejam potencialmente capazes de interferir com a colonização e a infecção por estirpes mais patogénicas. Esta área, juntamente com o estudo do papel das bacteriocinas na dinâmica de vários ecossistemas bacterianos *in vivo*,

constituem um motivo de interesse para o estudo destas substâncias, dos seus mecanismos de actuação, e espectros de actividade (Jack e col., 1995; Sahl e col., 1995).

Em relação à nisina, muita atenção lhe tem sido concedida e, muito é já conhecido. Mas, considerando a sua vasta utilização e potencialidades, qualquer conhecimento adicional pode ser importante para uma melhor compreensão e para aplicação ao estudo de outros lantibióticos de idênticas características.

E, porque o conhecimento total é praticamente inatingível e ninguém é detentor de toda a verdade e saber, realizamos este trabalho com o objectivo de ajudar a elucidar o mecanismo de acção desta substância. O trabalho foi realizado usando como modelos experimentais estirpes de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* e *Escherichia coli*, permitindo assim uma comparação dos respectivos comportamentos em presença da nisina, para as mesmas condições de ensaio.



A escolha destas estirpes bacterianas resultou da elevada importância que lhes tem sido concedida nas doenças com origem alimentar e nas intoxicações alimentares, estando muitas vezes associadas a surtos ou mesmo a epidemias.

A maioria das espécies bacterianas consideradas como patogénicas com origem alimentar são controladas através da pasteurização, refrigeração e/ou por adição de agentes antimicrobianos. A ineficácia de processos comuns como a pasteurização e a refrigeração, pelo menos em aplicação isolada, facilmente justifica a dificuldade da indústria alimentar no controlo de estirpes bacterianas de difícil erradicação do alimento e de crescimento possível sob refrigeração, ou da produção de toxinas, como *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Escherichia coli*.

Listeria

L. monocytogenes é um organismo ubíquo, com um vastíssimo reservatório ambiental na natureza, sendo facilmente transportado ao Homem e animais (Brackett, 1988; Lovett e Twedt, 1988).

Embora as vias de transmissão da listeriose possam ser várias, evidências microbiológicas e epidemiológicas indicam que a principal é a do consumo de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* e que tem sido associada com a ocorrência de casos esporádicos ou mesmo de surtos epidémicos (Farber e Peterkin, 1991; Fleming e col., 1985; Hof e col., 1994; Kerr e col., 1993; Marth, 1988; McLauchlin e Low, 1994).

Praticamente todos os casos de listeriose foram devidos à *L. monocytogenes*, embora *L. seeligeri* e *L. ivanovii* tenham sido implicadas (Lovett e Twedt, 1988).

A listeriose tem constituindo nos últimos anos um problema emergente para a indústria alimentar, do ponto de vista económico, e para os clínicos, do ponto de vista de saúde pública.

Embora considerando que se trate de uma doença com origem alimentar menos comum, exibe uma elevada taxa de mortalidade, (Brackett, 1988; Hurst, 1981; Kerr e col., 1993). Hof e col. (1994), referem que 30% dos hospedeiros são portadores saudáveis, desenvolvendo-se a listeriose, nos adultos saudáveis, habitualmente numa fase entérica, podendo ser assintomática. No entanto, a listeriose é ameaçadora para as mulheres grávidas, recém-nascidos, crianças, idosos, alcoólicos e adultos imunodeprimidos, os quais parecem constituir factores que aumentam a susceptibilidade à infecção (Farber e Peterkin, 1991; Griffiths, 1989; Lovett e Twedt, 1988; Marth, 1988).

A virulência da *L. monocytogenes* depende da sua capacidade de invadir e replicar dentro do citoplasma de células fagocíticas, após a penetração (Portnoy e col., 1992). Produtora de listeriolisina O, uma hemolisina responsável pela hemólise de tipo β em gelose sangue, parece ser este o factor de virulência associado com as estirpes de *L. monocytogenes* patogénicas (Kuhn e col., 1988; Portnoy e col., 1988). A superóxidodismutase e a catalase, produzidas por esta estirpe bacteriana aeróbia ou anaeróbia facultativa, poderão estar também implicadas na virulência desta estirpe (Vasconcelos e Deneer, 1994; Welch, 1987).

De forma a evitar a infecção terá que ser evitada a contaminação. Para além da distribuição ubíqua, os vários problemas da indústria alimentar no controlo deste patogénico têm a ver com as características biológicas inerentes a esta espécie bacteriana, responsáveis pela sua elevada resistência, sobrevivência e crescimento durante o processamento e o armazenamento dos produtos (Farber e Peterkin, 1991; Harris e col., 1991). São considerados como principais obstáculos ao seu controlo, referidos por diversos autores (Conner e col., 1986; Doyle, 1988a; Farber, 1989; Farber e Peterkin, 1991; Farber e col., 1989a; Griffiths, 1989; Harris e col., 1991; Kerr e col., 1993; Lawrence e Gilmour, 1994; Mafu e col., 1991; McClure e col., 1991; Seeliger e Jones, 1986; Varnam e Evans, 1991): 1- o facto de se tratar de uma estirpe psicrófita, crescendo a temperaturas de refrigeração; 2- o possível crescimento em alimentos pasteurizados como o leite, podendo ocorrer por contaminação pós-pasteurização; 3- o desenvolvimento para baixos valores de PH (4,5-9,0), embora estes valores se apresentem variáveis com os autores, a temperatura, a concentração em NaCl e com a natureza do acidulante utilizado; 4- a elevada resistência a concentrações de NaCl superiores a 10%; 5- os nitratos apenas se mostraram eficazes em conjunto com o NaCl, PH 5,5 e a temperatura de 5°C; 6- o bom desenvolvimento em atmosferas com 5 a 10% de CO_2 e daí o possível desenvolvimento em alimentos acondicionados sob vácuo; 7- a elevada capacidade de aderência a equipamentos e áreas de preparação de alimentos, fabris ou domésticas, causando uma contaminação pós-pasteurização; 8- a formação de biofilmes; 9- a resistência à higienização.

De difícil erradicação das matérias primas e dos produtos acabados, torna-se um problema iminente para a saúde pública, sendo os alimentos mais perigosos os produtos prontos-a-comer, que após a sua chegada ao consumidor apenas são expostos à refrigeração, ou submetidos a branda cozedura, antes do consumo. Os produtos alimentares mais frequentemente implicados nos surtos de listeriose são: 1- os queijos, com incidência mais elevada em queijos de pasta mole (Farber e Peterkin, 1991; Rodrigues, 1994); 2- leite crú, por contaminação fecal, ou pós-pasteurização, e alguns tipos de produtos lácteos (Doyle e col., 1987; Farber e col., 1988; Griffiths, 1989; Hayes e col., 1986); 3- carne crúa, aves domésticas e produtos cárneos derivados (Farber e Daley, 1994; Glass e Doyle, 1989; Lawrence e Gilmour, 1994; Qvist e col., 1994), particularmente os produtos prontos-a-comer crús ou cozinhados (Farber e col., 1989b; Johnson

e col., 1990); 4- peixes frescos, congelados e fumados, caranguejos, mariscos e produtos derivados, particularmente em prontos-a-comer (Dilton e Patel, 1992; Embarek, 1994), 5- vegetais, particularmente crús (Heisick e col., 1989; Schlech e col., 1983).

Farber (1993), refere que nunca será possível eliminar a *L. monocytogenes* dos alimentos, mesmo seguindo todas as práticas de bom fabrico, e como não está calculado o mínimo de elementos celulares necessários para obter listeriose Humana (Farber e Peterkin, 1991), torna-se importante reduzir a sua incidência nos alimentos, com a ajuda de substâncias inibibidoras a eles aplicadas. A eficácia da nisina A, contra *L. monocytogenes,* foi estudada (Benkerroum e Sandine, 1988; Bruno e col., 1992; Carminati e col., 1989; Harris e col., 1989; Harris e col., 1991; Lewus e col., 1991; Spelhaug e Harlander, 1989), tendo igualmente sido avaliada a eficácia da nisina Z (Abee e col., 1994; Hugenholtz e de Veer, 1991). Contudo, têm surgido resultados conflituosos mostrando uma resistência à nisina ou uma inibição nas primeiras horas e um recrescimento posterior (Harris e col., 1991; Somers e Taylor, 1987). O tratamento de superfícies e equipamentos com nisina, a qual adsorve e parece capaz de manter a sua actividade, poderá constituir uma possibilidade para resolver o problema das contaminações durante o processamento (Bower e col., 1995; Daeschel e col., 1992).

Bacillus

A distribuição ubíqua no ambiente e a contaminação de superfícies de equipamentos da linha de produção, áreas de manuseamento de produtos alimentares e materiais de embalagem, quer através de células vegetativas quer particularmente de esporos, como resultado das suas características de resistência em condições adversas, transformam estas espécies bacterianas em importantes contaminantes alimentares de uma larga variedade de produtos (Kramer e Gilbert, 1989; Varnam e Evans, 1991).

A maioria das espécies do género *Bacillus* têm, aparentemente, um baixo potencial patogénico e são raramente associadas com doenças humanas ou de animais inferiores, pelo menos do ponto de vista epidemiológico (Ahmed e col., 1983; Wong e col., 1988). *B. cereus e B. subtilis* responsáveis pela alteração de alimentos, particularmente os lácteos (*B. cereus*) e os ricos em amido e proteínas (*B. subtilis*), pela produção de amidases e proteases, podem estar na base de

intoxicações de origem alimentar com a possível ocorrência de surtos (Kramer e Gilbert, 1989; Turnbull e col., 1979). O aumento no número de referências a estas situações levaram Andersson e col. (1995) a considerarem o *B. cereus* como "um velho amigo mas um novo inimigo". Sintomas eméticos e diarreicos são os que mais frequentemente ocorrem (Johnson, 1984; Kramer e Gilbert, 1989; Varnam e Evans, 1991) e estão aparentemente associados à produção de toxinas (emética e enterotoxina) (Granum, 1994; Melling e Capel, 1978; Melling e col., 1976). É possível que outras toxinas e enzimas estejam implicadas (Granum, 1994; Johnson, 1984; Kramer e Gilbert, 1989), mas o estabelecimento de uma relação directa entre estirpes toxígenas, responsáveis pela infecção ou pela intoxicação alimentar, e os sintomas nem sempre foi possível. Os grupos de risco não estão determinados mas, a incidência é superior em jovens, velhos, debilitados e consumidores frequentes de cozinha Chinesa (Varnam e Evans, 1991).

Considerando que a doença só ocorre quando um determinado número de microrganismos atinge o organismo, a legislação alimentar de muitos países limitou o número de células de *B. cereus* presentes nos alimentos, exigindo a sua monitorização e controlo nas matérias primas e nos produtos acabados, de modo a proteger a saúde pública (Gilbert e Kramer, 1986; Johnson, 1984).

Dos alimentos mais frequentemente relacionados com estes surtos de intoxicação alimentar destacam-se os pratos Orientais à base de arroz, cereais, condimentos, molhos, pratos de carne mal cozinhados, enchidos, vegetais, cremes pasteurizados, bolos, produtos lácteos desidratados, sobremesas, iogurtes, natas, alimentos infantis reconstituidos, leite e leite pasteurizado (Ahmed e col., 1983; Becker e col., 1994; Gilbert e Kramer, 1986; Kramer e Gilbert, 1989; Varnam e Evans, 1991; Wong e col., 1988). Embora as novas práticas de ordenha, armazenamento e processamento do leite, como a pasteurização e refrigeração, tenham diminuído a contaminação do leite crú, o isolamento de *B. cereus* continua a verificar-se nestes produtos e seus derivados, mesmo pasteurizados pelo calor, e a constituir um problema para a indústria dos lacticínios, exigindo o seu controlo.

De modo a evitar as doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados é necessário usar práticas de tratamento adequadas ao alimento e ao microrganismo em questão e ensaios

laboratoriais de pesquisa e de quantificação não apenas das células vegetativas e seus esporos como de enterotoxinas (Andersson e col., 1995; Beecher e Wong, 1994; Granum e col., 1993).

As bactérias produtoras de esporos constituem um problema especial para a indústria alimentar, sendo de difícil erradicação dos produtos alimentares. Os processos de tratamento mais descritos baseiam-se nos métodos físicos, químicos e biológicos, habitualmente utilizados para a conservação alimentar, devendo ser eficazes contra o crescimento vegetativo e a germinação dos esporos. 1- A temperatura. O facto de os esporos possuirem a capacidade de sobrevivência à pasteurização e à cozedura e a possibilidade da sua germinação ou da existência de estirpes psicrófitas em alimentos conservados a 6-8^{0}C (Christiansson e col., 1989; Dufrenne e col., 1995; Granum e col., 1993; Van Netten e col., 1990), causam problemas de conservação destes produtos, pela possibilidade de produção de toxinas durante o armazenamento. 2- A utilização de baixos valores de PH e de ácidos orgânicos não constituem solução. As células vegetativas são inibidas no seu crescimento para valores de PH próximo de 5,0 mas, os esporos só são inibidos para valores inferiores de PH e uma elevada concentração de ácidos orgânicos. O potencial de oxido-redução e o PH podem controlar a produção de toxinas, a qual é altamente dependente do meio de cultura e das condições de crescimento das bactérias (Christiansson e col., 1989). 3- Os agentes conservantes, químicos ou naturais, são vulgarmente utilizados no seu controlo, particularmente nitratos, NaCl, sorbatos de sódio e potássio e a nisina (Varnam e Evans, 1991). A aplicação da competição a partir de outros microrganismos tem sido estudada, tendo sido mostrado que altos níveis de outras bactérias inibem o crescimento de *B. cereus* (Steele e Miles, 1981). As BAL, especialmente os *Lactococcus*, são particularmente inibidoras em produtos lácteos e vegetais, inactivando microrganismo de origem alimentar ou outros patogénicos (Smith e Palumbo, 1981; Wong e Chen, 1988). A inibição envolve factores como ácidos gordos, ácidos orgânicos e PH, peróxido de hidrogénio, derivados intermediários do metabolismo e nisina (Tsuchido e col., 1987). A nisina, especialmente inibidora contra espécies de *Bacillus* (Hurst, 1981; Johnson, 1984), pode contribuir para a elevada actividade inibidora dos *Lactococcus*. Mas, atenção deve ser dada à capacidade que algumas estirpes de *B. cereus* apresentam de produzir uma nisinase capaz de a tornar ineficaz (Jarvis e Farr, 1971).

Enterococcus

Os *Enterococcus* podem ser considerados como uma parte essencial da microflora comensal do tracto intestinal, do Homem e animais, e das mucosas orais e vaginais, encontrando-se na natureza largamente associados a plantas. Tão vasta distribuição faz com que a sua presença seja comum em variados alimentos, de origem animal (queijos, peixes, crustáceos, carnes crúas e processadas) e vegetal, resultando quer de uma contaminação fecal quer associada ao fabrico por contaminação do equipamento (Knudtson e Hartman, 1993; Mundt, 1976; Mundt, 1986).

E. faecalis e *E. faecium* têm sido as espécies mais frequentemente implicadas na contaminação alimentar (Devriese e col., 1995; Wessels e col., 1990), sendo igualmente estas as espécies mais associadas com infecções enterocócicas, e particularmente o *E. faecalis* (Murray, 1990).

A possibilidade de crescimento em presença de elevados teores de NaCl e a temperaturas psicrófitas, a resistência a temperaturas de pasteurização pelo calor e a sua actividade proteolítica constituem problemas para a indústria alimentar, particularmente de lacticínios. Embora estas estirpes sejam monitorizadas em vários tipos de alimentos, principalmente como indicadores de qualidade da higiene de fabrico, sendo consideradas contaminantes de origem fecal, o facto de poderem constituir uma fonte de doença para o Homem e o isolamento de estirpes enterotoxígenas tornam o seu controlo importante (Batish e col., 1985; Varnam e Evans, 1991).

Não sendo considerados como agentes de doença com origem alimentar, os *Enterococcus* tem sido pouco estudados no que respeita à sua sensibilidade à nisina.

E. coli

Tratando-se do microrganismo aeróbio mais comum do tracto gastrointestinal, do homem e animais de sangue quente, a sua pesquisa e enumeração são dados importantes como indicadores da contaminação fecal de águas e alimentos, e do sucesso das "práticas de bom fabrico" na indústria alimentar (Varnam e Evans, 1991).

Considerado durante muito tempo como um agente não patogénico, pela via alimentar, tem recebido nos últimos anos uma atenção especial pela sua associação à propagação de epidemias através de produtos alimentares e água. As infecções a nível intestinal, cujos agentes etiológicos

foram identificados como estirpes específicas de *E. coli*, têm sido as mais descritas (Olsvik e col., 1991; Varnam e Evans, 1991).

Dos produtos alimentares que têm sido implicados nestes surtos poderemos referir como mais frequentes: carne de vaca crúa ou mal cozinhada (*hamburgers*), leite crú, manteigas, iogurtes, maioneses, vegetais e água. São grupos mais susceptíveis a este tipo de infecção os idosos e as crianças, sendo igualmente comum em infecções múltiplas (Monsur e col., 1989; Senerwa e col., 1989).

A estirpe de *E. coli* serogrupo O157:H7, foi reconhecida desde 1982 como o principal agente causal de uma infecção entérica aguda, diarreia de tipo hemorrágico. A sua patogenicidade encontra-se associada à produção de toxinas, e a sua transmissão e ligação a surtos epidémicos tem sido relacionada com a ingestão de uma larga variedade de alimentos contaminados, e em vários países (Carter e col., 1987; Doyle, 1991; McGowan e col., 1989; Miller e Kaspar, 1994).

O facto de certas estirpes de *E. coli* apresentarem uma certa resistência a determinadas condições usadas no tratamento, conservação e armazenamento dos produtos alimentares como as baixas e altas temperaturas, baixo PH por presença de acidulantes, tornam perigosa a sua presença em alimentos, permitindo o seu desenvolvimento (Abdul-Raouf e col., 1993; Doyle e Schoeni, 1987; Goodson e Rowbury, 1989). A elevada importância que a sua presença pode representar para a saúde pública levou à pesquisa de métodos cada vez mais sensíveis e mais rápidos que permitam detectar eficazmente a sua presença e determinar o teor de células e de toxinas nos alimentos (Notermans e col., 1991; Padhye e Doyle, 1991; Pyle e col., 1995; Tortorello e Stewart, 1994).

Para além da detecção, os métodos de tratamento e conservação de produtos alimentares, responsáveis pela eliminação dos organismos eventualmente existentes e pela prevenção do seu posterior desenvolvimento e produção das toxinas durante o armazenamento do produto, tornam-se da maior importância para uma segura utilização dos alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Meios de cultura

1.1 - Meios de cultura líquidos

1.1.1 - Meio de TSB, " Trypticase soja broth " (Difco): tripticase-17,0 g/l; soja-3,0 g/l; NaCl-5,0 g/l; fosfato dipotássico-2,5 g/l; glucose-2,5 g/l; água destilada q.b. para 1000 ml; PH 7,3.

1.1.2 - Meio de TSB, PH 5,0: o meio anterior foi preparado e acidificado com ácido tartárico antes da esterilização.

1.1.3 - Meio de "Nutrient broth" (Difco): extracto de carne-3,0 g/l; peptona-5,0 g/l; água destilada q.b. para 1000 ml; PH 6,8 ± 0,2.

1.1.4 - Meio de cultura usado para estudos de efluxo de potássio: triptona (Difco)-10,0 g/l; fosfato dipotássico-5,0 g/l; água destilada q.b. para 1000 ml.
O meio anterior, depois de esterilizado, foi suplementado com uma solução de glucose (Difco)-10,0 g/l, esterilizada por membrana filtrante. Este meio suplementado foi usado para o crescimento das estirpes de *E. faecium* e *L. monocytogenes*.

1.2 - Meios de cultura sólidos

1.2.1 - Meio de agar nutritivo (Oxoid): extracto de levedura-2,0 g/l; peptona-5,0 g/l; NaCl-5,0 g/l; agar-15,0 g/l; glucose-1,0 g/l; água destilada q.b. para 1000 ml; PH 7,4 ± 0,2.

Todos os meios de cultura usados foram esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos.

Quando se verificaram alterações de PH, em relação aos meios comercializados, este foi avaliado em Potenciómetro "Sargent-Welch PH meter 6000". As alterações de PH durante o crescimento bacteriano foram avaliadas por este mesmo método.

2 - Tampões

2.1 - Tampão de fosfato de sódio ou potássio: foram usadas para a sua preparação soluções equimolares de NaH_2PO_4 / KH_2PO_4 e de Na_2HPO_4 / K_2HPO_4.
Foi usada a fórmula: x ml Na_2HPO_4 / K_2HPO_4 + y ml NaH_2PO_4 / KH_2PO_4, sendo estes volumes dependentes do PH desejado.

2.2 - Tampão de Tris - HCl: para a sua preparação foram usados 50 ml de Tris 0,1M + x ml de HCl 0,1M + água destilada q.b. para 100 ml.

2.3 - Tampão cacodilato: foi preparada uma solução de cacodilato (TAAB) a 0,05M, contendo $CaCl_2$ 10 mM (Merck) e PH 7,0.

2.4 - Tampão RK^+: para 100 ml de tampão foram usados 52 ml de água, 20 ml de acetato de veronal, 28 ml de HCl 0,1N e 1,0 ml de $CaCl_2$ 1M. O PH foi ajustado para 6,0-6,2, usando acetato de veronal.

2.5 - Tampão de acetato de veronal: 29,4 g de barbital de sódio; 19,4 g de acetato de sódio trihidratado; 34,0 g de cloreto de sódio e água destilada q.b. para 1000 ml.

3 - Soluções

3.1 - Solução de nisina: o produto usado, "Nisin-Sigma", foi a 2,5%. Segundo A. Hurst (1981), 1 μg de nisina pura corresponde a 40 UI/ml. Foi usada uma solução mãe a 10000 UI/ml, preparada por dissolução do pó em água destilada, esterilizada por filtro Millipore de 0,45 μm de poro e usada nos 15 minutos que se seguiram à sua preparação. As suspensões preparadas foram, sempre que possível, conservadas sob refrigeração.

3.2 - Solução de Peptona a 0,1%: triptona (Difco)-1,0 g; 1000 ml de água destilada.

3.3 - Solução de GaFaCa: formaldeído (Merck) a 4% (p/v) em tampão de cacodilato 0,1M, PH 7,0 contendo 1,25% (p/v) de glutaraldeído (Merck) e 10 mM de $CaCl_2$.

3.4 - Solução de OsO_4 a 1% - preparada em tampão de RK^+.

4 - Espécies bacterianas utilizadas

Bacillus cereus (NCTC 7587)

Bacillus subtilis (Harburg 168)

Enterococcus faecium (ATCC 9790)

Listeria monocytogenes (EGD)

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC R4157 (rugosa).

5 - Obtenção das culturas

As estirpes mantidas em gelose inclinada a 4°C foram repicadas confirmando a sua pureza. Transferidas para meio de TSB foram incubadas "over night" sendo esta cultura usada como inóculo, na proporção de 1/100 de TSB (v/v). As culturas foram incubadas em banho rotativo (1092 GFL), a uma temperatura de 37°C, com uma velocidade de rotação constante de 120 r.p.m. durante um tempo que foi variável conforme as estirpes e o propósito da experiência.

Para conservação mais prolongada das estirpes foram obtidas culturas em fase exponencial, usando meio de TSB, divididas em aliquotas e congeladas a -70°C até utilização.

6 - Avaliação da concentração mínima inibitória

As técnicas usadas, descritas por Vaz Pato (1989), foram a da diluição em meio sólido/agar e da diluição em meio líquido.

7 - Avaliação do crescimento, inibição e morte das bactérias

As culturas dos diferentes microrganismos (200 ml) foram obtidas como referido, até uma fase de crescimento variável conforme o objectivo do trabalho. No momento escolhido as culturas foram assepticamente adicionadas da solução mãe de nisina, em diferentes concentrações, tendo a incubação continuado nas condições previamente descritas. As amostras das culturas tratadas e das culturas controlo foram retiradas nos tempos indicados, conforme as experiências.

7.1 - Avaliação da densidade óptica das culturas

A densidade óptica (DO) das culturas controlo e tratadas foi avaliada através da Absorvância lida em Spectronic 20 (Bausch & Lomb), a um comprimento de onda de 550 nm (Abs 550 nm), usando como branco o próprio meio de cultura ou o diluente. As diluições foram efectuadas com 0,5 ml de cultura e 4,5 ml de diluente (1/10). Os resultados foram apresentados usando o logarítmo natural (ln) da (Absorvância lida × factor da diluição usada × 100), em função do tempo de recolha das amostras.

Os valores apresentados nos resultados gráficos, correspondem a um valor médio obtido a partir de três ensaios.

7.2 - Avaliação do número de células viáveis

A técnica usada foi a da incorporação de 0,1 ml de cultura ou das respectivas diluições em gelose nutritiva fundida e arrefecida a 45°C. As amostras foram submetidas a diluições seriadas (1/10) usando como diluente o soro fisiológico, de modo a que as contagens estivessem compreendidas entre 30 e 300 colónias por placa.

A contagem de colónias foi efectuada nas 24 a 48 horas após a inoculação e incubação a 37°C, tendo sido usados duplicados para cada diluição.

N° de CFU/ml = média do n° de colónias em 0,1 ml × factor da diluição usada × 10.

Os resultados foram apresentados como o logarítmo na base 10 (log) do número de CFU/ml, em função do tempo de recolha das amostras. Os valores apresentados nos resultados gráficos, correspondem a um valor médio obtido a partir de três ensaios.

8 - Avaliação do efeito sobre protoplastos

8.1 - Obtenção de protoplastos

Culturas das diferentes espécies bacterianas foram efectuadas em "Nutrient broth" até Abs 550 nm de aproximadamente 1,0. As células lavadas duas vezes com tampão de fosfato 0,1M PH 7,0, foram suspensas em tampão de fosfato 0,05M PH 8,0 contendo sacarose 0,6M, $MgSO_4$ 15 mM e lisozima 40 mg%. Estas suspensões celulares foram incubadas a 37°C durante 1 hora e 30 minutos.

8.2 - Tratamento dos protoplastos

As suspensões foram tratadas com nisina (25 UI/ml) durante 5 minutos. Amostras sem qualquer tratamento foram usadas como controlo. Decorrido o tempo de tratamento adicionou-se GaFaCa às suspensões e os seus sedimentos, obtidos por centrifugação, foram fixados com GaFaCa / OsO_4 e processadas para microscopia electrónica (ver secção 11.2).

9 - Avaliação do efeito da N-Bromossuccinimida

9.1 - Tratamento das culturas bacterianas (TSB)

As culturas obtidas como referido, e apresentando uma densidade óptica a 550 nm compreendida entre 0,4 e 0,6, foram submetidas ao tratamento prévio com N-Bromossuccinimida (NBS) (Sigma), nas concentrações finais de 2 e 5 mM, antes da adição de nisina nas concentrações de 25, 100 e 1000 UI/ml.

Foram usados como controlos o comportamento das culturas na ausência de qualquer substância, na presença de NBS isolada e na presença de nisina isolada.

O efeito da NBS foi avaliado pela sua adição, nas concentrações estudadas, 10 minutos antes da adição de nisina. A incubação foi continuada nas mesmas condições e avaliada espectrofotometricamente a 550 nm a variação da densidade óptica durante 120 minutos.

9.2 - Tratamento das suspensões bacterianas (Tampões)

Culturas idênticas às anteriores foram centrifugadas a 4000 r.p.m./10 min tendo o meio sido substituído por tampão. Os tampões ensaiados foram o Tris-HCl 0,05M (PH 5,0 e PH 8,0) e o Tampão de fosfatos de Na^+ 0,05M (PH 5,0 e PH 8,0).

Os ensaios decorreram como o descrito na utilização directa das culturas.

10 - Avaliação do efeito do EDTA em culturas de *E. coli*

Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma), foi usado nas concentrações finais de 2,5; 5 e 10 mM. Esta solução foi adicionada às culturas exponenciais de *E. coli* em meio de TSB PH 7,3, nos 5 minutos ou 60 minutos que antecederam a adição de solução de nisina nas concentrações finais de 25, 600 e 1000 UI/ml.

11 - Estudo da morfologia e ultraestrutura bacteriana

11.1 - O estudo da morfologia por microscopia óptica

Amostras retiradas das culturas, nos tempos indicados, foram fixadas e coradas pela técnica de Gram. As observações foram efectuadas usando uma ampliação de 1000 vezes num microscópio óptico "Nikon Fx-35A Phase Contrast". As fotografias foram obtidas no mesmo microscópio apresentando uma ampliação final de 2000 vezes.

11.2 - O estudo da ultraestrutura por microscopia electrónica

A técnica por nós usada foi a dos cortes ultrafinos, descrita por Silva (1984).

Para a observação ultraestrutural das amostras foram usadas duas técnicas para a sua fixação, a partir das suspensões celulares:

Fixação GaFaCa / OSO_4

As suspensões celulares foram rapidamente centrifugadas a 3000 r.p.m/10 min, a 4°C e aos respectivos sedimentos foi de imediato adicionada a GaFaCa. As amostras foram conservadas

por 24 horas a 4°C e de novo centrifugadas nas mesmas condições. Os sedimentos foram então lavados duas vezes com tampão de cacodilato.

A pós-fixação ocorreu com adição de solução de OSO_4 a 1% aos sedimentos durante 18 horas à temperatura ambiente e com uma solução aquosa a 0,5% (p/v) de acetato de uranilo (TAAB), por 30 minutos.

Fixação OSO_4 / GaFaCa

Os sedimentos, obtidos como referido anteriormente, foram adicionados da solução de OSO_4 a 1% tendo actuado durante 18 horas à temperatura ambiente. As células lavadas duas vezes com tampão de cacodilato foram pós-fixadas com GaFaCa durante 24 horas a 4°C e com uma solução aquosa 0,5% (p/v) de acetato de uranilo durante 30 minutos.

As amostras depois de fixadas foram desidratadas para o que se usaram soluções aquosas de etanol com concentrações crescentes até ao etanol absoluto, óxido de propileno (Merck), óxido de propileno/Epon (TAAB) (1/1) e Epon. As amostras foram, após 24 horas, incluídas em Epon e a resina polimerizada em estufa a 60°C durante o tempo mínimo de 48 horas.

Os cortes ultrafinos foram obtidos usando como material cortante a faca de diamante, num micrótomo LKB Ultratome III.

A recolha do material cortado foi feita para grelhas de cobre de 400 mesh, revestidas com 1% de parlódio (TAAB).

Para o contraste foi usada uma solução aquosa saturada de acetato de uranilo por 60 segundos e uma solução de citrato de chumbo (TAAB) por 5 minutos.

As observações foram realizadas em microscópio electrónico de transmissão "Siemens Elmiskop IA" ou "Jeol Jem 100 CX II" e registadas em películas fotográficas Agfa-Gevaert ou Kodak, respectivamente.

12 - Determinação do efluxo de potássio

12.1 - Preparação das suspensões celulares

As culturas foram obtidas nos meios indicados para este fim até uma concentração celular de 3-5 $\times 10^8$ cél/ml. Depois de centrifugadas a 3000 r.p.m./10 min a 4°C, as células foram lavadas três vezes com água de peptona a 0,1%, tendo a suspensão final sido efectuada na mesma solução.

12.2 - Determinação por fotometria de chama

O efluxo de K^+ foi determinado nos filtrados das suspensões celulares controlo ou tratadas com nisina. As suspensões foram retiradas nos tempos indicados e filtradas, o mais rapidamente que a técnica permitiu, por filtros Millipore de 0,45 μm de poro.

Os valores foram expressos em % do valor total (100%) de K^+ intracelular, em função do tempo de recolha das amostras. Os valores de 100% foram obtidos dos filtrados de suspensões celulares não tratadas e fervidas durante 30 minutos.

O K^+ foi doseado em fotómetro de chama "Corning 480 FlamePhotometer".

Os resultados gráficos apresentados representam o valor médio de três ensaios.

12.3 - Determinação da cinética de libertação de potássio por potenciometria directa

As determinações foram efectuadas usando um eléctrodo selectivo de potássio, mergulhado directamente nas suspensões celulares.

O eléctrodo referência era de As/AsCl, tendo-se usado no compartimento interior KCl saturado e no exterior NaCl 0,1%. Os eléctrodos indicadores utilizados, sensíveis ao catião potássio, eram de construção laboratorial, Lapa e col. (1993), tendo-se usado na construção da membrana 2% de valinomicina (Sigma), 65,8% de Bis (2-etilhexil) sebacate (Fluka), em PVC como polímero de suporte. Entre cada ensaio o eléctrodo foi calibrado usando 25 ml de água de peptona a 0,1% a que foi adicionada uma solução de KCl 0,1M. As determinações potenciométricas foram efectuadas usando um "Potenciómetro Crison modelo 2002 PHmeter (± 0,1 mV)". As medições foram efectuadas em vaso de parede dupla, termostatizado com água circulante a 37° ± 0,2°C.

A água usada em todos os ensaios, e inclusivamente na preparação de água de peptona 0,1%, era desionizada até uma condutividade inferior a 0,1 $\mu S.cm^{-1}$.

Os resultados foram expressos em concentração molar *versus* tempo em minutos.

Os resultados gráficos apresentados representam o valor médio de três ensaios.

13 - Inibição de actividades enzimáticas localizadas na membrana citoplasmática

13.1 - Inibição da actividade respiratória

As culturas bacterianas foram obtidas em TSB, PH (5,0) e (7,3), como descrito, até fase exponencial de crescimento, numa concentração celular de 2 a 6×10^8 cél/ml, para o *B. cereus* e *B. subtilis* e de 2 a 10×10^{11} cél/ml, para o *E. faecium* e *L. monocytogenes*.

Este estudo foi realizado segundo a técnica descrita por Silva e col. (1979), para *B. cereus*, com algumas modificações.

As culturas foram centrifugadas a 3000 r.p.m./10 min, a 4°C. Os sedimentos foram suspensos em Tris-HCl 0,05M PH 7,0. As suspensões foram tratadas com nisina em diferentes concentrações tendo sido efectuada uma suspensão para controlo. Após uma actuação da nisina por 10 minutos, e mantida a incubação a 37°C, as suspensões tratadas e controlo foram transferidas para tubos contendo succinato de Na^+ (Sigma) e cloreto de trifenil tetrazólio (Sigma) de modo a obter as concentrações finais respectivas de 0,05M e 0,61 mM. De imediato agitadas foram incubadas a 30°C/10 min no final dos quais foram adicionadas de glutaraldeído a 25% (Merck), na proporção final de 2,5%. Mantidas à temperatura ambiente durante 60 minutos foram depois centrifugadas a uma velocidade de 10000 r.p.m./15 min. Com metanol (p.a.Merck) foi extraído o vermelho de formazan presente nos respectivos sedimentos. Os extractos metanólicos límpidos, foram obtidos por centrifugação a 5000 r.p.m/10 min e lida a respectiva Absorvância a 485 nm, usando um espectrofotómetro "Shimadzu UV-265".

Os resultados foram representados pela % de actividade respiratória (em relação aos 100% do controlo) em função das diferentes concentrações de nisina.

Os resultados gráficos apresentados representam o valor médio de três ensaios.

13.2 - Inibição da actividade da desidrogenase succínica em membranas isoladas

Para realizar este estudo as membranas das diferentes espécies bacterianas foram isoladas a partir de culturas em TSB (PH 7,3 e 5,0), na fase exponencial de crescimento (DO de 0,4 - 0,6). A técnica usada foi a descrita por Konings e col. (1973), com algumas modificações. Os sedimentos, obtidos por centrifugação a 4000 r.p.m./10 min a 4°C, foram lavados duas vezes com tampão de fosfato 0,1M PH 7,3 e ressuspensos em tampão de fosfato 0,05M PH 8,0 contendo 40 mg% de lisozima, 1 mg% de desoxirribonuclease I (DNAse) e 1 mg% de ribonuclease A (RNAse). Após 15 minutos de incubação, foi adicionado sulfato de magnésio na concentração final de 10 mM e continuada a incubação por mais 45 minutos. Uma observação microscópica revelou a presença de raras células intactas e de numerosas pequenas partículas resultantes da desintegração celular. Uma centrifugação a 1000 r.p.m. foi usada para eliminar as partículas maiores e os sobrenadantes foram ultracentrifugados (ultracentrifuga Beckman L-80, rotor Ti) a 30000 r.p.m/30 min, seguidos de duas lavagens com tampão de fosfato 0,1M PH 6,6 e igual centrifugação. A ressuspensão final foi efectuada num pequeno volume do mesmo tampão, distribuída em aliquotas e de imediato congeladas a -70°C.

A actividade da enzima foi medida pelo método diclorofenol indofenol-fenazina metossulfato descrito por Pollock e col. (1971). Foi usada uma mistura de reacção contendo 200 µl de tampão Tris-HCl 0,2M PH 7,0; 10 µl de succinato de sódio 0,2M; 10 µl de diclorofenol indofenol (DCIP) 2,5 mM; 5 µl de fenazina metossulfato (PMS) 29,4 mM; mais a suspensão de membranas num volume final de 1 ml. A suspensão membranar foi incubada com o tampão e o succinato durante 6 minutos a 37°C, adicionado o DCIP e PMS e de imediato registada a alteração de Absorvância, durante 6 minutos. Suspensões de membranas tratadas por 10 minutos, com diferentes concentrações de nisina, foram igualmente ensaiadas quanto à actividade da enzima.

Todos os reagentes e enzimas usadas para a obtenção de membranas ou para a reacção foram Sigma (diclorofenol indofenol; fenazina metossulfato; succinato de Na^+; desoxirribonuclease I; ribonuclease A; lisozima).

As leituras de variação de densidade óptica a 600 nm foram realizadas em espectrofotómetro "Shimadzu UV- 265", usando tinas de quartzo e uma temperatura controlada por ligação a um banho termostatizado "Thermed electronic 5001 GLF".

A concentração em membranas foi avaliada pelo teor em proteína, tendo sido escolhida a concentração de 200 µg/ml, nos ensaios efectuados. O teor proteico das suspensões membranares foi avaliado pelo método descrito por Bradford (1976), usando Albumina bovina (Sigma), na concentração de 1 mg/ml, como padrão.

Os resultados foram expressos em função da variação de Absorvância a 600 nm e do tempo de reacção em minutos. Os resultados gráficos apresentados exprimem o valor médio obtido de três ensaios.

RESULTADOS

O estudo dos efeitos resultantes do tratamento com diferentes concentrações de nisina incidiu sobre os seguintes parâmetros: morte celular e inibição do crescimento, alterações morfológicas e ultraestruturais, alterações de permeabilidade da membrana citoplasmática, lise de protoplastos e inibição de actividades enzimáticas localizadas na membrana.

Os microrganismos Gram positivo estudados foram *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecium* e *L. monocytogenes*.

Foram avaliados os parâmetros descritos para as estirpes bacterianas referidas, em culturas obtidas em meio de TSB com diferentes valores de PH (7,3 e 5,0) ou em suspensões celulares em diferentes tampões.

A - *B. cereus, B. subtilis, E. faecium, L. monocytogenes*

1 - Efeito da nisina na morte celular e inibição do crescimento bacteriano

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo método das diluições em meio sólido e em meio líquido, segundo a técnica descrita por Vaz Pato (1989). Comparando os resultados obtidos pelas duas técnicas foi possível concluir que os valores da CMI foram mais elevados quando a determinação foi efectuada em meio sólido. Como todo o nosso trabalho resultou do tratamento de culturas bacterianas em caldo ou de suspensões bacterianas em tampões, apresentamos apenas os resultados referentes ao método de diluição em meio líquido (Tabela 1).

Bactérias /Nisina(UI/ml)	0	10	25	50	100	250	500	1000
B. cereus	++	++	++	++	0	0	0	0
B. subtilis	+++	+++	+++	+++	+	0	0	0
E. faecium	++	++	++	++	++	0	0	0
L. monocytogenes	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0

Tabela 1- CMI calculada para as diferentes estirpes bacterianas pela técnica da diluição em meio líquido. Os resultados são representados pelo grau de desenvolvimento das diferentes estirpes na ausência ou na presença das diferentes concentrações de nisina, após uma incubação de 18 horas: +++ (abundante), ++ (moderado), + (reduzido), 0 (nulo).

Tendo observado que uma concentração de nisina de 25 UI/ml inibia fortemente a viabilidade celular em culturas exponenciais de *B. cereus*, mas que esse efeito era menos acentuado para as outras espécies, seleccionamos as concentrações de 25, 100 e 1000 UI/ml, para efectuar este estudo.

1.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3

1.1.1 - *B. cereus*

A adição de nisina nas concentrações de 25, 100 e 1000 UI/ml levou a uma redução brusca no número de células viáveis, a qual ocorreu nos primeiros 5 minutos de actuação. A resposta foi mais acentuada para as concentrações mais elevadas de nisina. Para a concentração mais baixa, de 25 UI/ml, verificou-se uma tendência para a recuperação dos valores (Fig. 1a).

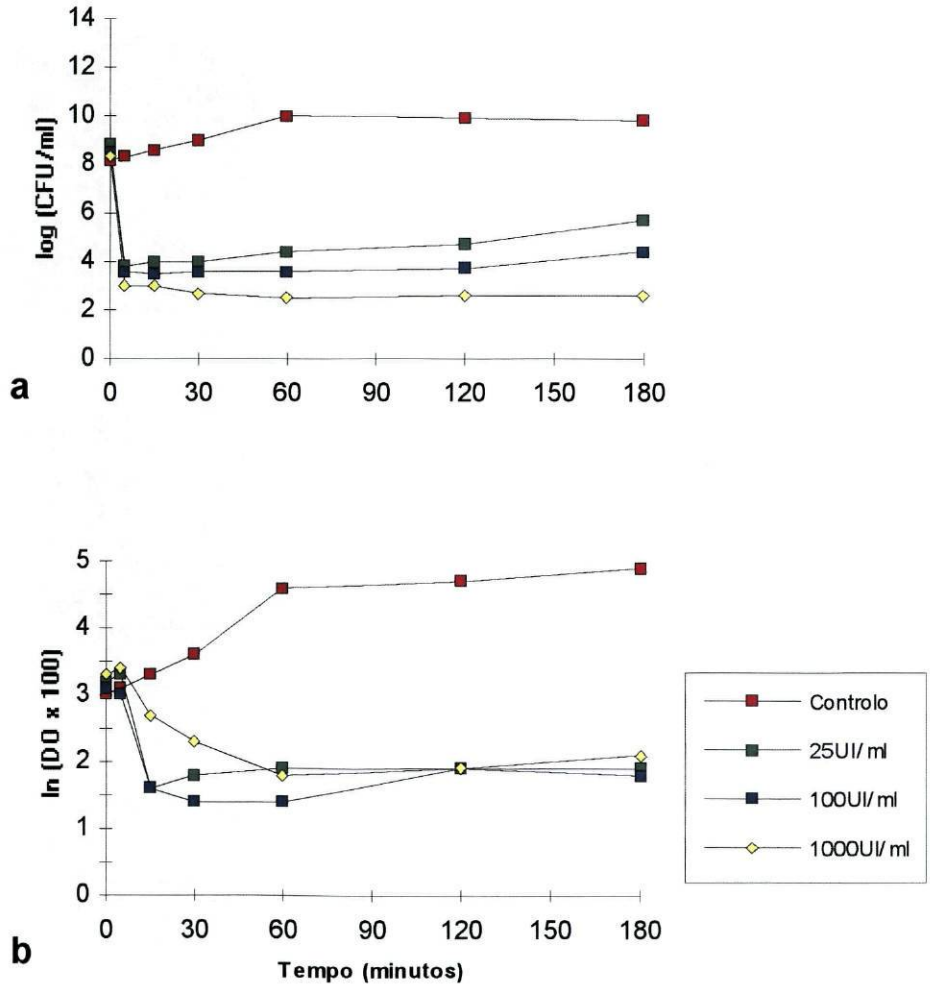


Figura 1 - Curvas de crescimento e morte de *B. cereus*, na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase exponencial de crescimento (TSB PH 7,3).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

Avaliada a densidade óptica das culturas a 550 nm verificamos que, após a adição de nisina, a turvação diminuiu acentuadamente nos primeiros 15 minutos. Esta descida foi menos acentuada para a concentração de 1000 UI/ml (Fig. 1b).

Este estudo espectrofotométrico e de viabilidade foi acompanhado por observações à microscopia óptica, a partir de amostras retiradas nos tempos de 5, 15 e 60 minutos, para as diferentes concentrações de nisina e submetidas a uma coloração de Gram. As fotografias apresentadas apoiam os resultados espectrofotométricos e de viabilidade celular apresentados (Fig. 1a,b). Assim, e para a concentração mais baixa de 25 UI/ml, observamos que ao fim de 5 minutos de actuação da nisina o grau de lise foi muito extenso, como se pôde observar pela presença de numerosos restos celulares resultantes da bacteriólise (Fig. 2b). Raras células apresentaram uma coloração positiva ao Gram enquanto outras surgiram sem alterações morfológicas significativas mas reagindo negativamente a esta coloração. Estes mesmos aspectos foram igualmente observados para as concentrações de 100 e 1000 UI/ml tendo-se mostrado uma intensidade de bacteriólise mais elevada para 100 UI/ml (Fig. 2c,d). Acompanhando o processo ao longo do tempo verificamos que o aspecto praticamente se manteve aos 15 minutos de incubação (Fig. 3) e ainda aos 60 minutos (Fig. 4) embora, ao fim deste tempo, se tenha observado um aparecimento de células com morfologia normal e uma coloração heterogénea, quando usada a concentração de 25 UI/ml (Fig. 4b). Estes últimos dados poderiam estar de acordo com o aumento do número de células viáveis que aconteceu a partir deste tempo (Fig. 1a).

Após 24 horas de incubação verificamos que os valores da densidade óptica e do número de células viáveis se aproximavam dos do controlo e ainda, que amostras coradas pelo Gram mostravam a presença de numerosos bacilos Gram positivo.

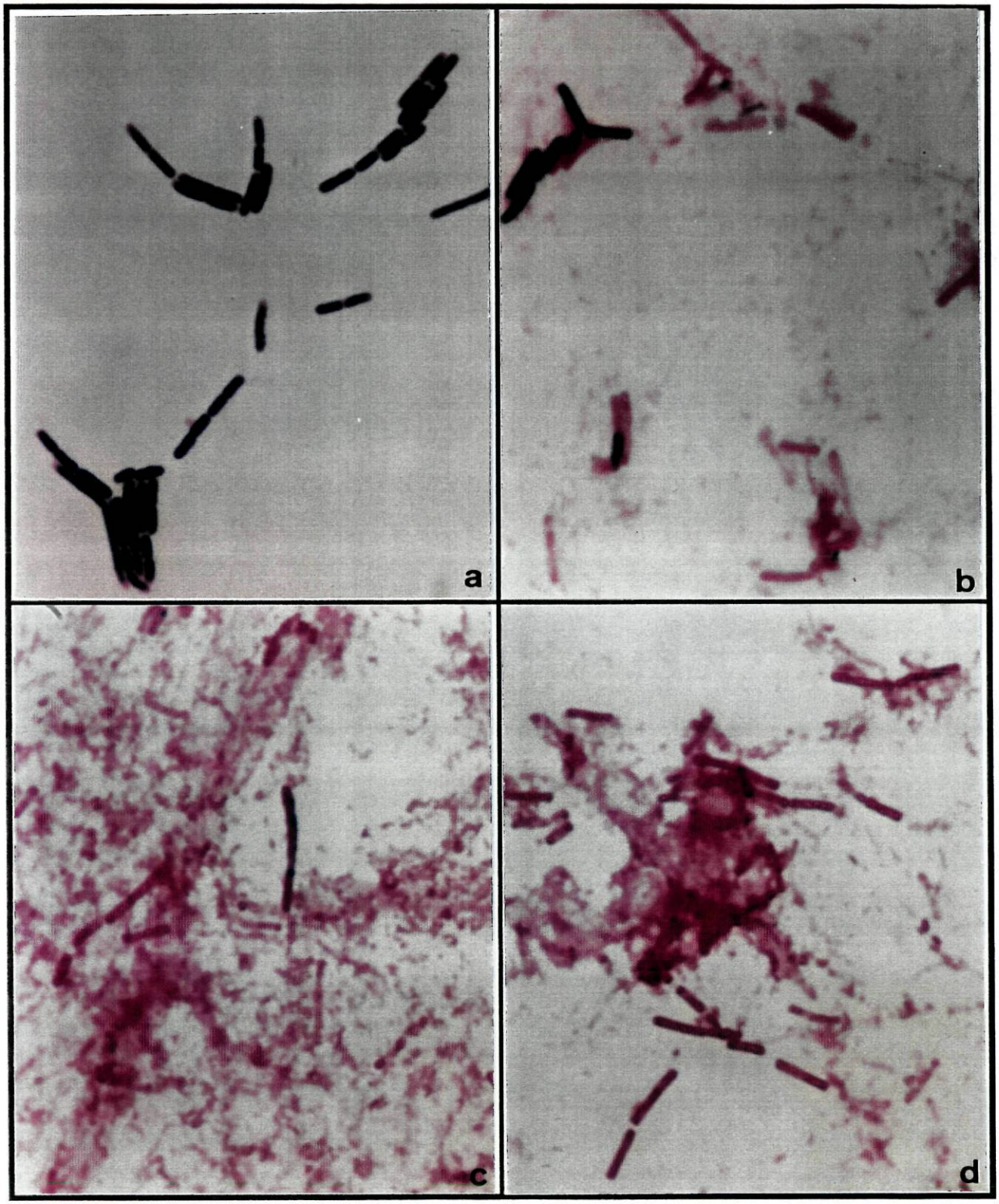


Figura 2 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *B. cereus* após 5 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

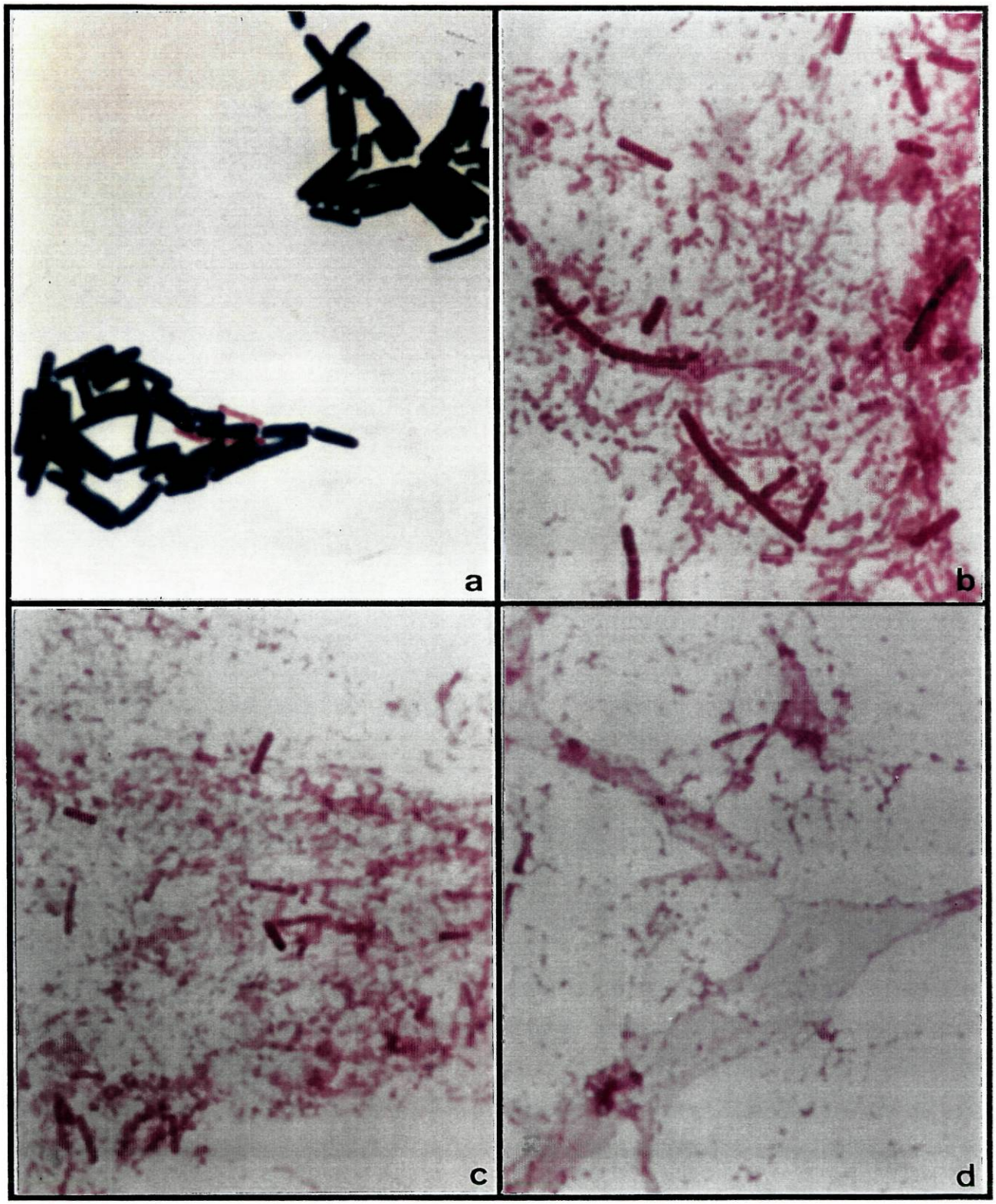


Figura 3 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *B. cereus* após 15 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.
• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

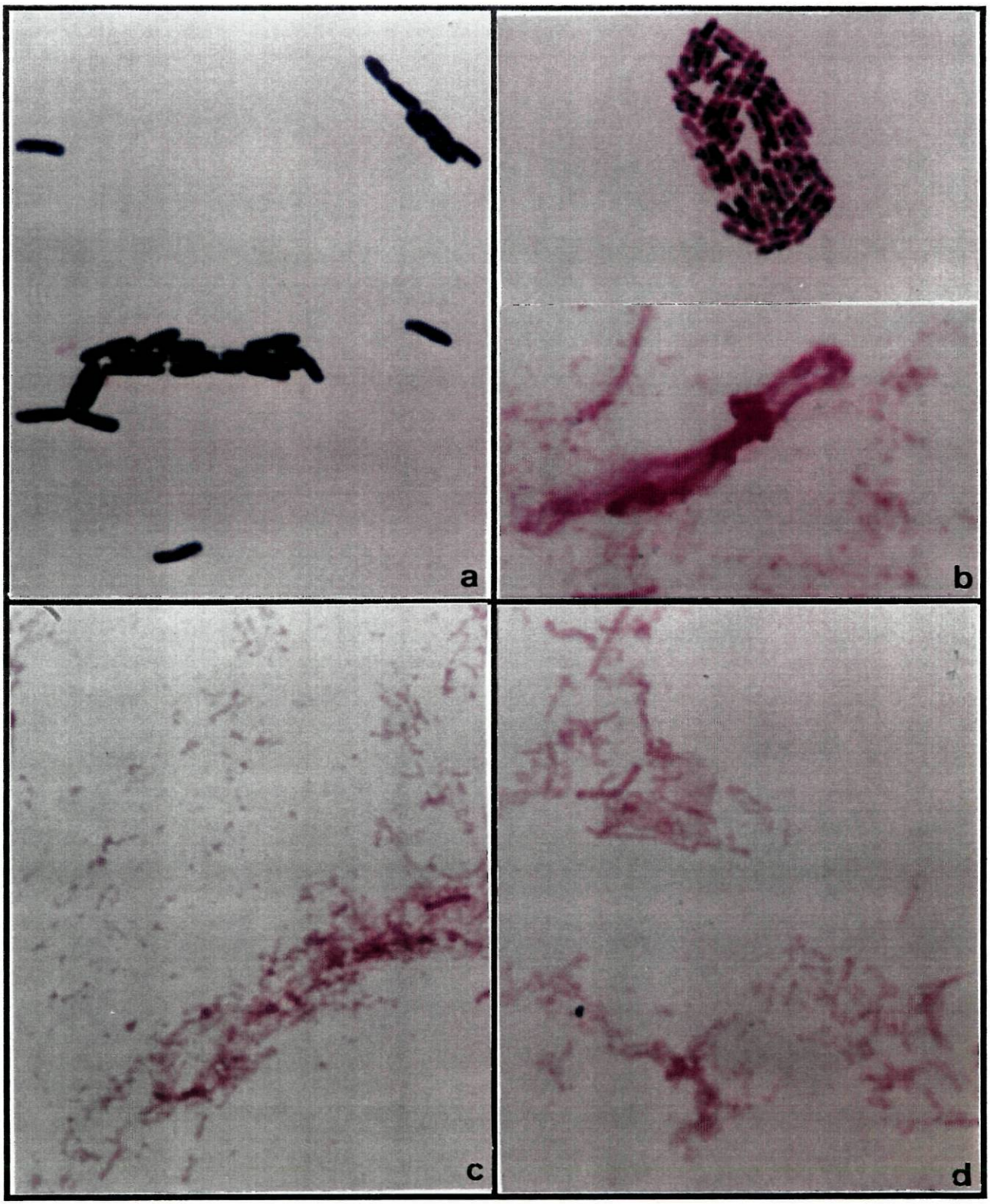


Figura 4 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *B. cereus* após 60 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.
• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

1.1.2 - *B. subtilis*

A redução observada no número de células viáveis e a sua dependência da concentração de nisina foi igualmente verificada, sendo, contudo, diferentes os níveis atingidos. A maior redução ocorreu nos primeiros 5 minutos, embora menos acentuada para as concentrações de 25 e 100 UI/ml. Verificamos igualmente uma subida dos valores ao fim de 30 a 60 minutos que foram mais pronunciadas para as concentrações que provocaram menores descidas. Ao fim de 3 horas, após a adição de nisina, os valores de CFU/ml aproximavam-se dos do controlo para as concentrações de 25 e 100 UI/ml (Fig. 5a).

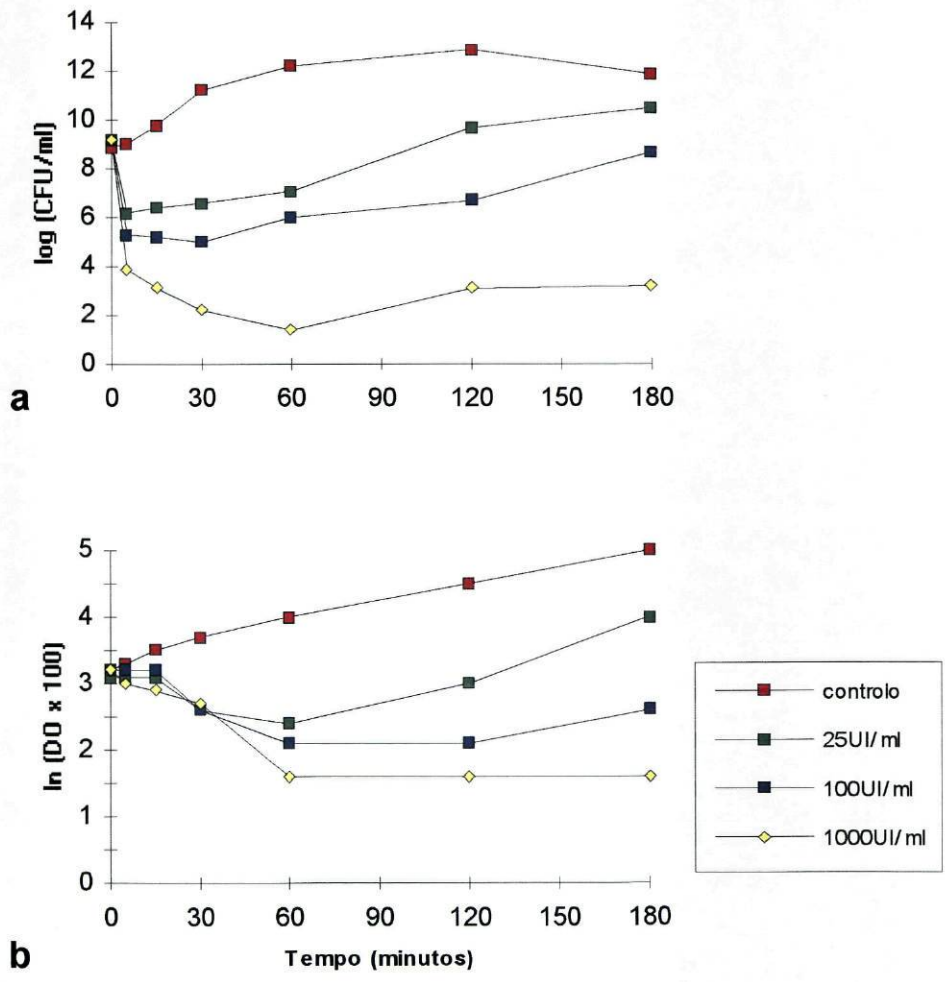


Figura 5 - Curvas de crescimento e morte de *B. subtilis*, na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase exponencial de crescimento (TSB PH 7,3).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

Relativamente ao efeito sobre a densidade óptica observamos uma descida desta mas após um período de cerca de 15 minutos. As descidas foram bastante mais progressivas tendo-se atingido os valores mínimos aos 60 minutos. Observamos igualmente que para a concentração de 25 UI/ml de nisina estes valores começaram a subir após 60 minutos (Fig. 5b).

O estudo efectuado por microscopia óptica das amostras retiradas a partir das culturas exponenciais desta espécie bacteriana, sem tratamento ou 5, 15 e 60 minutos após tratamento com as diferentes concentrações de nisina, revelou resultados ligeiramente diferentes dos observados para *B. cereus,* como aliás tinhamos verificado em relação à viabilidade e densidade óptica das culturas. Assim, e de acordo com o estudo espectrofotométrico, após 5 minutos de tratamento com 25 UI/ml de nisina as bactérias surgiram com uma morfologia alterada e uma reacção negativa ao Gram tendo sido observadas algumas bactérias Gram positivo e alguns restos celulares resultantes da lise bacteriana (Fig. 6b). Para estas condições o grau de bacteriólise foi inferior ao observado para as mesmas condições em *B. cereus*. Relativamente às concentrações de 100 e 1000 UI/ml observamos que o grau de lise foi mais extenso que para 25 UI/ml (Fig. 6c,d) mas inferior ao observado em *B. cereus*. Foi igualmente visível um aumento do grau de lise com o tempo (Fig. 7) o que se mostrou de acordo com uma descida mais progressiva na Abs 550 nm (Fig. 5b). Das observações efectuadas ao fim de 60 minutos de incubação, o resultado foi diferente de acordo com as concentrações de nisina utilizadas. Para uma concentração de 25 UI/ml tinhamos verificado uma subida na Abs 550 nm bem como o início da subida do número de células viáveis (Fig. 5), dado esse que está de acordo com a microfotografia obtida nessas condições, com a presença de restos celulares em simultâneo com numerosos bacilos de morfologia aparentemente normal e com reacção positiva ao Gram (Fig. 8b). Para 100 UI/ml observamos uma rede de restos celulares e raros bacilos Gram positivo (Fig. 8c), enquanto para 1000 UI/ml apenas foram visíveis restos celulares (Fig. 8d).

Leituras efectuadas às 24 horas mostraram, tal como para *B. cereus*, uma aproximação dos valores de densidade óptica e de CFU/ml relativamente ao controlo. Microscopicamente foram visíveis bacilos com reacção positiva ao Gram.

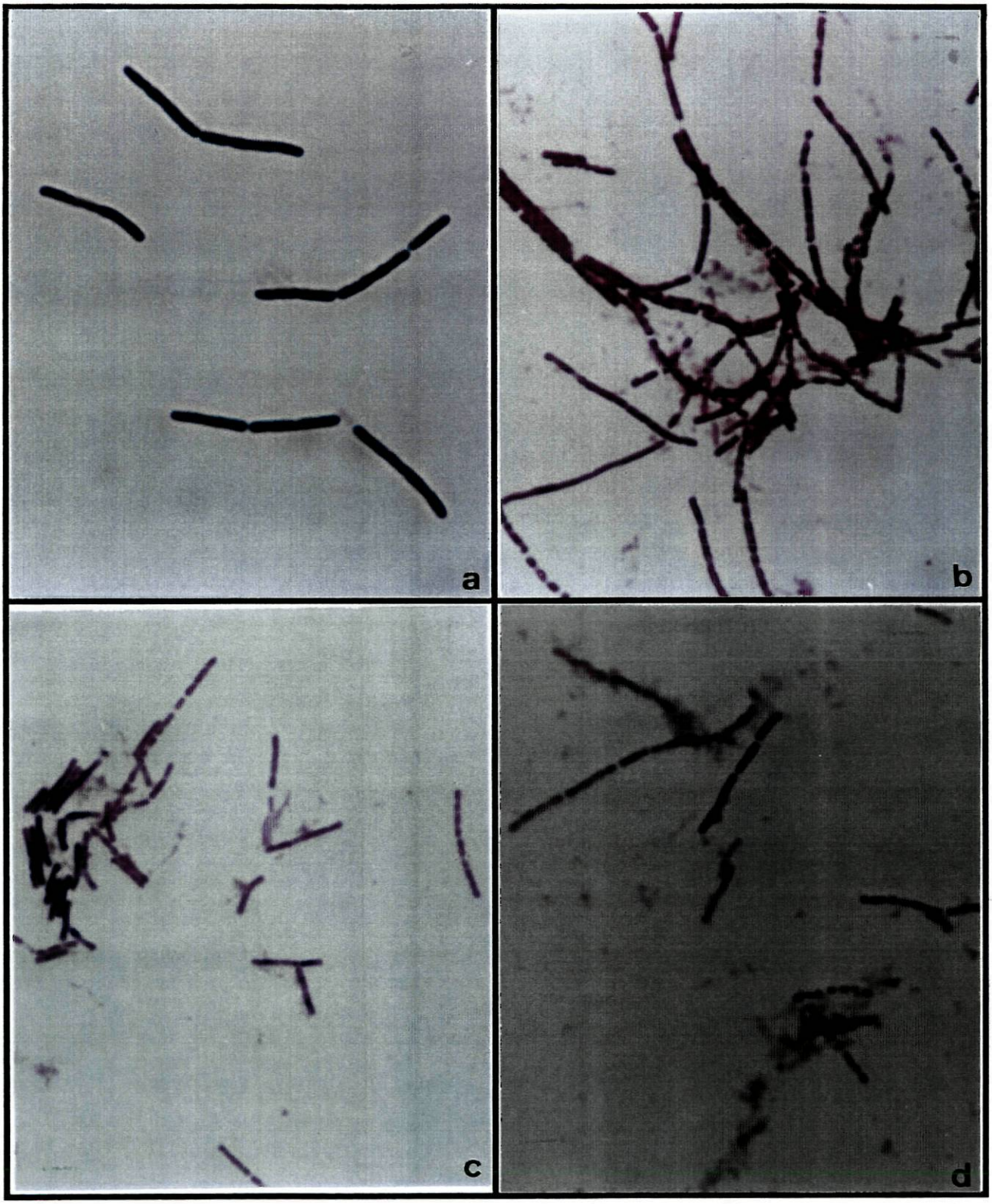


Figura 6 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *B. subtilis* após 5 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.
• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

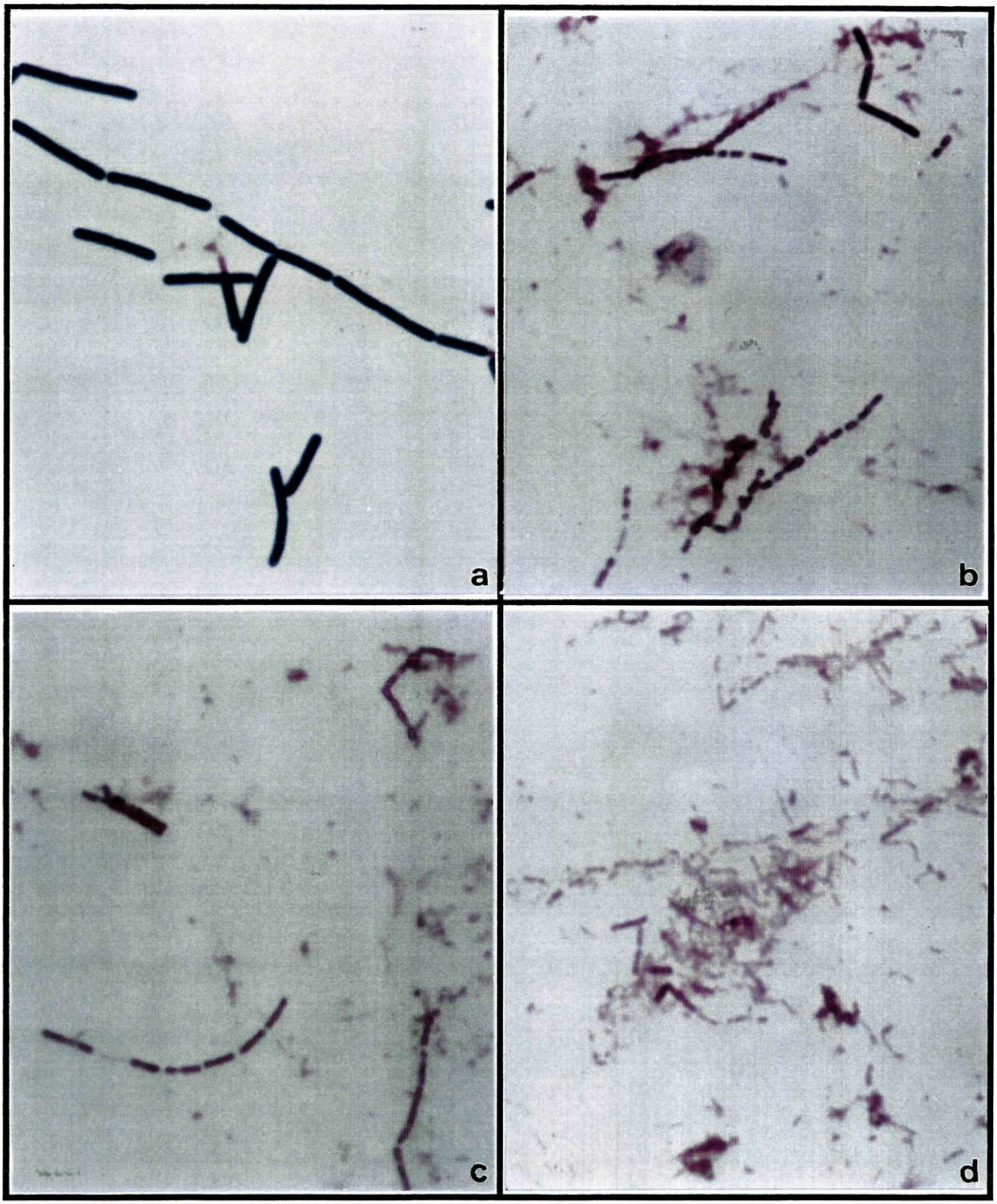


Figura 7 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *B. subtilis* após 15 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.
• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

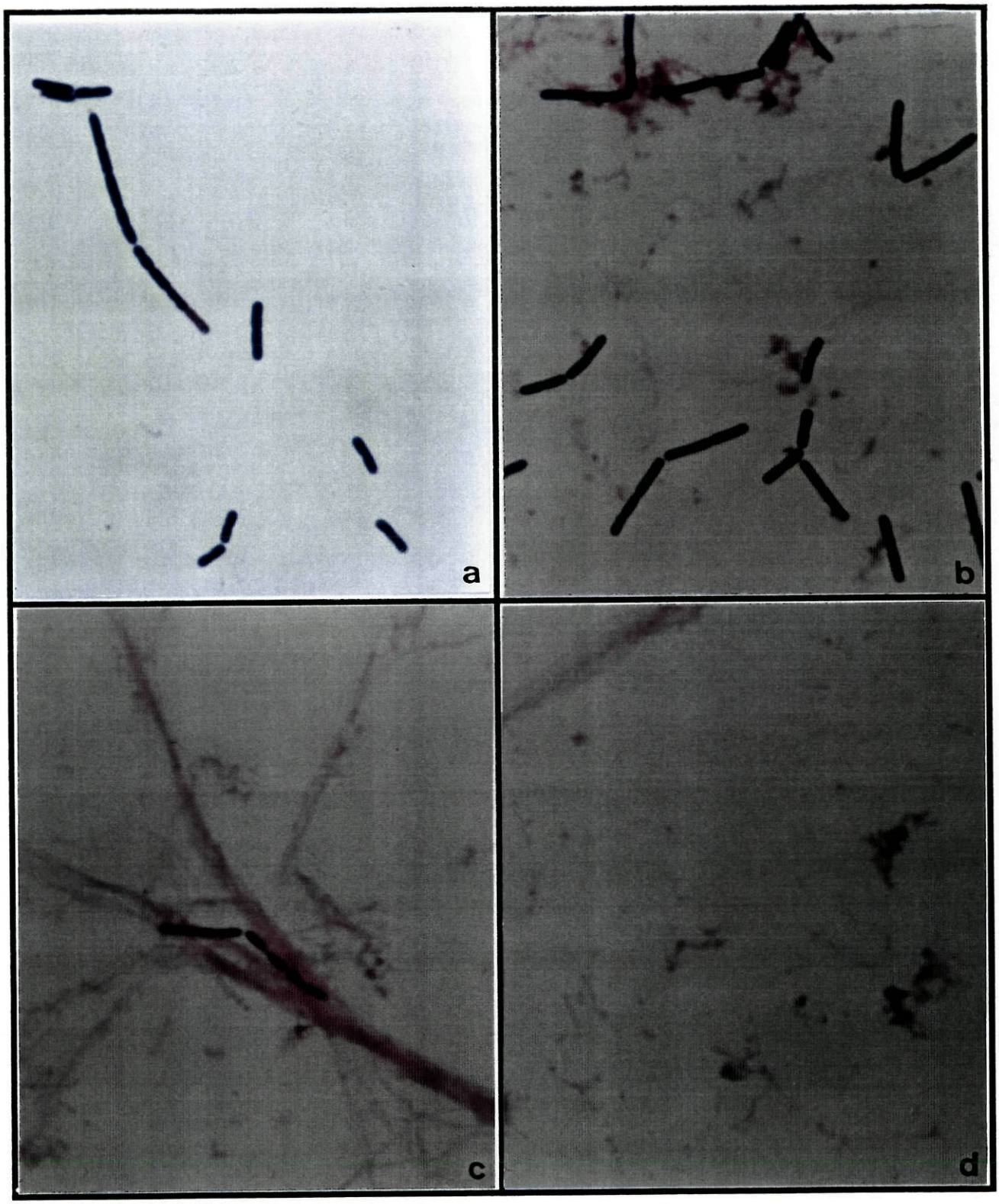


Figura 8 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *B. subtilis* após 60 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

1.1.3 - *E. faecium*

A descida do número de células viáveis foi brusca nos primeiros 5 minutos, para qualquer das concentrações usadas, mas sempre mais acentuada para concentrações mais elevadas. Estes valores foram mantidos ou desceram ligeiramente nos primeiros 30 minutos, principalmente para as concentrações de 100 e 1000 UI/ml. Após 30 a 60 minutos, foi visível uma subida muito progressiva no número de células viáveis, para a concentração de 25 UI/ml (Fig. 9a).

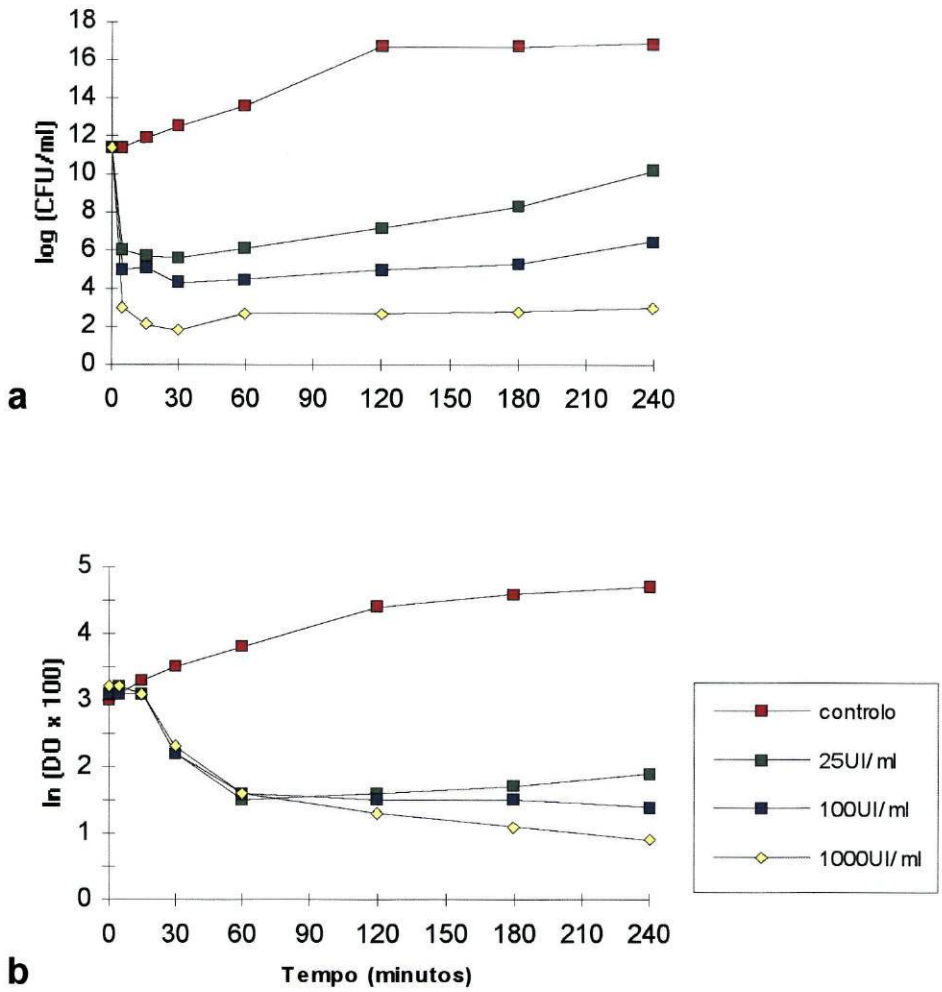


Figura 9 - Curvas de crescimento e morte de *E. faecium*, na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase exponencial de crescimento (TSB PH 7,3).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

Em relação à turvação das culturas verificamos que a Absorvância decresceu ao fim de 15 minutos de um modo acentuado até aos 60 minutos e que se manteve quase constante, registando apenas uma ligeira subida para 25 UI/ml e ligeira descida para 100 e 1000 UI/ml, até 4 horas após a adição de nisina (Fig. 9b).

Às 24 horas verificamos que a densidade óptica era idêntica à do controlo, mas apenas para as culturas tratadas com 25 e 100 UI/ml de nisina.

Um pouco à semelhança do que aconteceu para *B. subtilis*, o estudo efectuado por microscopia óptica revelou que após 5 minutos de tratamento com 25 UI/ml de nisina, algumas bactérias surgiram com uma morfologia alterada e uma reacção negativa ao Gram. Foi contudo possível observar numerosos cocos Gram positivo, aparentemente normais e alguns restos celulares resultantes da lise bacteriana (Fig. 10b). Relativamente às concentrações de 100 e 1000 UI/ml, observamos aglomerados de cocos de morfologia normal ou alterada, apresentando reacção negativa ao Gram e alguns restos celulares (Fig. 10c,d). Estas imagens estariam de acordo com o facto de a densidade óptica da cultura não ter apresentado alterações significativas nos primeiros 15 minutos e, o número de células viáveis ter descido mais acentuadamente para 100 e 1000 UI/ml. Foi igualmente visível um aumento do grau de lise com o tempo (Fig. 11). A observação aos 60 minutos não se mostrou significativamente diferente da obtida aos 15 minutos, tendo apenas sido verificado um grau de lise mais extenso, pela presença de redes de restos celulares (Fig. 12). Não foi vísivel uma tendência para a recuperação, durante este tempo, o que se encontra de acordo com os dados gráficos (Fig. 9a,b).

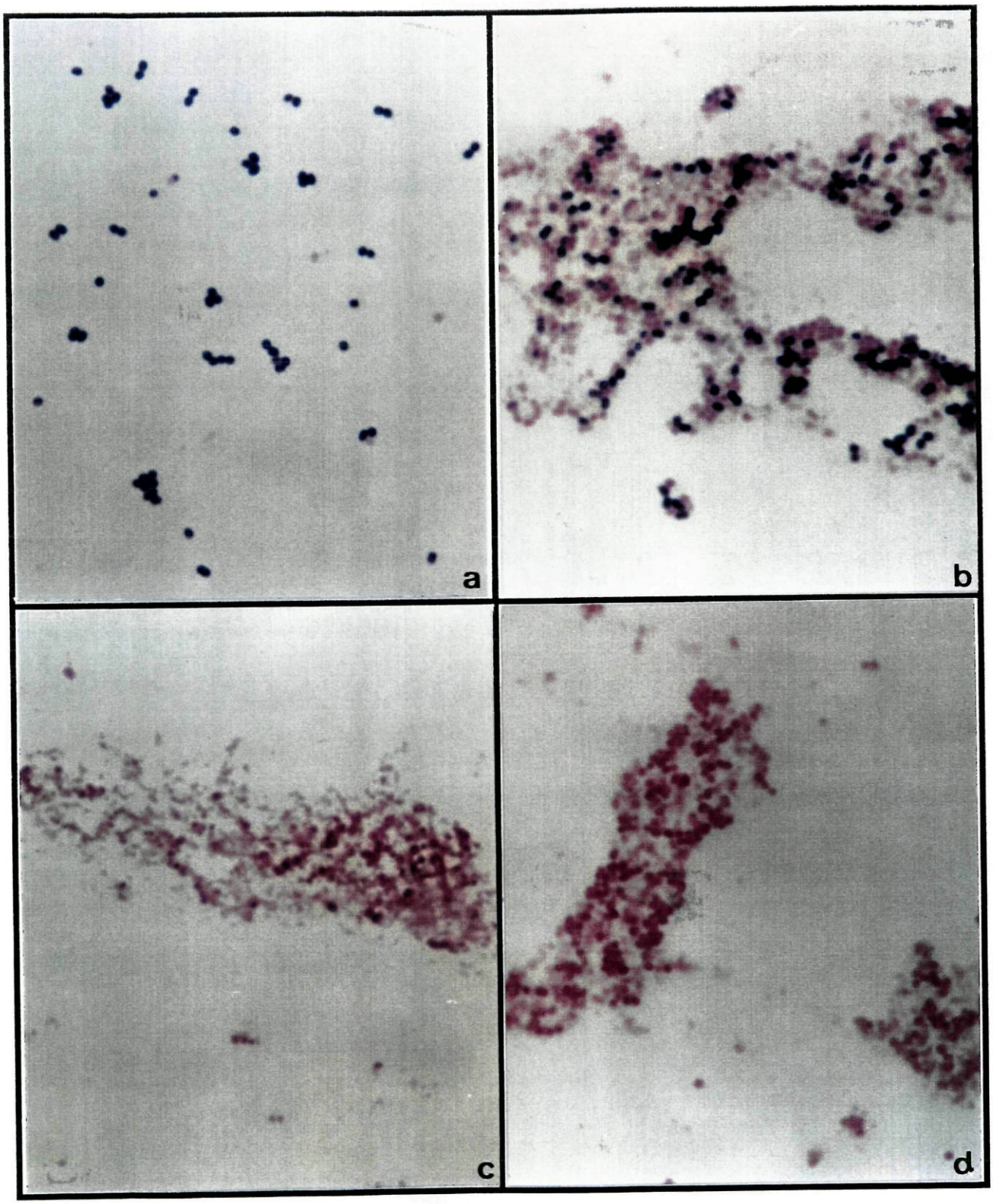


Figura 10 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *E. faecium* após 5 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.
• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

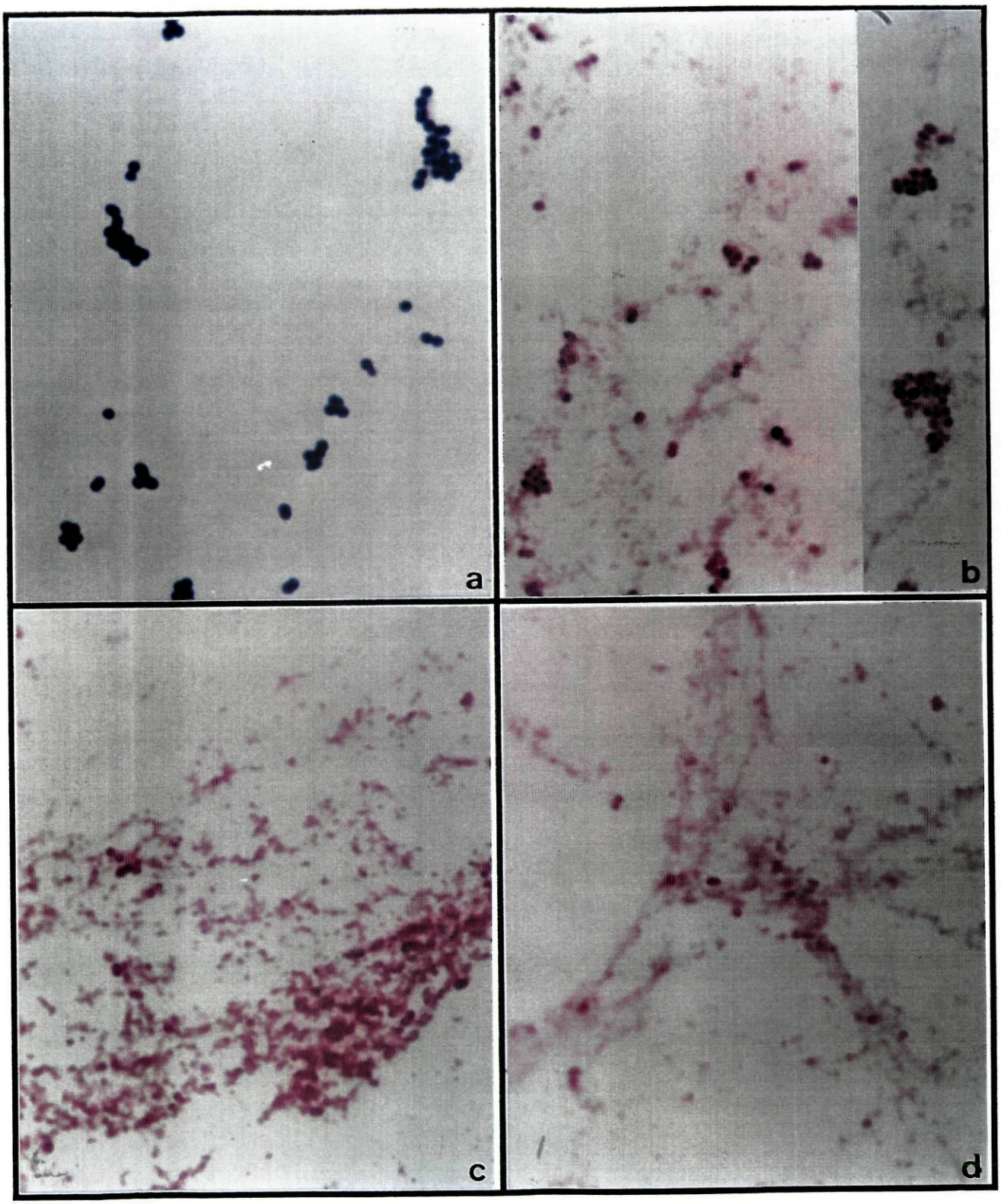


Figura 11 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *E. faecium* após 15 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.
• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

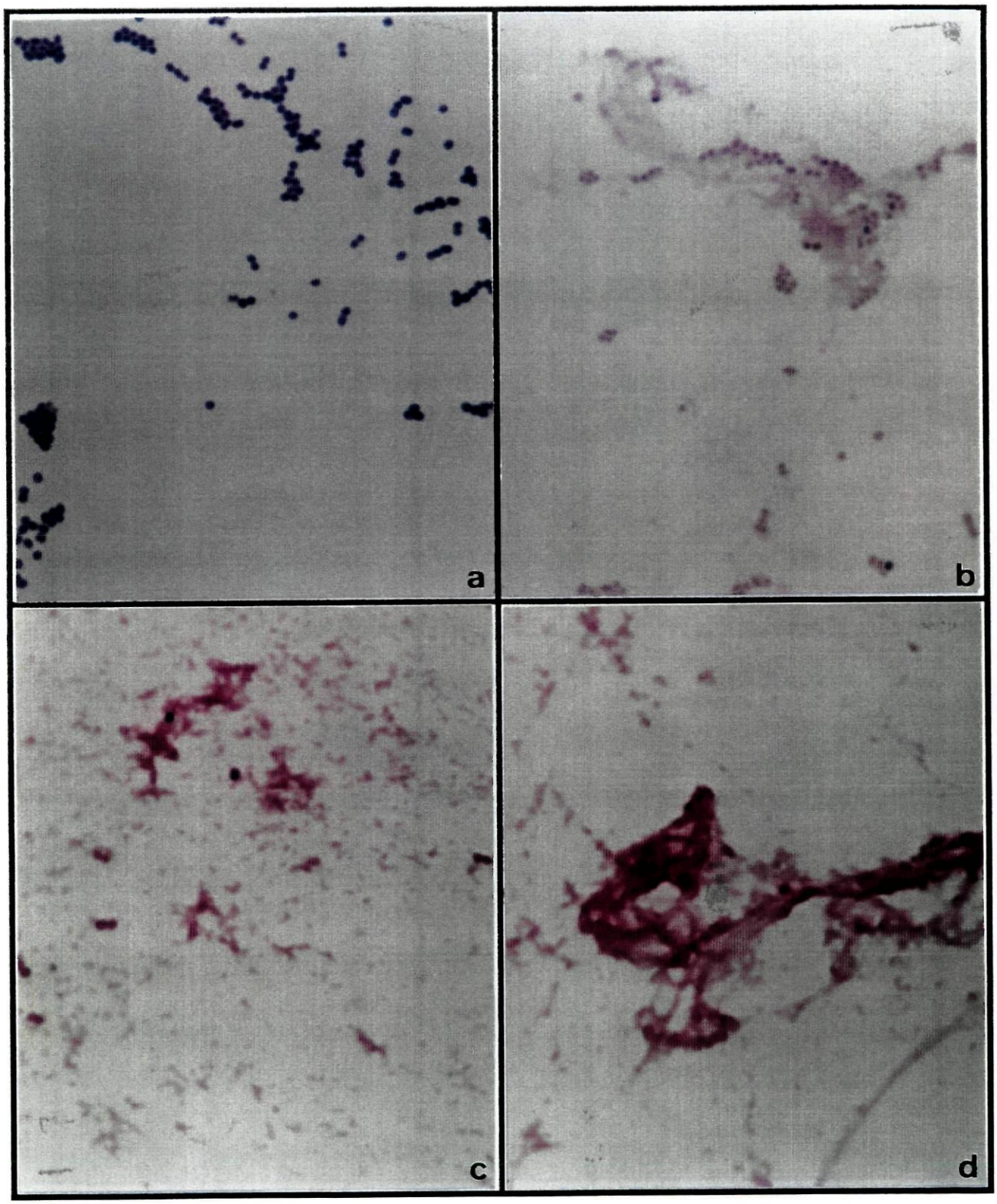


Figura 12 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *E. faecium* após 60 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

1.1.4 - *L. monocytogenes*

Uma concentração de nisina de 25 UI/ml levou a uma descida ligeira no número de células viáveis, quando comparada com as situações anteriores. As descidas ocorreram igualmente nos primeiros 5 minutos tendo sido acentuadas para as concentrações de 100 e particularmente de 1000 UI/ml. Os valores mostraram uma subida ligeira, para 25 UI/ml, ao fim de 15 a 30 minutos (Fig. 13a).

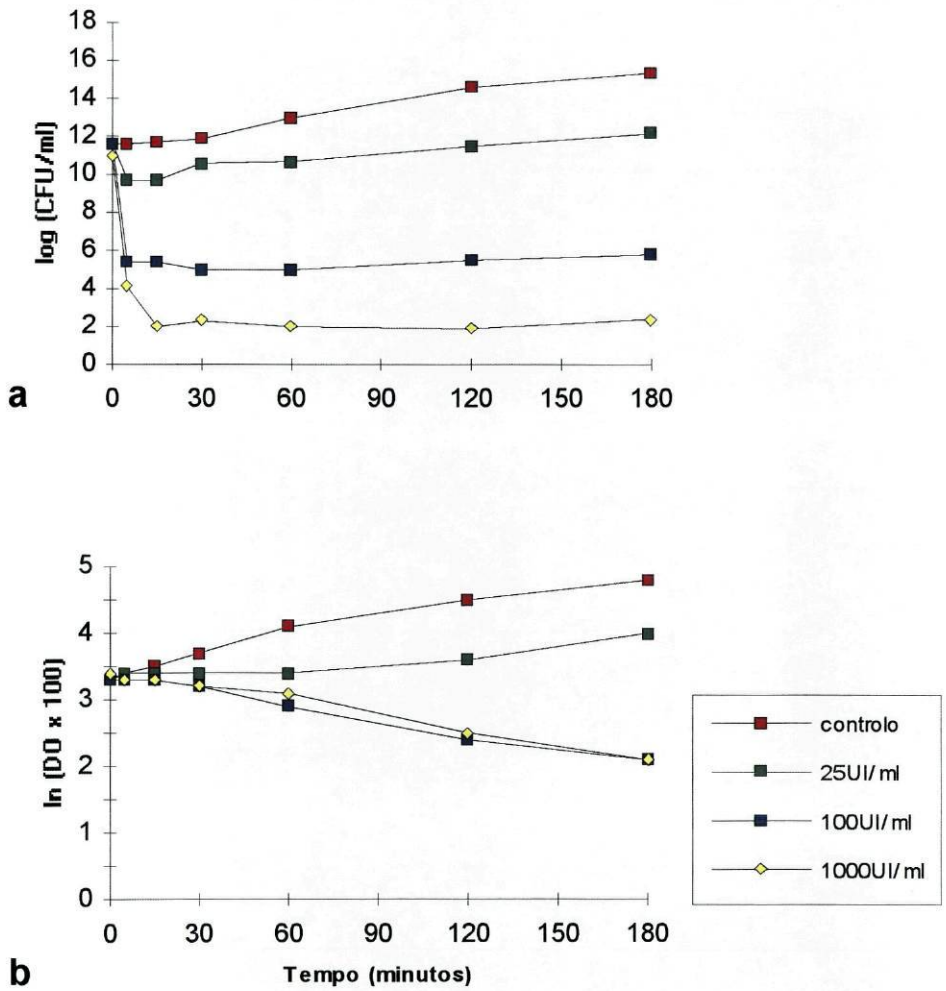


Figura 13 - Curvas de crescimento e morte de *L. monocytogenes*, na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase exponencial de crescimento (TSB PH 7,3).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

A densidade óptica das culturas tratadas com 25 UI/ml manteve valores praticamente constantes até aos 60 minutos, a partir dos quais registou uma subida lenta e progressiva. Para as concentrações de 100 e 1000 UI/ml os valores mantiveram-se quase inalterados até aos 30 minutos tendo então começado a descer muito lentamente até às 3 horas (Fig. 13b).
Às 24 horas a densidade óptica era próxima da do controlo para 25 e 100 UI/ml mas praticamente nula para 1000 UI/ml de nisina.

Verificamos que o grau de lise foi inferior ao observado para *B. cereus*, à semelhança do que foi descrito para *B. subtilis* e *E. faecium*, particularmente para a concentração de 25 UI/ml e para os primeiros minutos de actuação. Em *L. monocytogenes*, os efeitos na viabilidade e densidade óptica mostraram uma acção bactericida da nisina sem bacteriólise significativa tendo estes dados, mais uma vez, sido apoiados pelas imagens de microscopia óptica. Efectivamente, para um tempo de actuação de 5 minutos os sinais de lise celular foram muito reduzidos para todas as concentrações de nisina testadas (Fig. 14). De acordo com o estudo de viabilidade (Fig. 13a), para uma concentração de 25 UI/ml, a maioria das células surgiu com uma morfologia e uma reacção ao Gram normais, sendo visíveis algumas células com reacção negativa a esta coloração (Fig. 14b). Para as concentrações de 100 e 1000 UI/ml apenas foi observado um crescente número de células que apresentaram reacção negativa ao Gram (Fig. 14c,d). Aos 15 minutos eram ainda pouco evidentes os sinais de lise (Fig.15), o que justifica a estabilidade da densidade óptica (Fig. 13b), e o número de células apresentando morfologia sensivelmente normal e coloração negativa aumentou principalmente nas culturas tratadas com 1000 UI/ml (Fig. 15d). Para o tempo de 60 minutos, o grau de lise aumentou (Fig. 16), com mais significado para as concentrações mais elevadas. Nessas situações não foram visíveis bactérias Gram positivo (Fig. 16c,d), o que justificará a reduzida viabilidade mas, os bacilos, se bem que com morfologia alterada, não se encontravam completamente destruídos o que justificará também a progressiva descida dos valores da Absorvância.

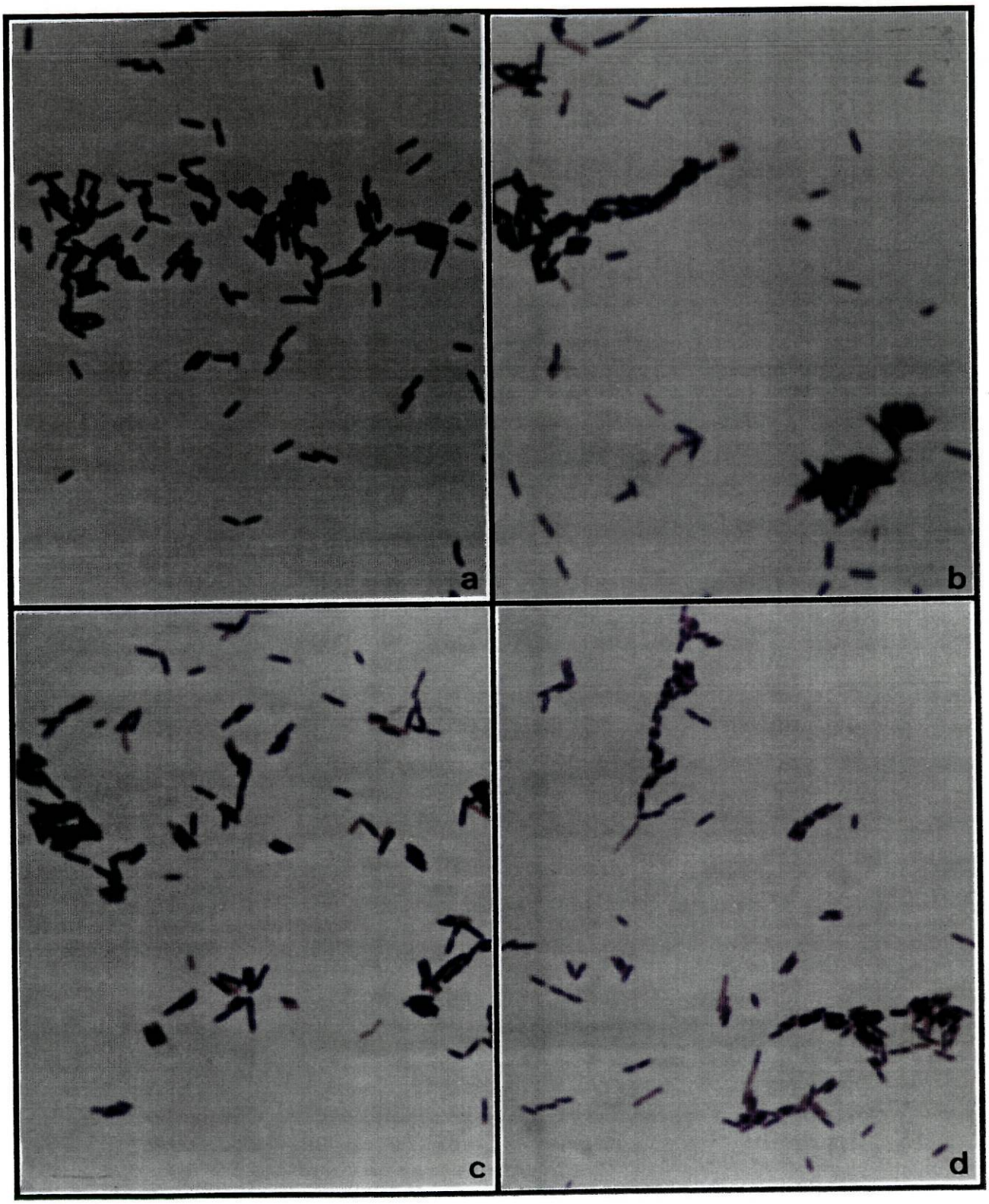


Figura 14 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *L. monocytogenes* após 5 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x. • **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

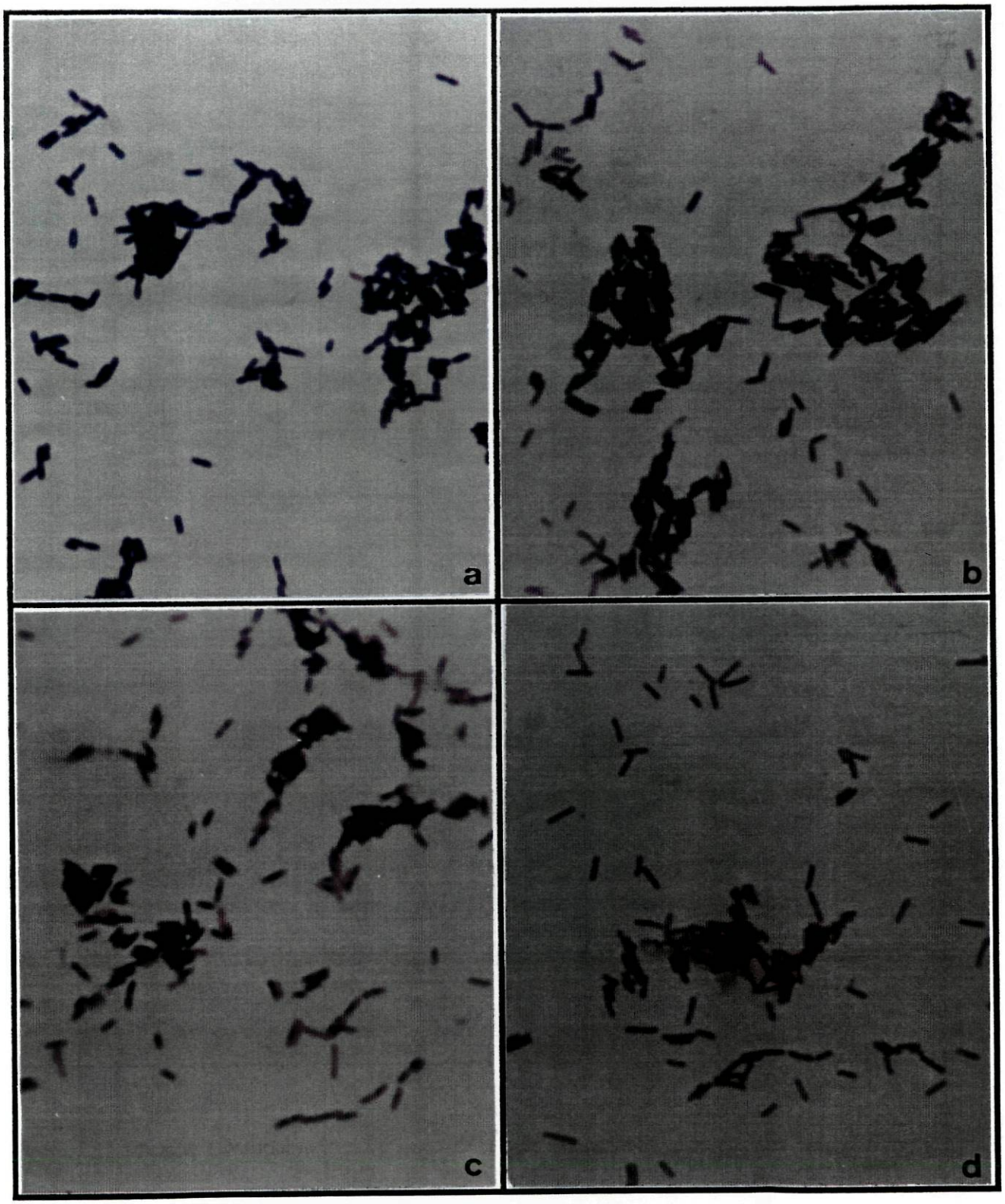


Figura 15 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *L. monocytogenes* após 15 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000x • **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

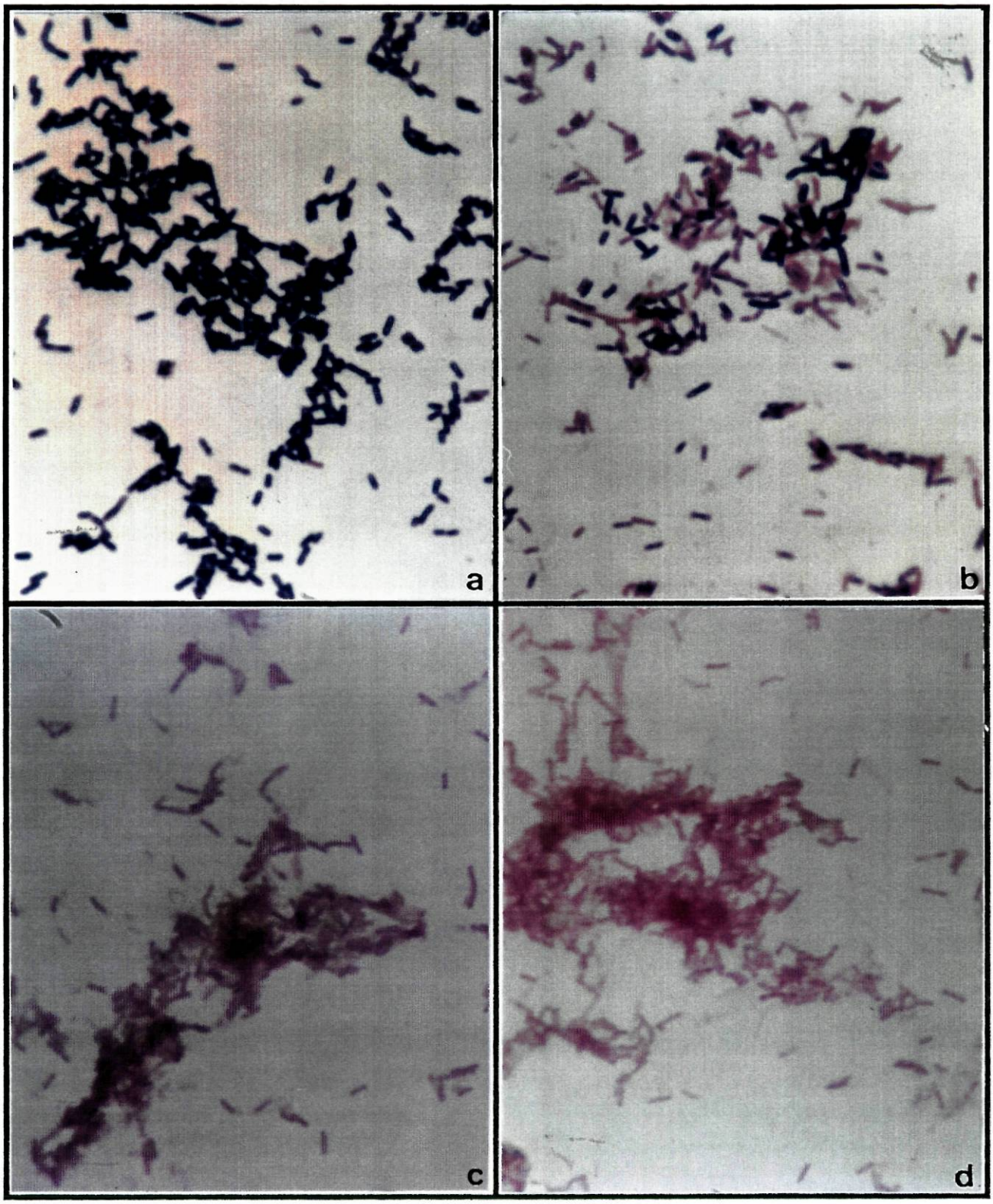


Figura 16 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 7,3) de *L. monocytogenes* após 60 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000x • **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

1.2 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0

1.2.1 - *B. cereus*

Os resultados obtidos nestas condições (Fig. 17) mereceram destaque pelo facto de se apresentarem diferentes dos referidos para PH 7,3 (Fig. 1). Em relação ao efeito sobre o número de células viáveis não se observou diferença significativa, se bem que seja de assinalar a ausência de tendência para a recuperação dos valores durante o tempo de ensaio e para todas as concentrações testadas (Fig. 17a).

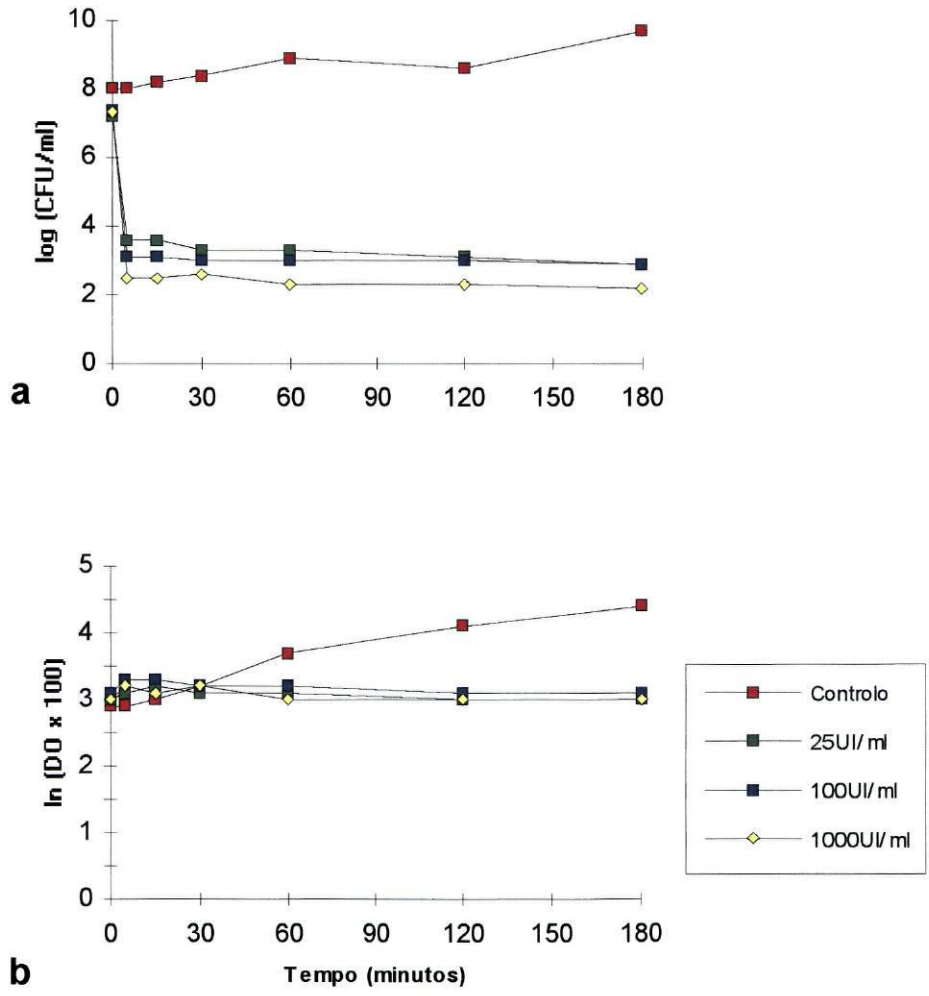


Figura 17 - Curvas de crescimento e morte de *B. cereus*, na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase exponencial de crescimento (TSB PH 5,0).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

A diferença surgiu em relação ao efeito sobre a densidade óptica das culturas. Ao compararmos a figura 1b com a figura 17b pudemos facilmente observar que enquanto a PH 7,3 a lise foi muito extensa, por descida acentuada nos valores de Absorvância a 550 nm, para PH 5,0 estes valores praticamente estabilizaram, após uma ligeira subida nos primeiros minutos que se seguiram à adição de qualquer uma das concentrações de nisina. Estes valores não sofreram descidas significativas durante as três horas seguintes (Fig. 17b).

Estudada a morfologia celular por microscopia óptica, após coloração de Gram, pudemos concluir que as diferenças observadas são concordantes com as anteriormente referidas em relação à densidade óptica. Não foram observados sinais de lise celular mesmo para 1000 UI/ml de nisina. Para um tempo de tratamento de 5 minutos os bacilos apresentaram uma reacção negativa ao Gram, na sua maioria, mas com uma morfologia aparentemente intacta, em comparação com o controlo. Alguns bacilos Gram positivo foram visíveis, particularmente para as concentrações de 25 e 100 UI/ml (Fig. 18). As imagens das amostras recolhidas aos 15 minutos foram muito idênticas às descritas para os minutos iniciais demonstrando que não foram grandemente afectadas com o tempo. Verificamos que a densidade óptica foi praticamente estável durante as três horas (Fig. 17b) e as microfotografias obtidas aos 60 minutos apoiaram esses dados pela ausência quase total de células em lise. Para este tempo, os bacilos surgiram com uma morfologia aparentemente normal e todos apresentaram uma reacção negativa ao Gram (Fig. 19), o que esteve de acordo com a descida muito acentuada do número de células viáveis (Fig. 17a). Formas bacilares muito longas foram observadas para a concentração de 1000 UI/ml (Fig. 19d).

Após 24 horas de incubação verificamos que os valores da densidade óptica não apresentaram variações significativas, que o número de células viáveis subiu para valores próximos do controlo e que as amostras coradas pelo Gram revelaram a presença de alguns bacilos com reacção positiva.

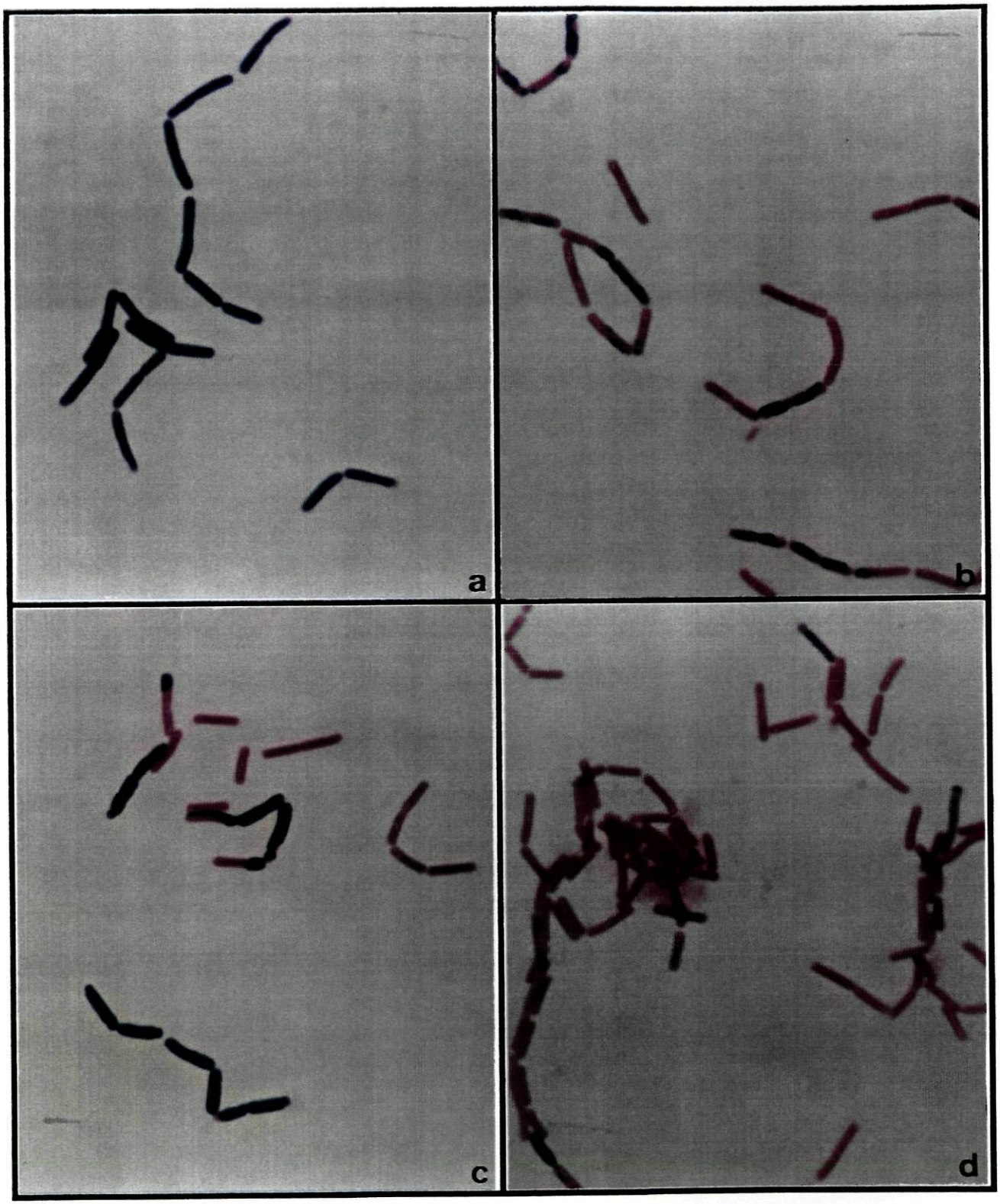


Figura 18 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 5,0) de *B. cereus* após 5 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

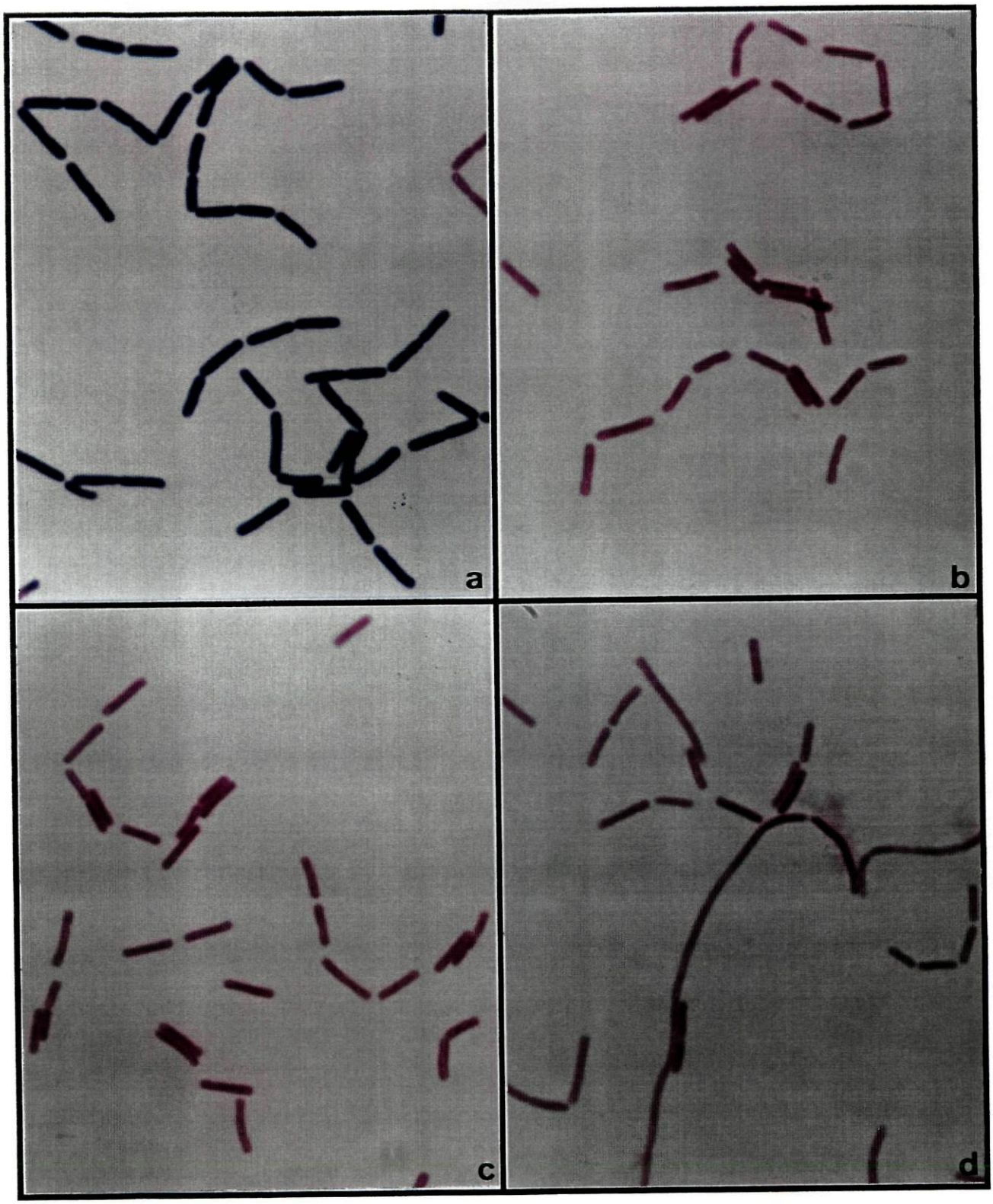


Figura 19 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 5,0) de *B. cereus* após 60 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.
• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

1.2.2 - *B. subtilis*

Tal como para *B. cereus*, também para *B. subtilis* os resultados do efeito da nisina sobre o número de células viáveis foram idênticos aos apresentados pelo tratamento de culturas obtidas em PH 7,3 (Fig. 5a). A recuperação dos valores não foi igualmente observada (Fig. 20a). Às 24 horas foi verificada uma subida para as concentrações de 25 e 100 UI/ml mas, com valores inferiores aos do controlo.

O efeito sobre a densidade óptica foi de manutenção quase constante dos valores, após muito ligeira subida nos primeiros 5 minutos, para todas as concentrações e durante todo o período de incubação estudado (Fig. 20b). Os valores de Absorvância foram mantidos até às 24 horas.

As figuras 21 e 22, de microscopia óptica, mostram-se concordantes com os resultados apresentados, em relação à viabilidade celular e à lise bacteriana.

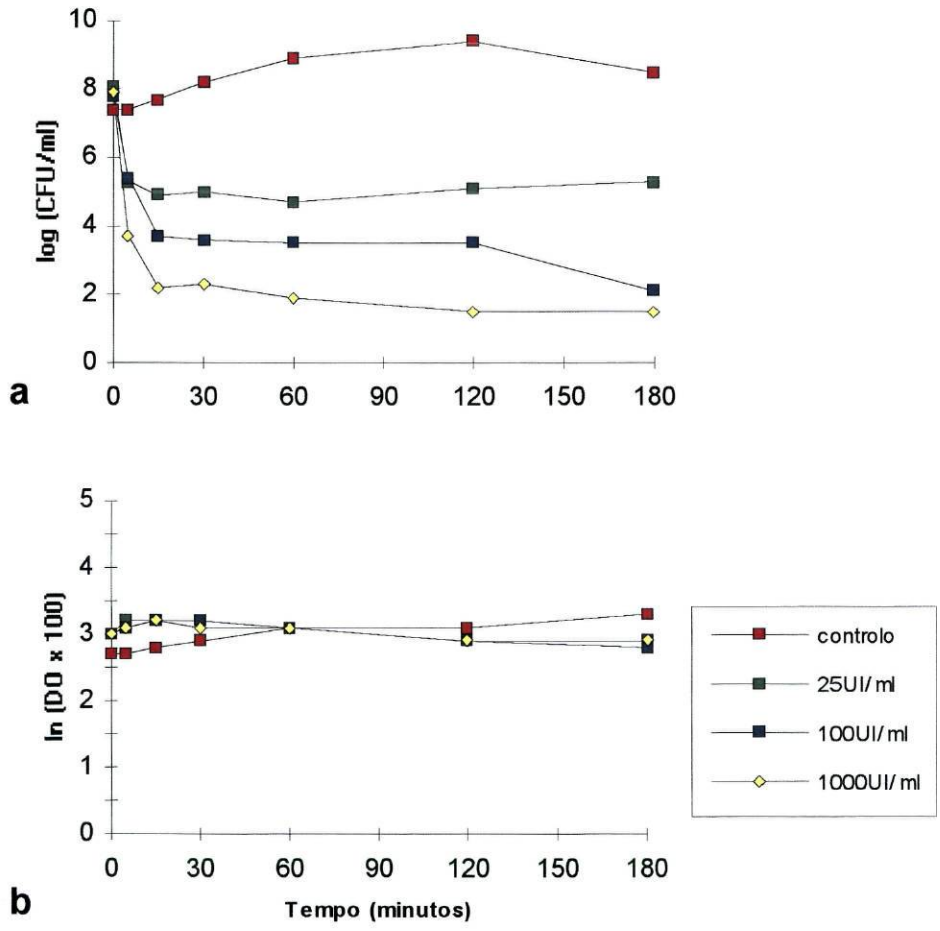


Figura 20 - Curvas de crescimento e morte de *B. subtilis,* na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase exponencial de crescimento (TSB PH 5,0).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

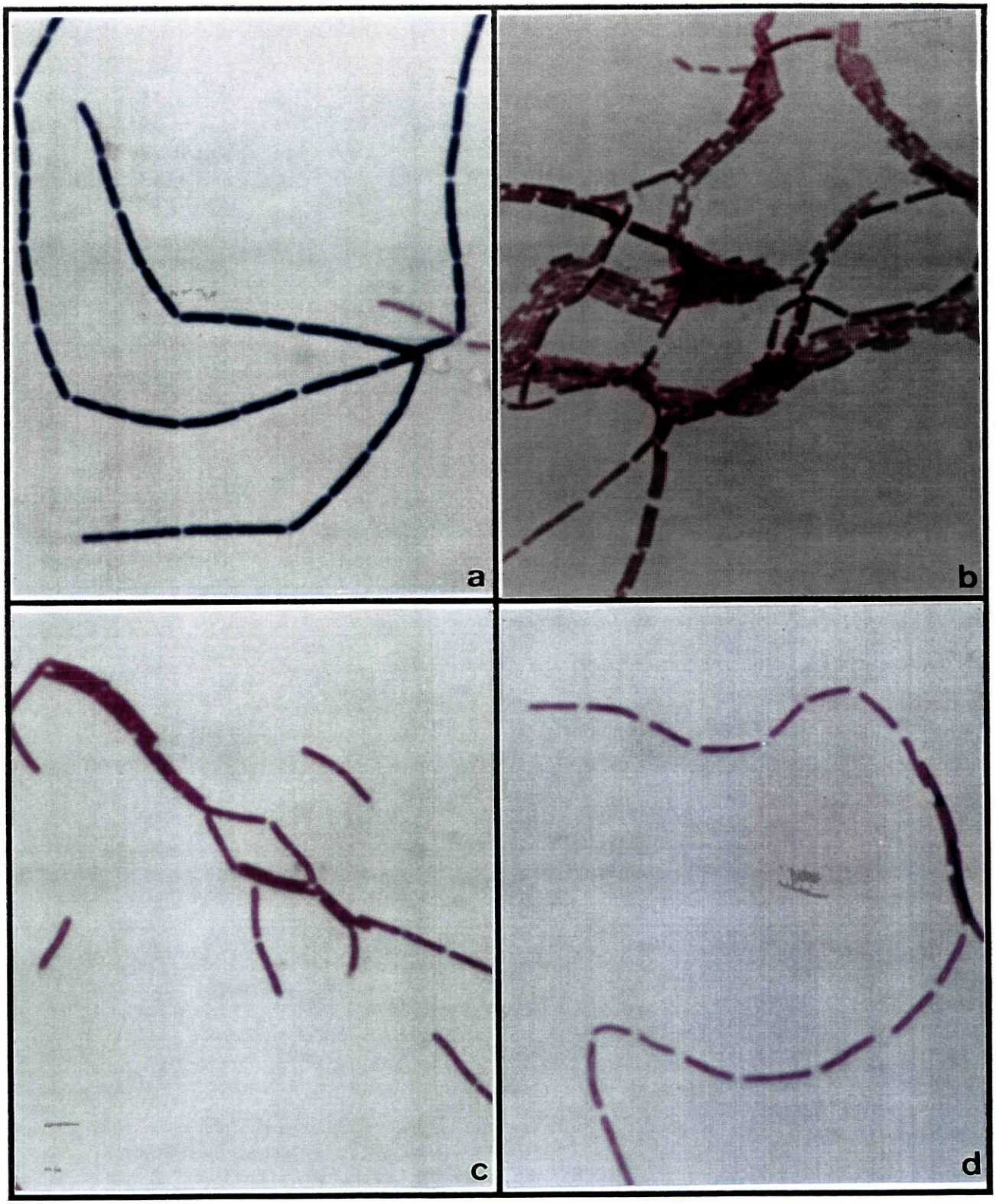


Figura 21 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 5,0) de *B. subtilis* após 5 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.
• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

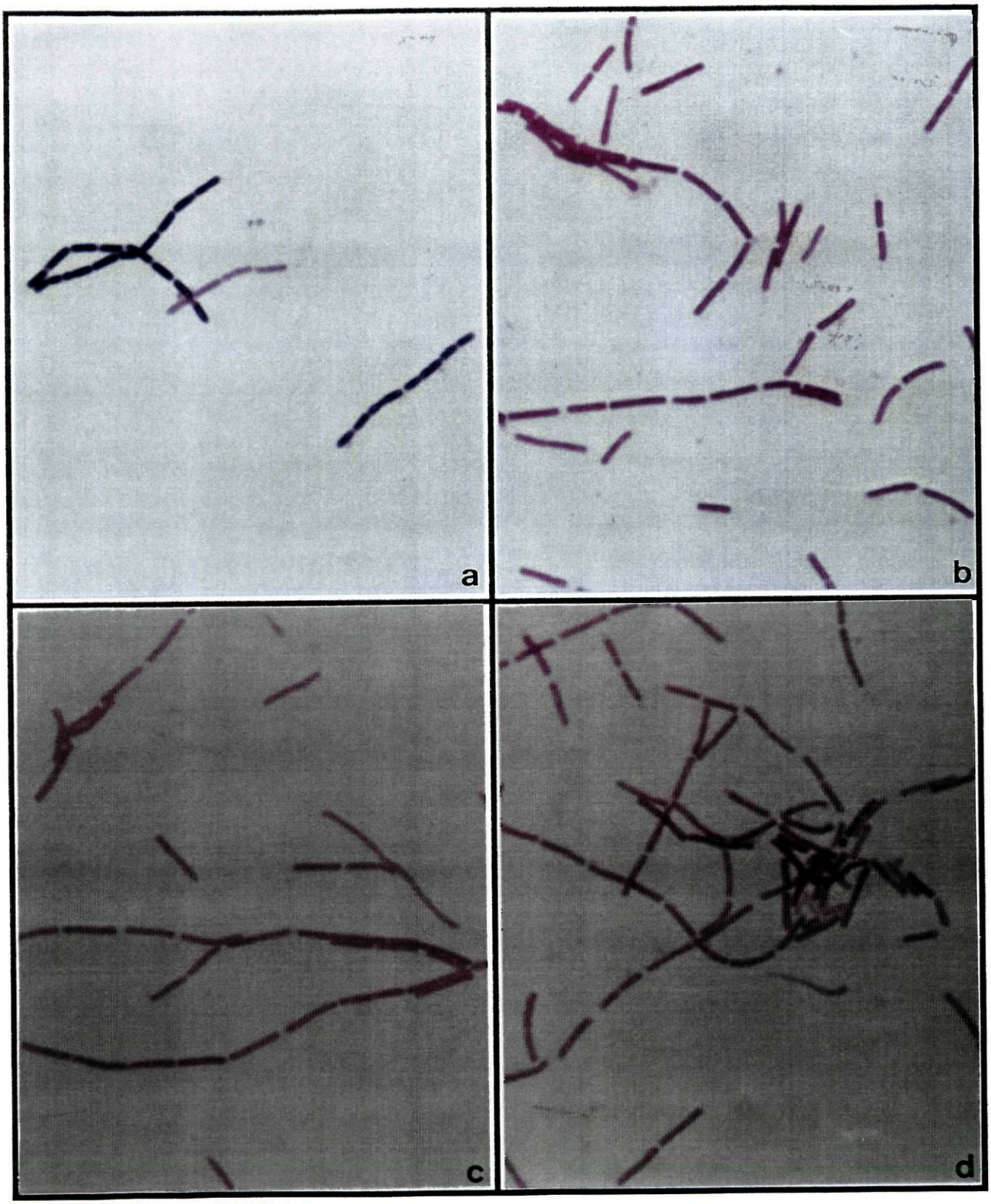


Figura 22 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 5,0) de *B. subtilis* após 60 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

1.2.3 - *E. faecium*

A nisina afectou a viabilidade celular das culturas obtidas a este PH de uma forma ligeiramente mais suave, particularmente para as concentrações mais baixas, quando comparado com o que aconteceu a PH 7,3 (Fig. 9a). De facto, e para a concentração de 25 UI/ml, as descidas foram pouco pronunciadas tendo-se verificado uma tendência para a recuperação, ao fim de 30 minutos. Para as concentrações mais elevadas as descidas foram bastante mais acentuadas não tendo sido observada recuperação, nas 4 horas de incubação (Fig. 23a).

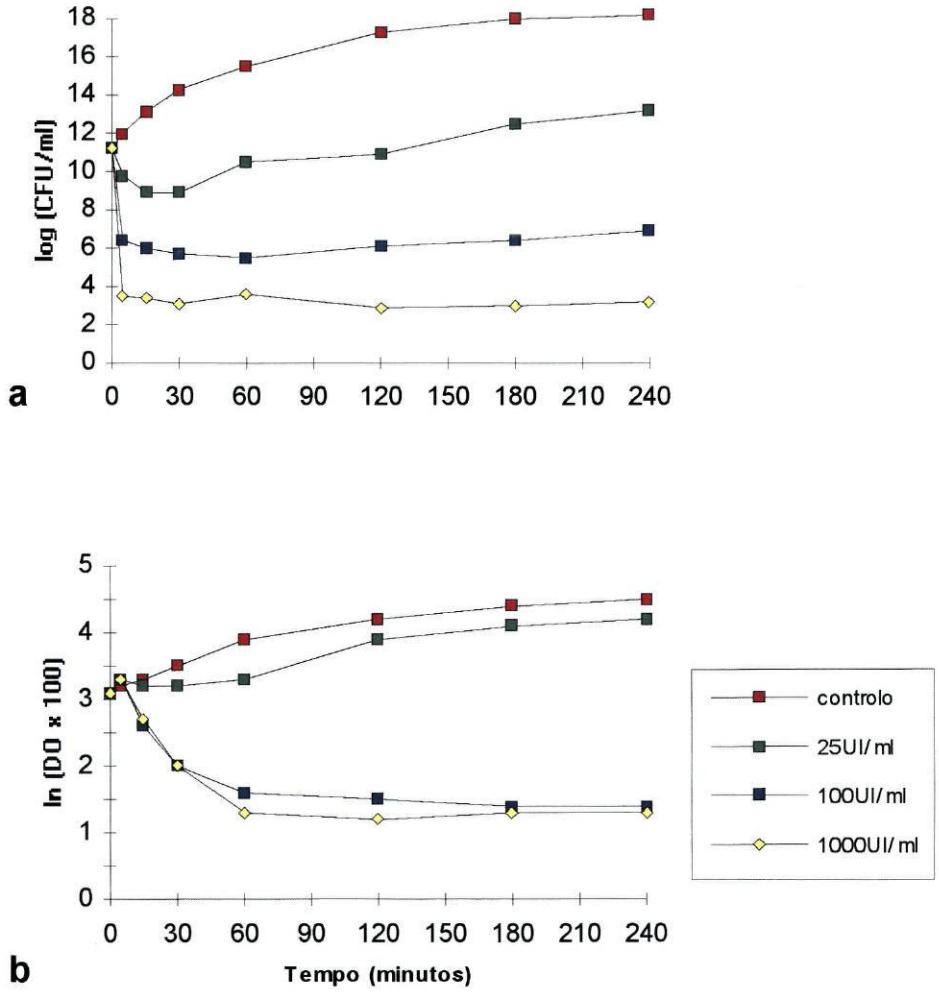


Figura 23 - Curvas de crescimento e morte de *E. faecium,* na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase exponencial de crescimento (TSB PH 5,0).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

O efeito sobre a densidade óptica da cultura mostrou-se significativamente diferente do observado nas mesmas condições para as outras três estirpes estudadas. As concentrações de 100 e 1000 UI/ml provocaram uma descida rápida e acentuada nos valores da Absorvância a 550 nm (Fig. 23b), idêntica à verificada para PH 7,3, mesmo mais rápida (Fig. 9b). Nítidas diferenças puderam ser observadas em relação ao tratamento com 25 UI/ml, por comparação nas figuras referidas. Se para PH 7,3 o grau de lise era idêntico para todas as concentrações, para PH 5,0 verificamos que a concentração de 25 UI/ml apenas provocou um ligeiro atraso no acréscimo da Absorvância.

Às 24 horas foi observada turvação para as culturas tratadas com 25 e 100 UI/ml sendo reduzida para 1000 UI/ml de nisina.

As microfotografias ópticas apresentadas na figura 24, relativas ao tempo de 5 minutos, mostraram que para a concentração de 25 UI/ml de nisina muitos cocos se mantiveram com morfologia e reacção ao Gram normais. Para as concentrações de 100 e 1000 UI/ml os sinais de lise não foram evidentes mas as células surgiram com uma coloração negativa. Aos 60 minutos pudemos observar uma diferença significativa entre o resultado de 25 UI/ml e o de 100 e 1000 UI/ml (Fig. 25). Para a concentração de 25 UI/ml, além de alguns cocos de morfologia ligeiramente alterada e com reacção negativa, foram visíveis muitos cocos Gram positivo, o que estava de acordo com a recuperação observada na viabilidade e densidade óptica (Fig. 23a,b). Para 100 e particularmente para 1000 UI/ml foram visíveis sinais de lise celular juntamente com cocos de morfologia aparentemente normal e apresentando reacção negativa à coloração (Fig. 25).

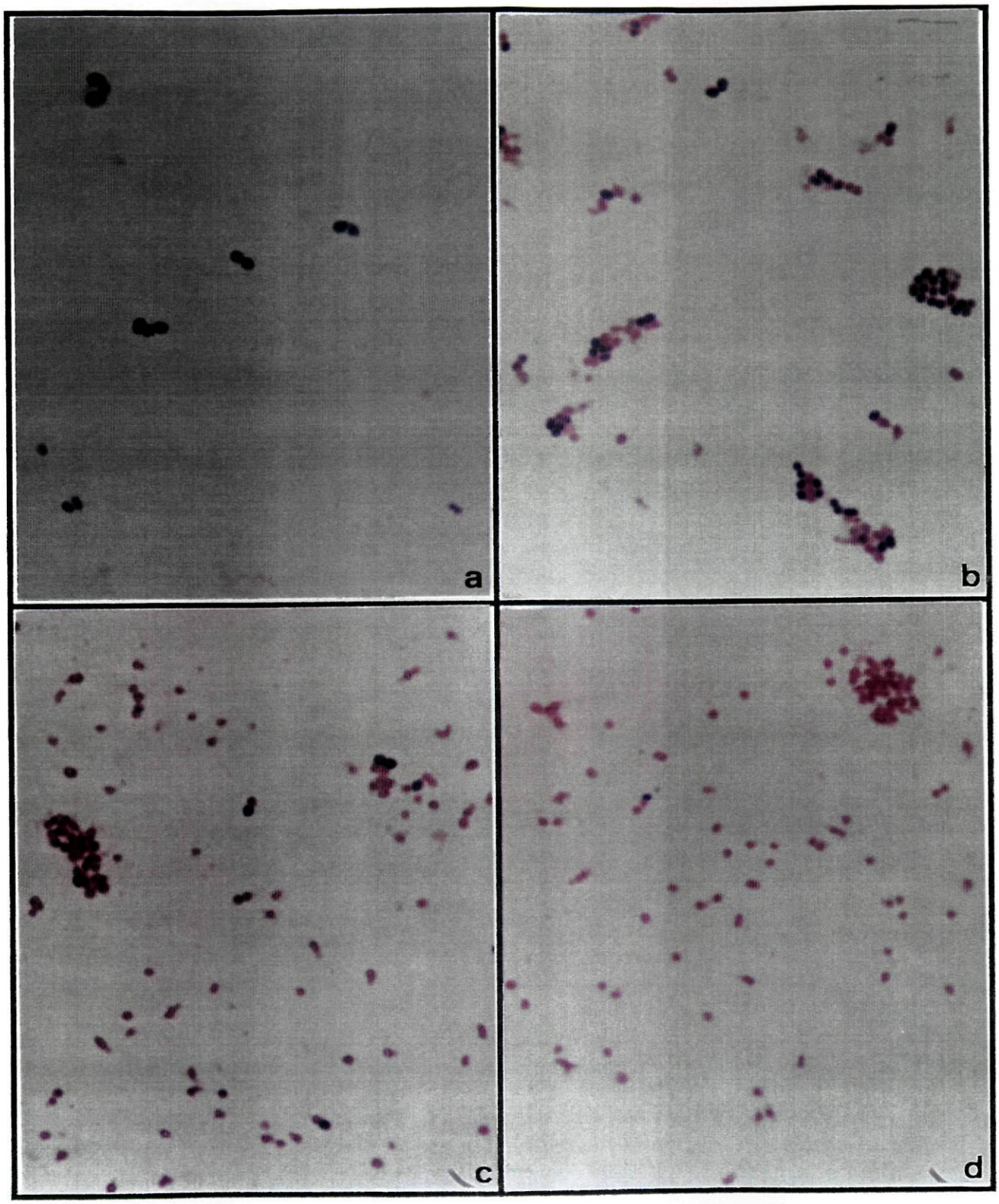


Figura 24 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 5,0) de *E. faecium* após 5 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

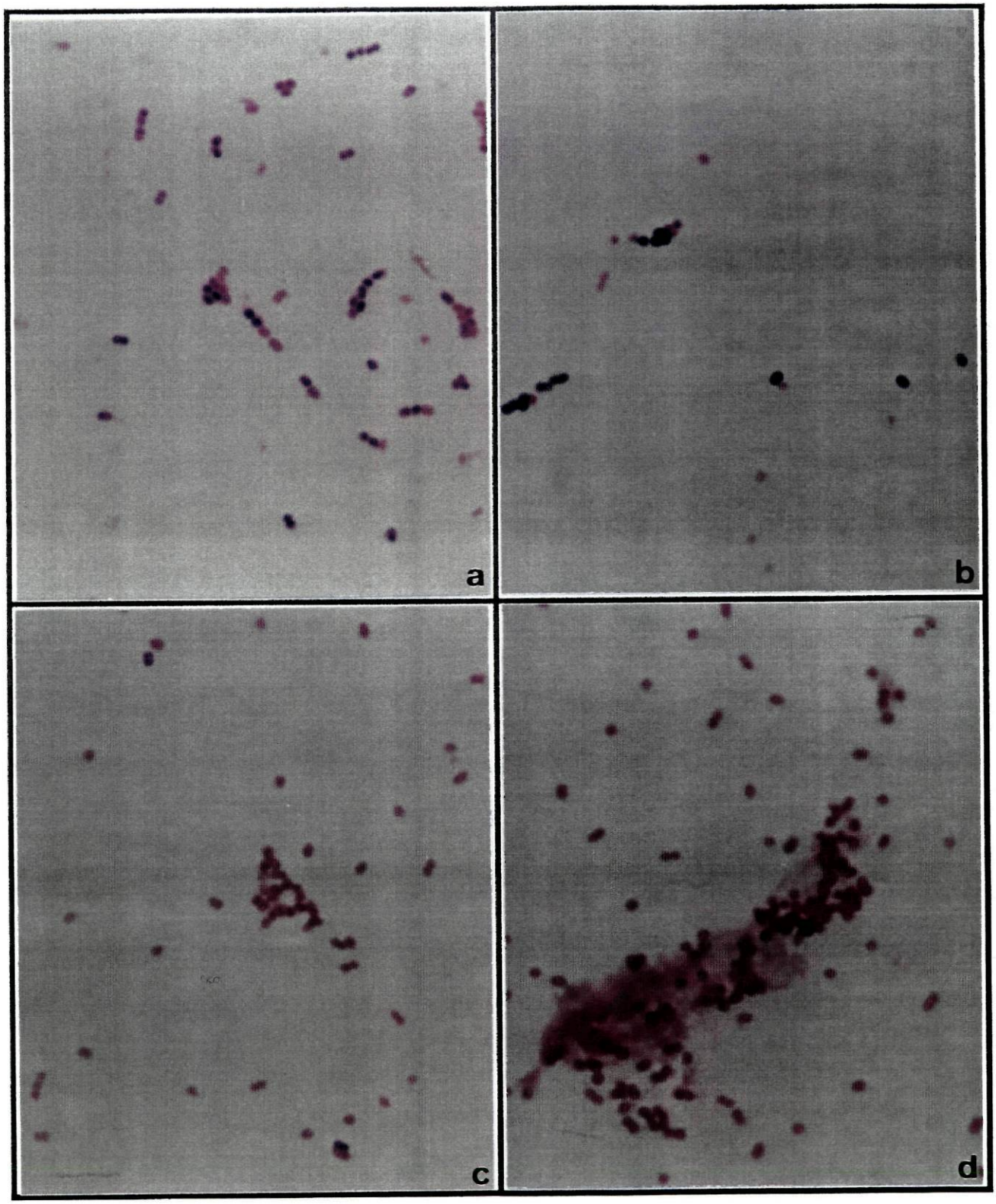


Figura 25 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 5,0) de *E. faecium* após 60 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.
• **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

1.2.4 - *L. monocytogenes*

De um modo geral, pudemos observar um desenvolvimento mais lento a PH 5,0, de todas as estirpes estudadas. Contudo, *L. monocytogenes* foi a que apresentou um desenvolvimento mais reduzido e mais lento a PH 5,0, quando comparado com PH 7,3. Este facto tornou difícil obter culturas com concentrações celulares idênticas às usadas para as outras estirpes bacterianas. Mesmo perante esta condição foram realizados os ensaios tendo-se obtido um resultado equivalente ao encontrado para *B. cereus* e *B. subtilis* ou seja, um efeito sobre a viabilidade celular mas uma manutenção dos valores da Absorvância.

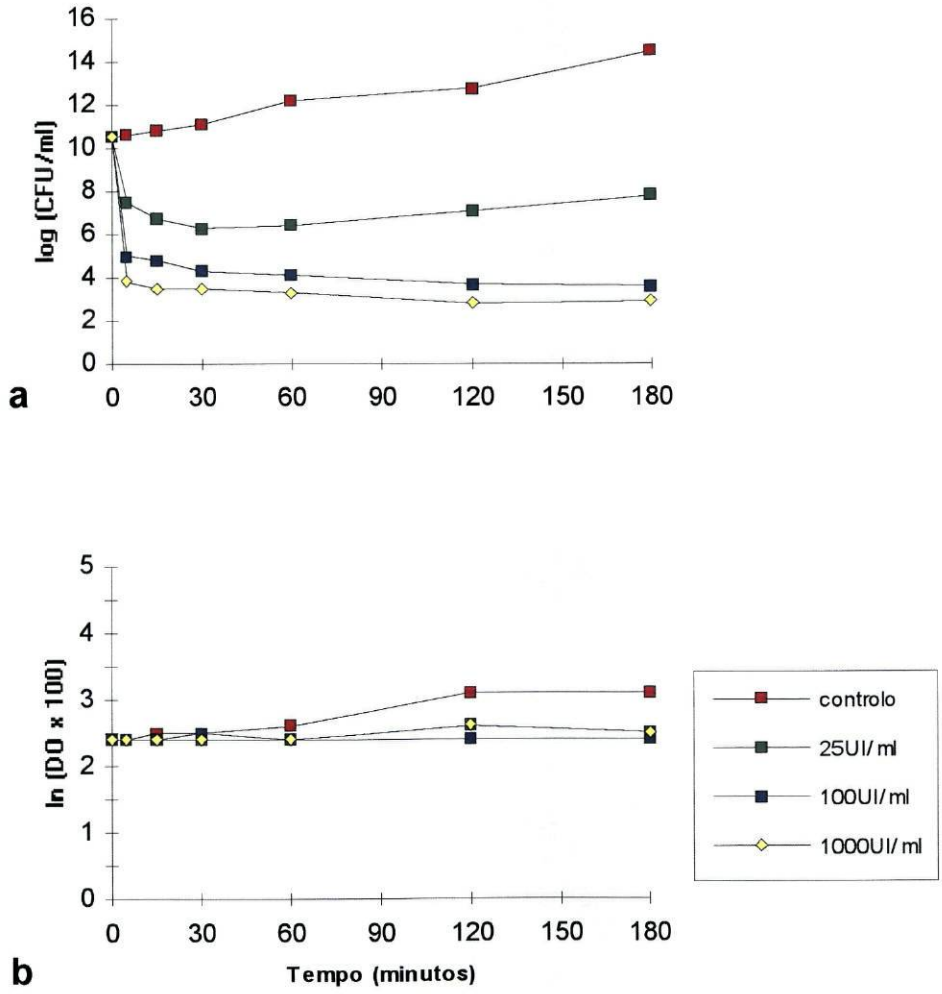


Figura 26 - Curvas de crescimento e morte de *L. monocytogenes,* na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase exponencial de crescimento (TSB PH 5,0).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

O efeito sobre a viabilidade foi dependente da concentração de nisina e decorreu nos primeiros minutos de actuação (Fig. 26a). Para a concentração de 25 UI/ml a resposta foi mais acentuada para PH 5,0 do que para PH 7,3, tendo sido igualmente verificada uma tendência para a recuperação dos valores a partir dos 60 minutos, mas muito mais lenta.

A densidade óptica não sofreu alterações significativas para qualquer das concentrações estudadas e durante as 3 horas (Fig. 26b).

A microscopia óptica nessas condições revelou uma morfologia dos bacilos alterada, formas aberrantes, e uma reacção heterogénea ao Gram, mesmo para as culturas controlo (Figs. 27a e 28a). O tratamento com nisina resultou em imagens que não diferiram muito das do controlo relativamente à morfologia, aparecendo contudo menor número de bactérias Gram positivo. Não se observaram diferenças significativas com o tempo ou com a concentração de nisina (Figs. 27 e 28). Aos 60 minutos e para uma concentração de 25 UI/ml foram visíveis algumas células com coloração positiva (Fig. 28b).

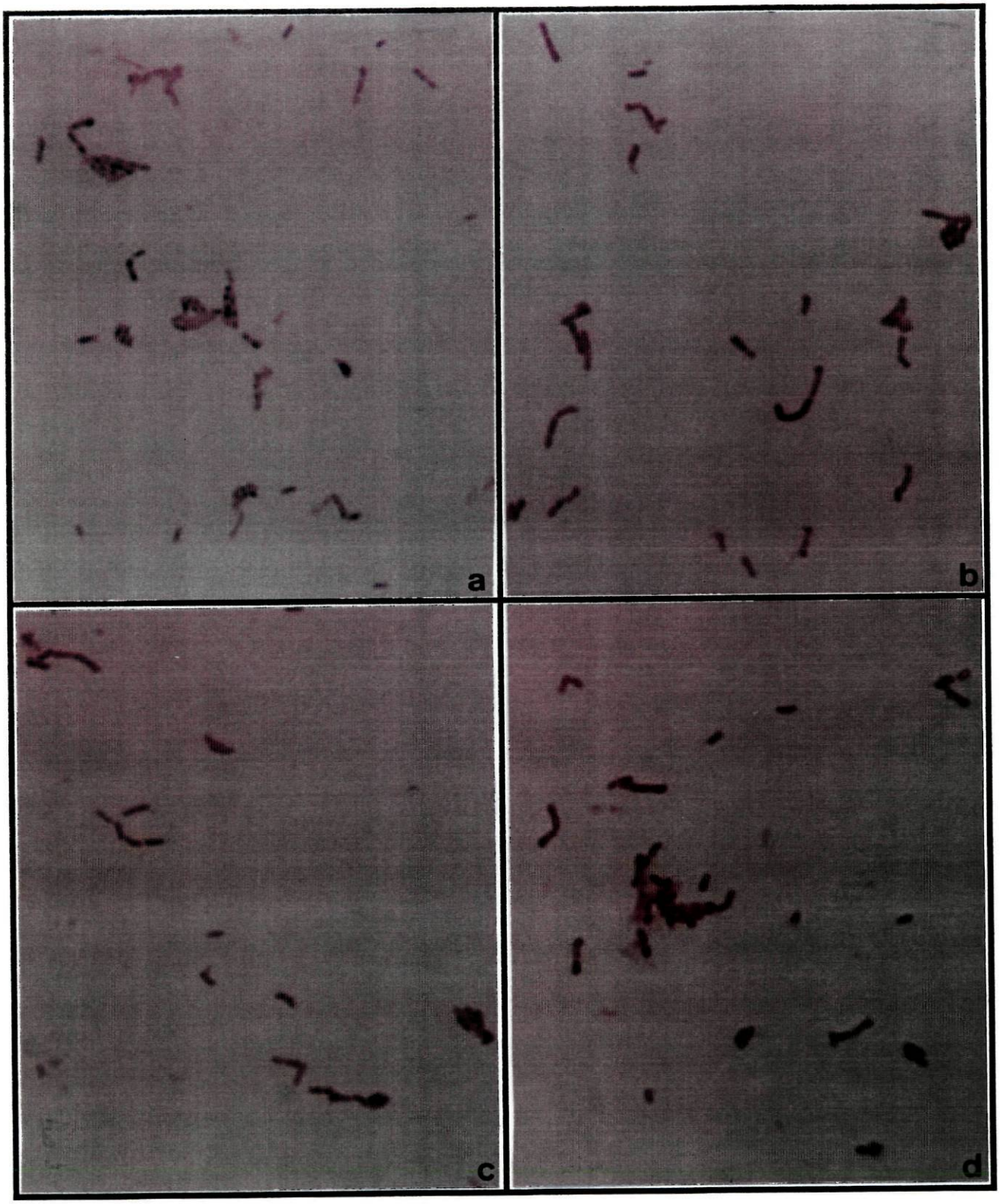


Figura 27 - Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 5,0) de *L. monocytogenes* após 5 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x. • **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

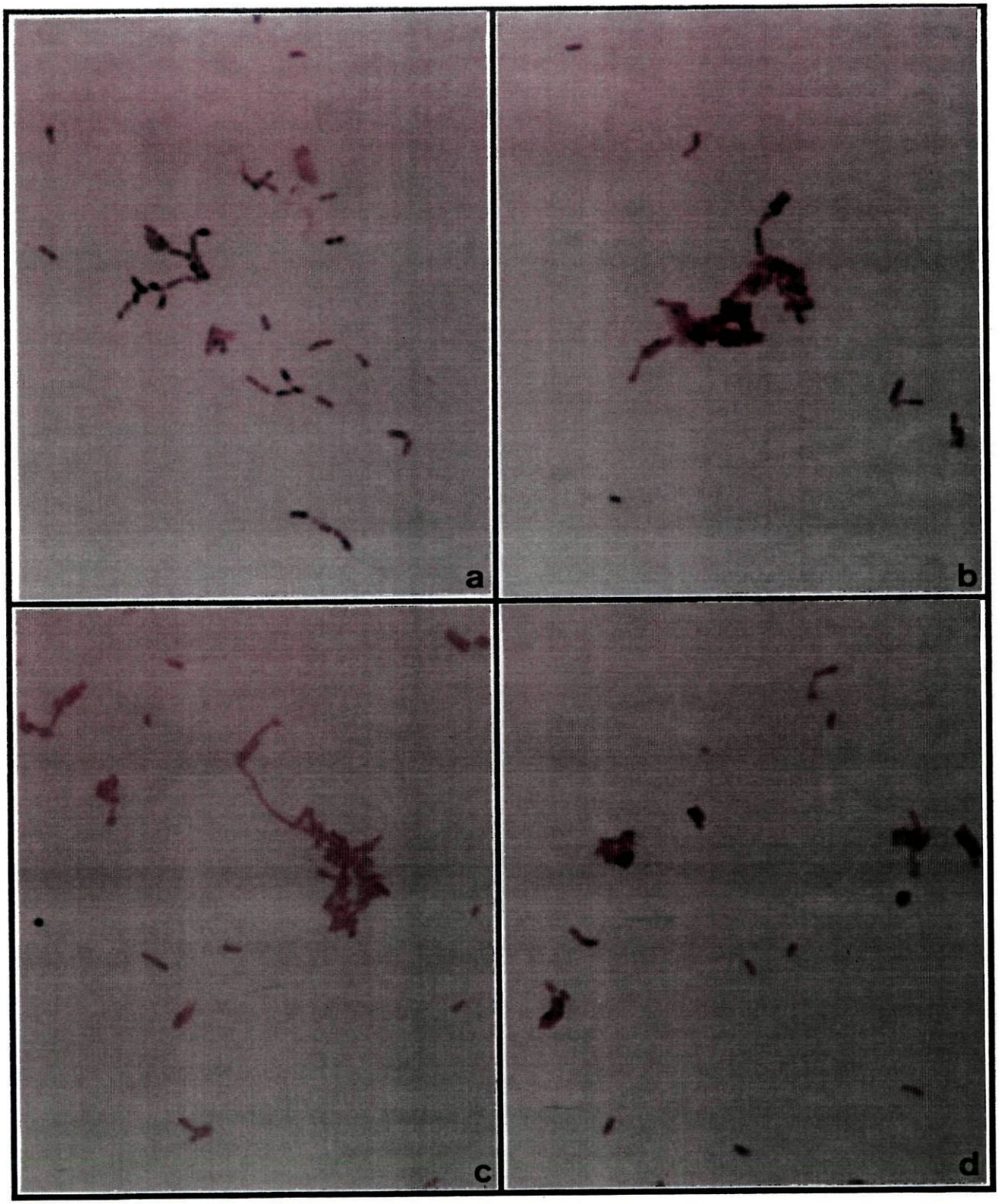


Figura 28- Microfotografias ópticas de amostras de culturas exponenciais (TSB PH 5,0) de *L. monocytogenes* após 60 minutos de tratamento com diferentes concentrações de nisina. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000x • **a** - Controlo; • **b** - 25 UI/ml; • **c** - 100 UI/ml; • **d** - 1000 UI/ml.

1.3 - Culturas na fase estacionária em meio de TSB PH 7,3

Após termos verificado o efeito da nisina sobre culturas das diferentes estirpes na fase exponencial, efectuamos um estudo paralelo mas usando as culturas numa fase estacionária.

No contexto geral observamos que a resposta foi menos acentuada ou bastante mais lenta, conforme as situações, em relação à viabilidade celular. Curioso foi o efeito observado sobre a densidade óptica das culturas, podendo quase dizer-se que os resultados foram sobreponíveis aos obtidos nas culturas exponenciais, mas a PH 5,0.

1.3.1 - *B. cereus*

O comportamento desta estirpe revelou-se diferente nesta situação. As descidas nos valores de CFU/ml foram bastante menos acentuadas e mais dependentes da concentração (Fig. 29a).

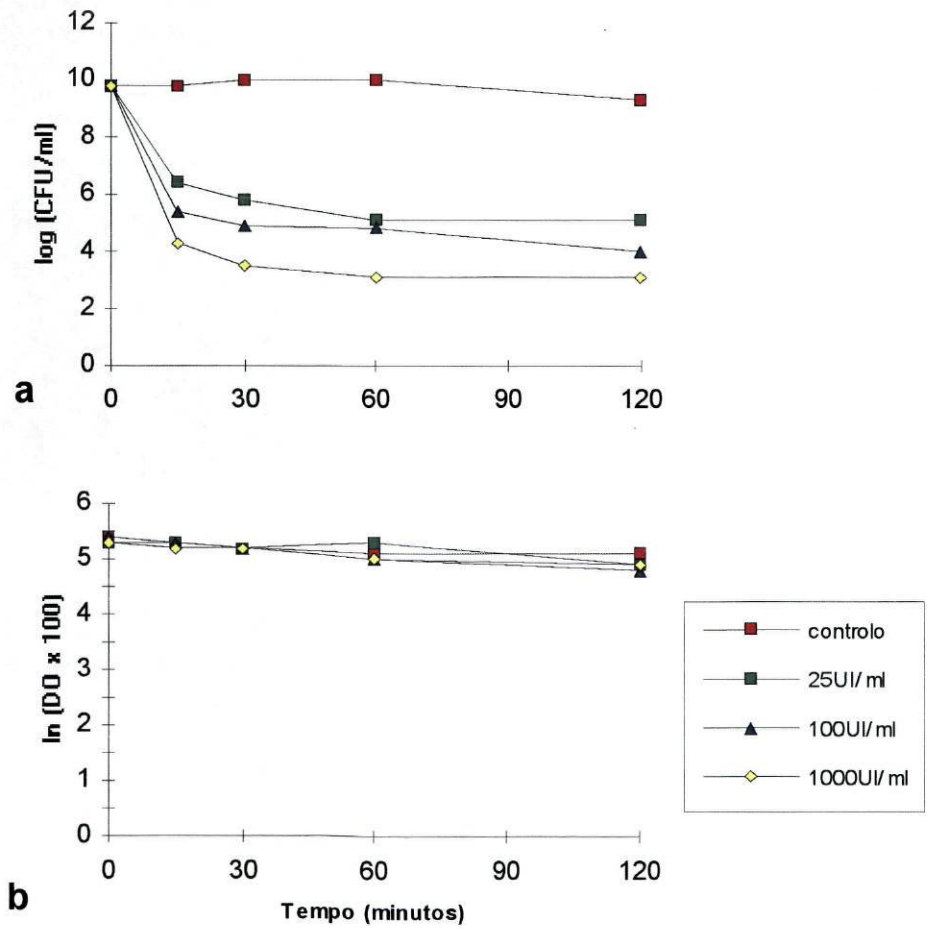


Figura 29 - Curvas de crescimento e morte de *B. cereus,* na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase estacionária de crescimento (TSB PH 7,3).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

Relativamente à Absorvância não se verificou qualquer diferença significativa em relação ao controlo, pelo que se deduz que não ocorreu lise celular (Fig. 29b).

Uma leitura efectuada às 24 horas revelou uma manutenção da densidade óptica e um acréscimo nos valores de CFU/ml.

1.3.2 - *B. subtilis*

25 UI/ml de nisina não afectaram com significado os valores de CFU/ml. Concentrações mais elevadas mostraram efeitos sobre este parâmetro mas mais discretos, particularmente para 100 UI/ml e com recuperação lenta ao fim de 15 minutos de actuação (Fig. 30a). Tal como para *B. cereus*, não se registou qualquer alteração significativa na turvação das culturas (Fig. 30b).

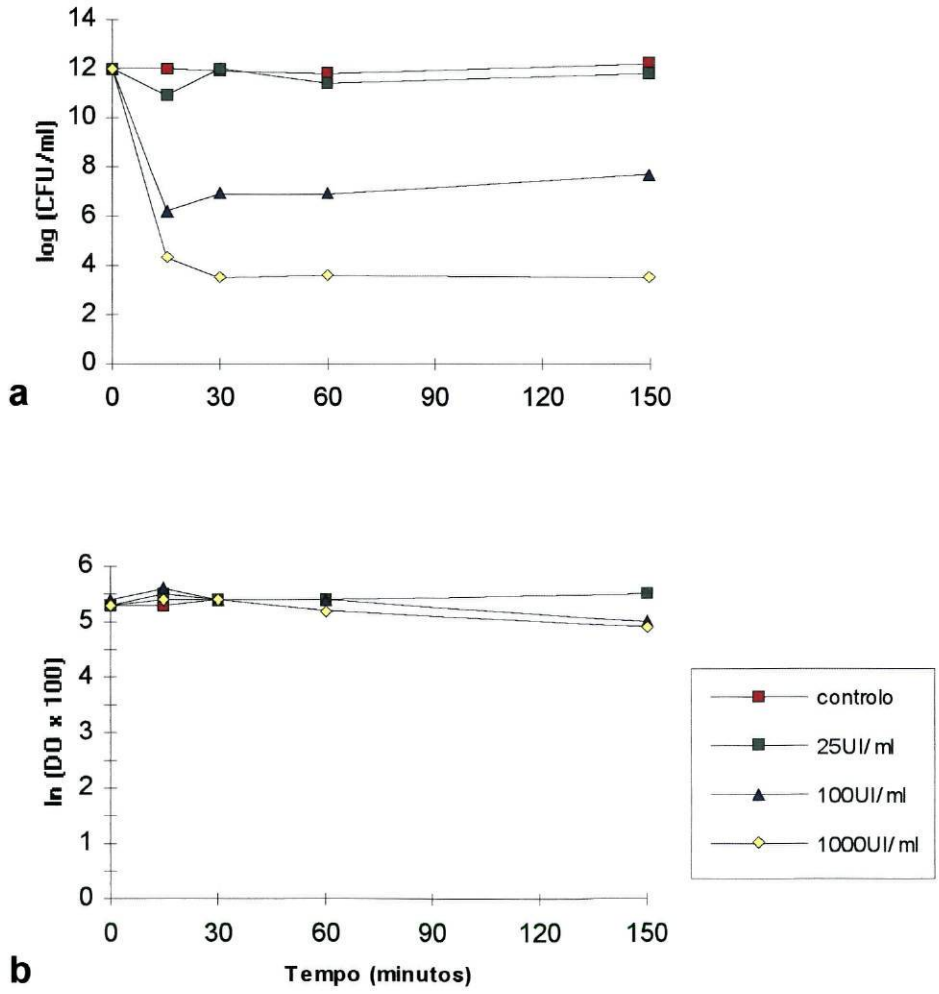


Figura 30 - Curvas de crescimento e morte de *B. subtilis*, na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase estacionária de crescimento (TSB PH 7,3).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

1.3.3 - *E. faecium*

Nestas condições, e para esta estirpe, verificamos que as concentrações de 25 e de 100 UI/ml não afectaram a viabilidade celular. A concentração de 1000 UI/ml reflectiu-se numa descida pouco pronunciada do número de CFU/ml, com o tempo (Fig. 31a).

A lise celular não ocorreu, estabililidade verificada nos valores da Absorvância, com excepção para a concentração de 1000 UI/ml onde verificamos um ligeiro decréscimo desses valores ao longo de toda a incubação (Fig. 31b). Será curioso assinalar que em TSB PH 5,0 a única estirpe que sofreu lise celular foi exactamente o *E. faecium* e para as concentrações de 100 e 1000 UI/ml, se bem que bastante mais brusca e acentuada (Fig. 23b).

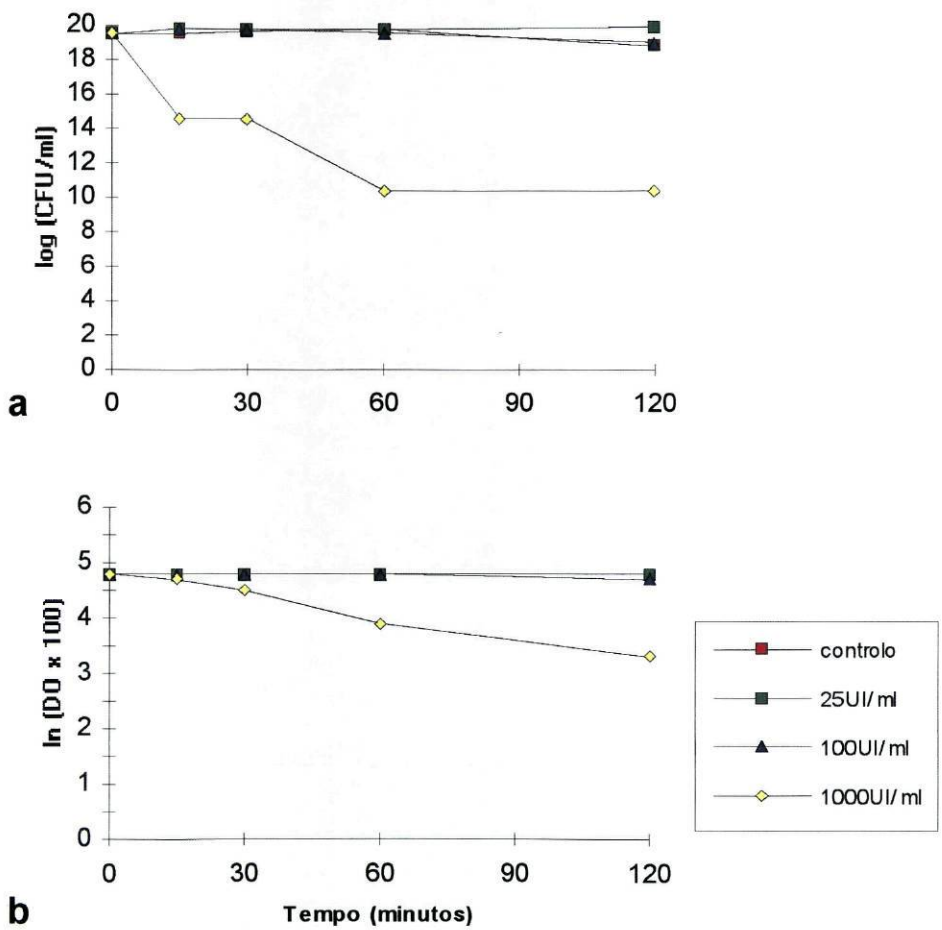


Figura 31 - Curvas de crescimento e morte de *E. faecium,* na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase estacionária de crescimento (TSB PH 7,3).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

1.3.4 - *L. monocytogenes*

A viabilidade celular não foi muito alterada pela adição de 25 UI/ml, efeito que já se tinha mostrado reduzido para as culturas exponenciais em TSB PH 7,3. Para uma concentração de 100 UI/ml a principal diferença foi observada em relação à velocidade de descida dos valores de CFU/ml. A descida foi brusca e acentuada para a concentração de 1000 UI/ml (Fig. 32a).

A bacteriólise não ocorreu nestas condições, o que se pôde concluir pela estabilização dos valores da Absorvância a 550 nm, como tinha acontecido para as restantes estirpes e para todas as concentrações ensaiadas (Fig. 32b).

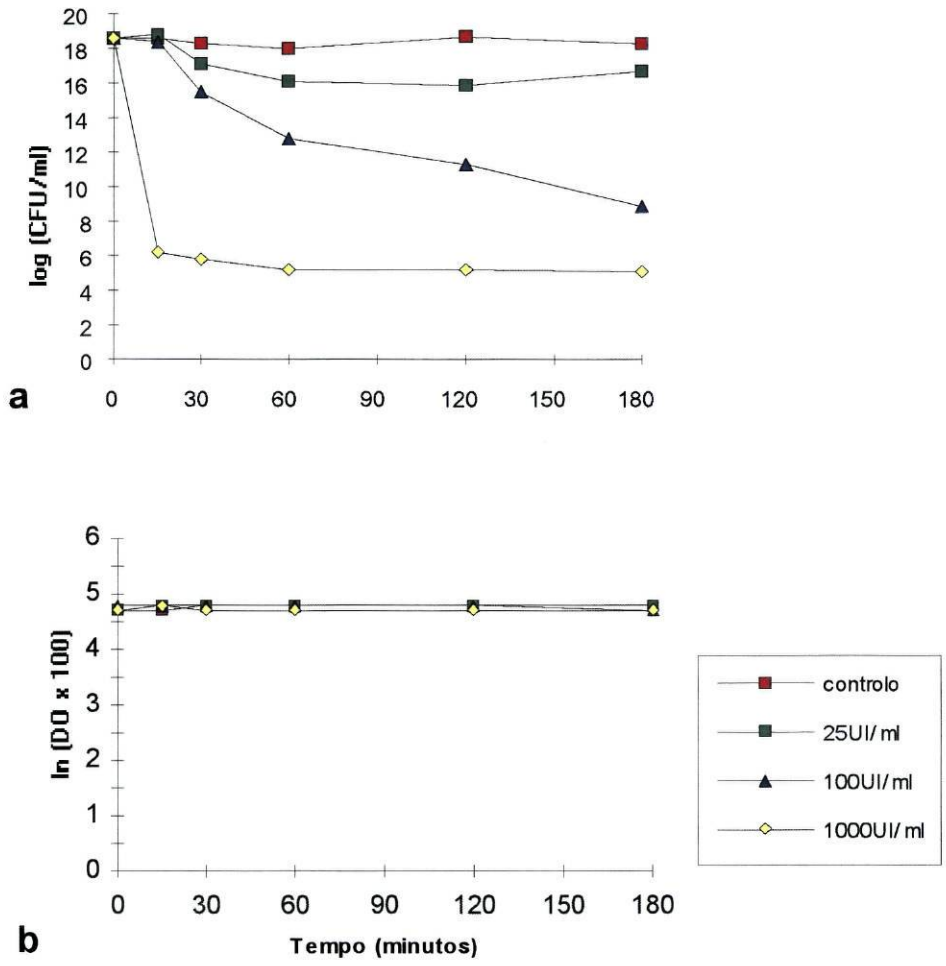


Figura 32 - Curvas de crescimento e morte de *L. monocytogenes,* na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase estacionária de crescimento (TSB PH 7,3).

- **a** - Efeito avaliado sobre a viabilidade das células.
- **b** - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

1.4 - Culturas das diferentes espécies bacterianas, em meio de TSB PH 7,3, na presença de nisina

Escolhidas as concentrações de nisina de 25, 100 e 1000 UI/ml, estudamos o efeito da sua adição no tempo zero da cultura e as alterações da cinética de crescimento por elas provocadas durante as primeiras 5 a 7 horas de incubação em meio de TSB PH 7,3.

Verificamos que a concentração de 25 UI/ml teve maior efeito sobre *B. cereus* (Fig. 33a). Para as restantes estirpes apenas foi evidente um atraso no desenvolvimento, relativamente ao controlo (Fig. 33b,c,d). A concentração de 100 UI/ml não alterou significativamente a cinética de crescimento para *B. subtilis*, ao contrário das outras espécies (Fig. 33b). Relativamente à concentração de 1000 UI/ml a inibição de crescimento verificou-se em todas as situações.

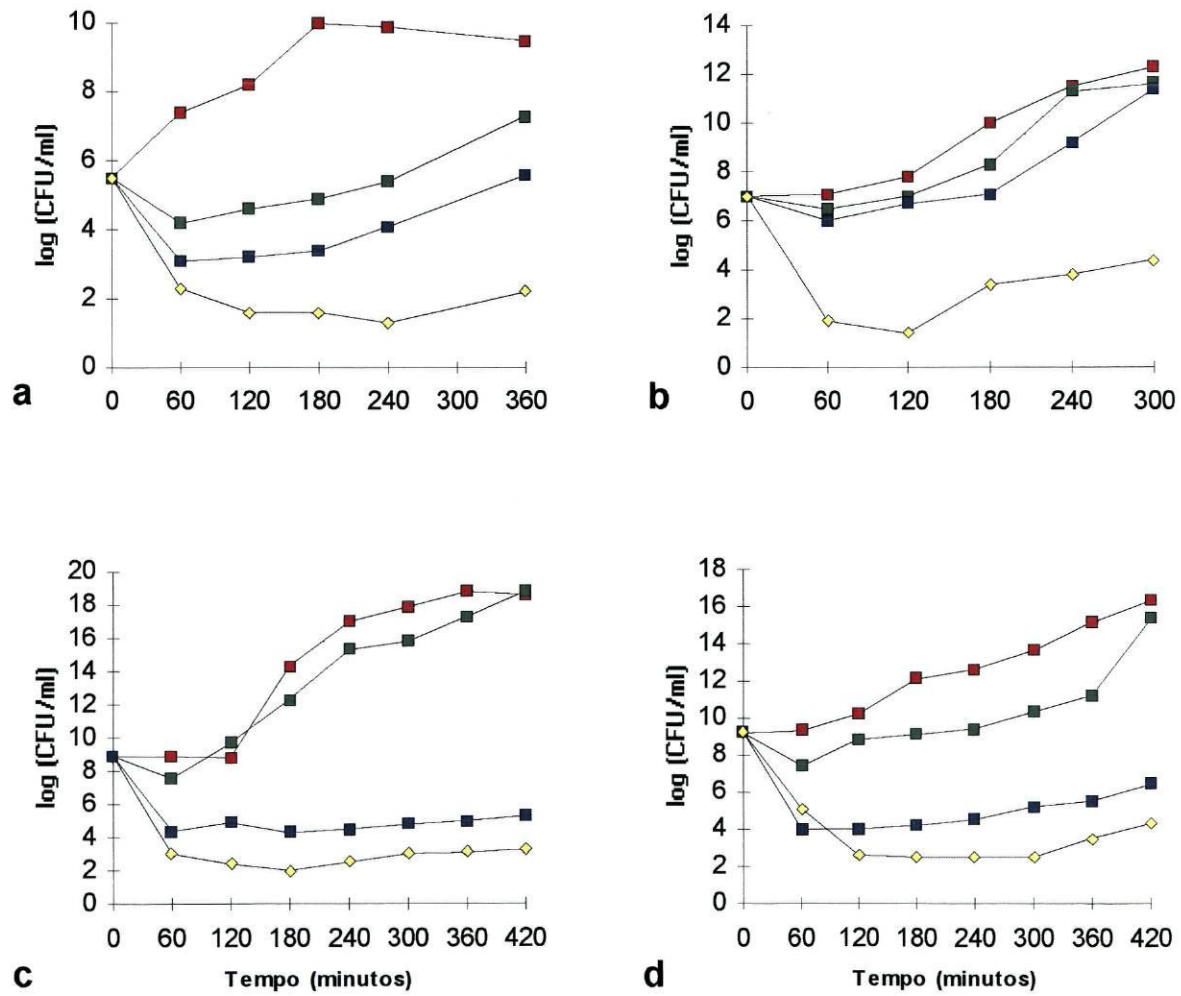


Figura 33 - Curvas de crescimento e morte de: **a-** *B. cereus*, **b-** *B. subtilis*, **c-** *E. faecium*, **d-** *L. monocytogenes*. Efeito sobre culturas na fase inicial (TSB PH 7,3), avaliado sobre a viabilidade celular: ■ controlo, ■ 25 UI/ml, ■ 100 UI/ml, ■ 1000 UI/ml de nisina.

Avaliada a turvação, verificamos que esta se manteve muito baixa para todas as culturas tratadas com 100 ou 1000 UI/ml de nisina (Fig. 34). Uma excepção foi verificada para o *B. subtilis* e a concentração de 100 UI/ml em que a Absorvância subiu rapidamente após um período de 2 horas (Fig. 34b). A concentração de 25 UI/ml apenas provocou atrasos no acréscimo normal da Absorvância, com excepção do *B. cereus,* para o qual se verificou subida dos valores apenas ao fim de 4 horas de incubação (Fig. 34a).

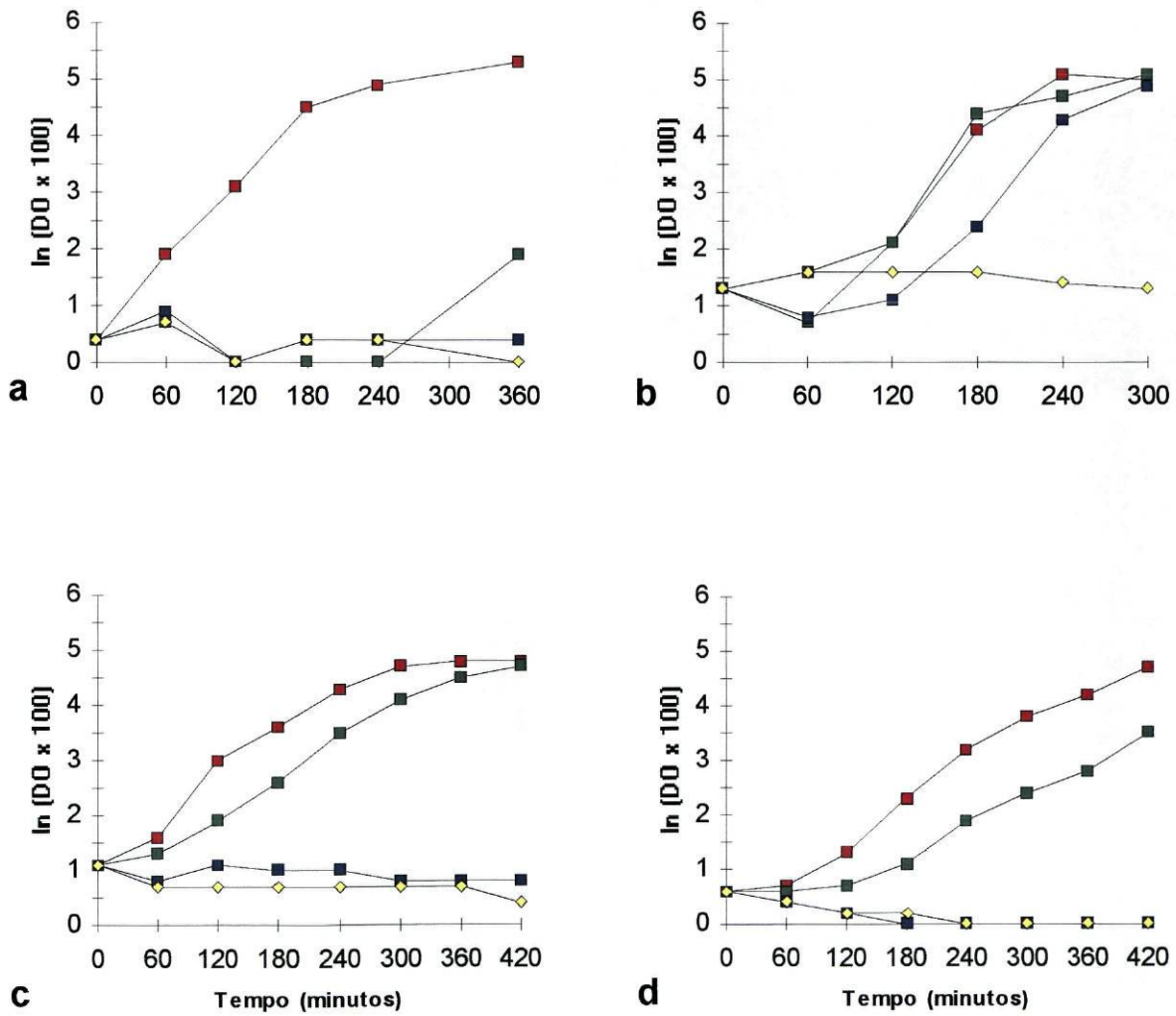


Figura 34 - Curvas de crescimento e morte de: **a-** *B. cereus*, **b-** *B. subtilis*, **c-** *E. faecium*, **d-** *L. monocytogenes*. Efeito sobre culturas na fase inicial (TSB PH 7,3), avaliado sobre a densidade óptica, por determinação da Abs a 550 nm: ■ controlo, ■ 25 UI/ml, ■ 100 UI/ml , ◆ 1000 UI/ml de nisina.

1.5 - Estudo espectrofotométrico do efeito da nisina sobre *B. cereus* sucessivamente isolado de culturas em TSB PH 7,3 adicionadas de 100 UI/ml de nisina

Nos vários estudos efectuados verificamos, para algumas situações, uma inibição do crescimento com descida dos valores da turvação e da viabilidade celular, seguida de uma recuperação.

Verificamos que o *B. cereus* que conseguiu crescer em meio de gelose contendo 500 UI/ml de nisina reagiu da mesma forma, quando tratado em cultura de TSB PH 7,3 com 25 UI/ml. Com o objectivo de testar a resistência adquirida, por contacto com a nisina, foram efectuados ensaios em que a bactéria foi sistematicamente isolada das culturas tratadas com 100 UI/ml de nisina.

❶ Como padrão foi usada uma cultura de *B. cereus* selvagem (nunca sofreu tratamento com nisina). ❷ O inóculo inicial foi constituído pela bactéria que se desenvolveu após 24 horas de tratamento com 100 UI/ml de nisina. ❸ Foi efectuada uma curva controlo a partir da cultura indicada em ❷. As curvas controlo e padrão foram sobreponíveis (Fig. 35a).

❹ O efeito da nisina foi estudado usando a concentração de 100 UI/ml sobre uma cultura exponencial obtida a partir de ❷. Os resultados indicaram uma resposta idêntica à adição da nisina, por parte da bactéria.

Após 24 horas de incubação da cultura tratada ❹, foi retirado um inóculo para novas culturas:

❺ cultura controlo a qual mostrou um comportamento equivalente à curva padrão; ❻ cultura exponencial tratada com 100 UI/ml de nisina. O efeito da nisina mostrou-se diferente do anteriormente observado, com um ligeiro decréscimo dos valores da densidade óptica durante os primeiros 30 minutos e uma rápida recuperação, atingindo os valores do controlo às 4 horas (Fig. 35b). A bactéria desenvolvida ao fim de 24 horas na cultura anterior, ❻, foi usada como inóculo para: ❼ cultura controlo, a qual mais uma vez mostrou um desenvolvimento idêntico ao do padrão; ❽ cultura exponencial tratada com 100 UI/ml de nisina. Verificamos que as curvas controlo e da amostra tratada foram perfeitamente sobreponíveis, ou seja não se verificou qualquer efeito da nisina sobre esta cultura (Fig. 35c).

O *B. cereus* desenvolvido na cultura anterior, ❽, foi usado para verificar a sua sensibilidade à nisina (50 UI/ml), adicionada na fase inicial da cultura (Fig. 36). Apenas observamos um efeito sobre o desenvolvimento na estirpe selvagem.

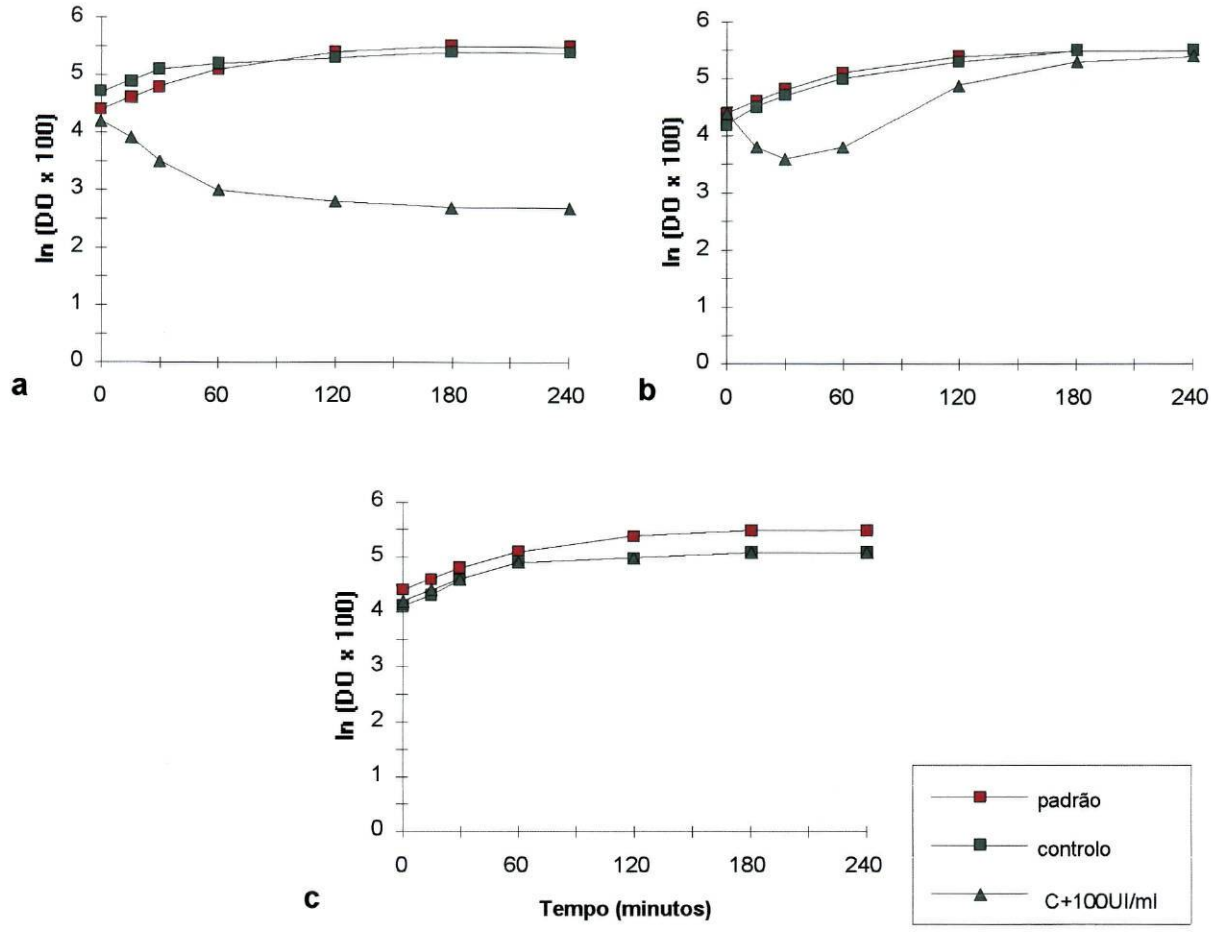


Figura 35 - Curvas de crescimento e morte de *B. cereus* em meio de TSB PH 7,3: ■ padrão (sem qualquer contacto prévio com nisina); ■ controlo (estirpe isolada sucessivamente após 24 horas de incubação em cultura tratada com 100 UI/ml de nisina); ▲ 100 UI/ml (a mesma estirpe usada no controlo em cultura adicionada na sua fase exponencial de 100 UI/ml de nisina). • **a** - Uma vez 100 UI/ml; • **b** - Duas vezes 100 UI/ml; • **c** - Três vezes 100 UI/ml.

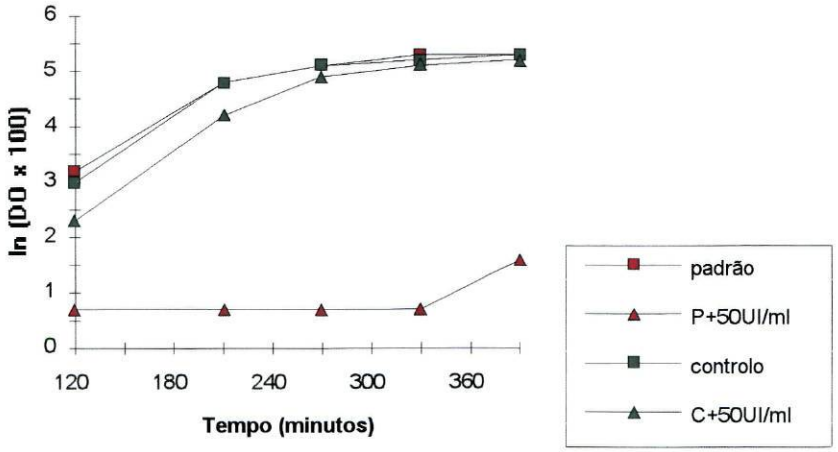


Figura 36 - Curvas de crescimento e morte de *B. cereus* em meio de TSB PH 7,3 sem ou com a presença de 50 UI/ml de nisina. O inóculo usado foi retirado após 24 horas de incubação da cultura tratada com 100 UI/ml de nisina, ❸, (Fig. 35c) para o controlo e de uma cultura selvagem para o padrão, ❶. Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

2 - Variação do PH durante o crescimento das culturas

Ao verificarmos que o comportamento dos microrganismos foi diferente conforme o PH das culturas, às quais adicionamos a nisina, e que nas culturas em fase estacionária não se verificava lise celular, tal como para as culturas exponenciais em PH (5,0), fomos avaliar as alterações de PH que ocorreram durante o crescimento. Pudemos assim avaliar o PH das culturas no momento em que ocorreu a adição da nisina.

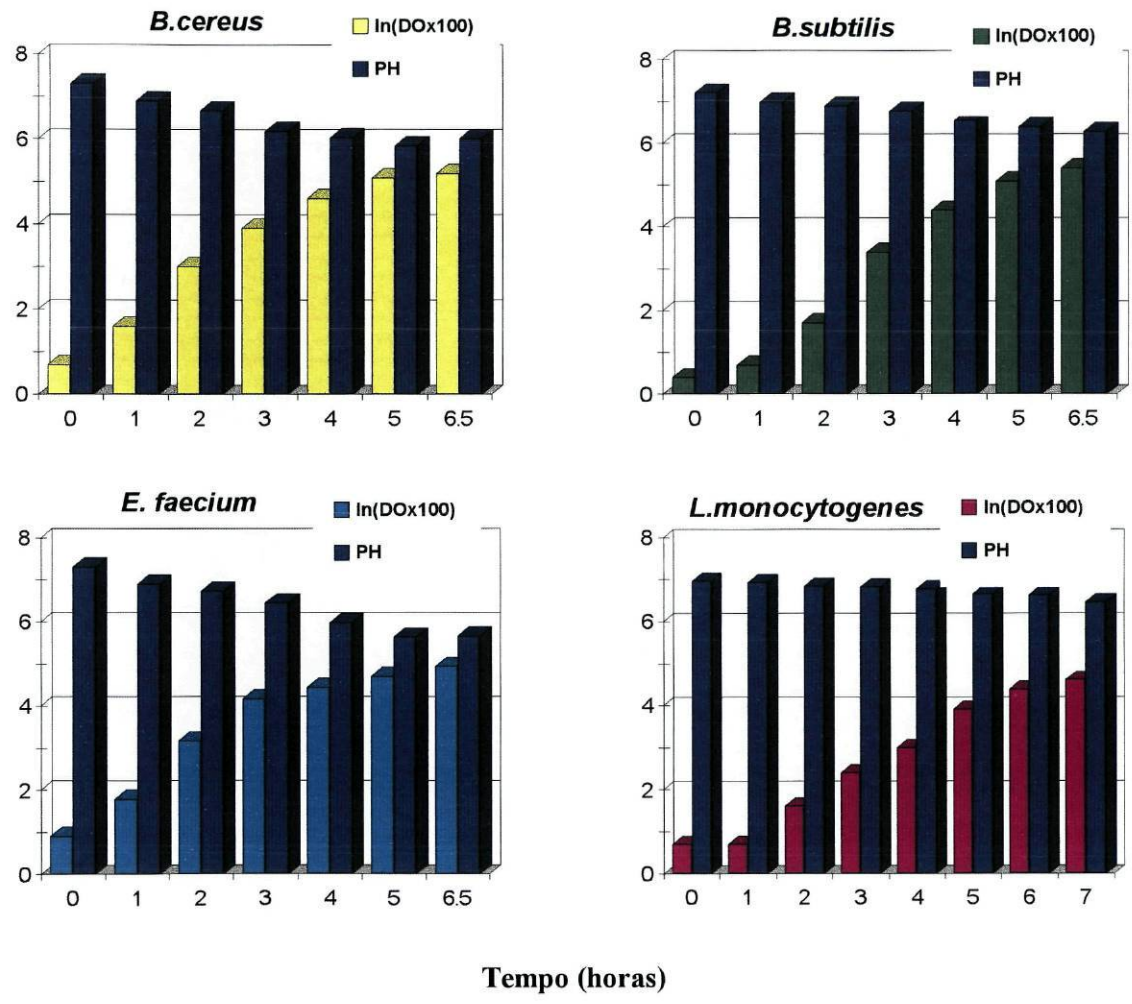


Figura 37 - Curvas de crescimento e de variação de PH, em meio de TSB PH 7,3. *B. cereus*; *B. subtilis*; *E. faecium*; *L. monocytogenes*.

Pelos gráficos apresentados (Fig. 37) pudemos concluir que o PH (7,3-inicial) baixa com o desenvolvimento da cultura, atingindo valores mais baixos para *B. cereus* e *E. faecium*. Contudo, no momento da adição da nisina, durante uma fase inicial do crescimento exponencial, o PH registado nunca foi inferior a 6.

Os valores de PH das culturas, após adição das diferentes concentrações de nisina, ao fim de 3 a 4 horas de incubação, mostraram-se superiores aos apresentados pelo controlo, o que significa que a adição da solução da nisina não acidifica a cultura e, até pelo contrário, a alcaliniza ligeiramente, provavelmente devido às suas características básicas.

Para PH inicial de 5,0 não se observaram descidas muito acentuadas deste parâmetro. Os valores mais baixos foram registados para o *E. faecium*. Nas culturas de *L. monocytogenes* não se verificaram alterações mas, como se pôde observar pela curva de crescimento, esta estirpe apresentou um crescimento muito reduzido e muito lento a este valor de PH (Fig. 38). O PH registado no momento da adição de nisina foi próximo de 5, com excepção para o *E. faecium* em que se aproximou de 4. A adição das diferentes concentrações de nisina e sua incubação por 3 horas não alteraram significativamente os valores de PH.

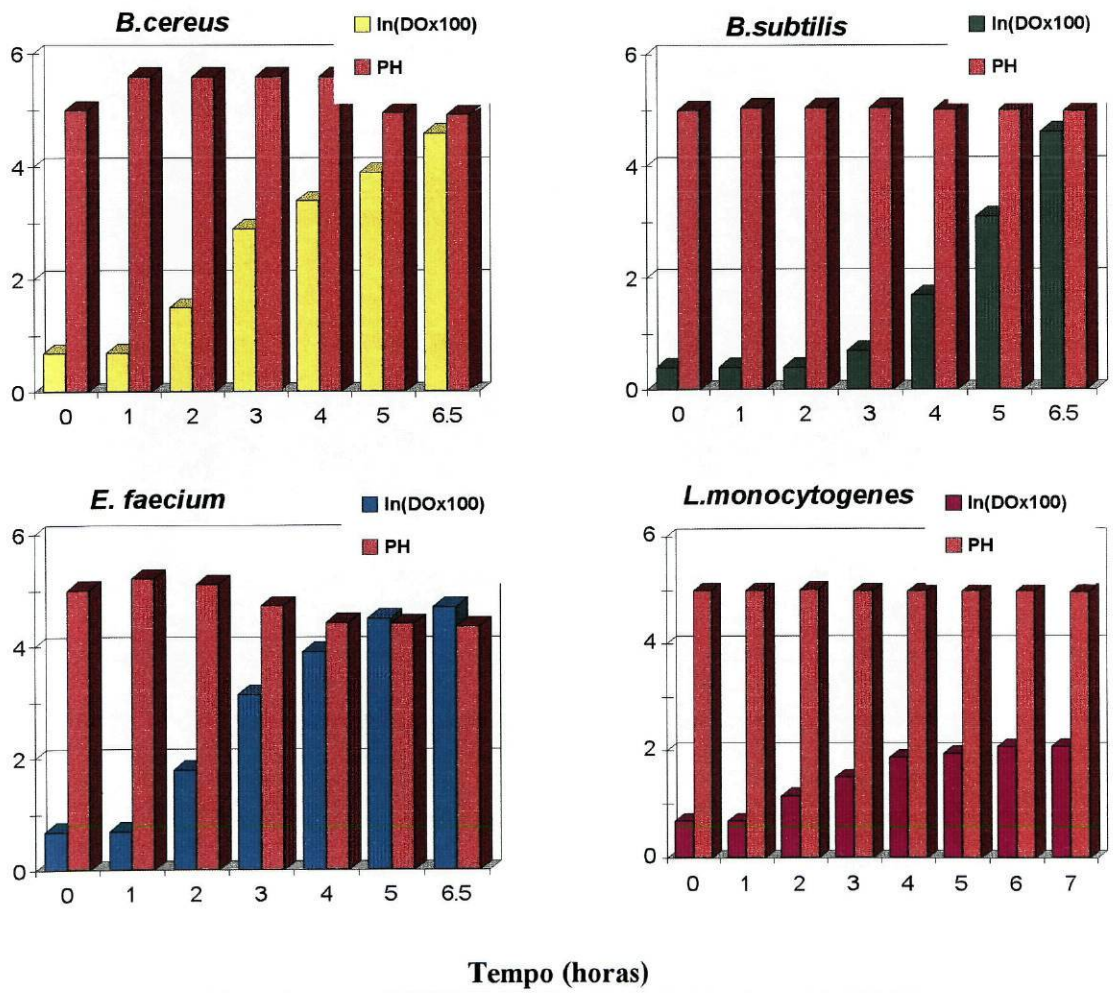


Figura 38 - Curvas de crescimento e de variação de PH, em meio de TSB PH 5,0. ■ *B. cereus*; ■ *B. subtilis*; ■ *E. faecium*; ■ *L. monocytogenes*.

3 - Estudo das alterações ultraestruturais induzidas pela nisina

3.1 - *B. cereus*

3.1.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3

A figura 39 mostra o perfil ultraestrutural de células de *B. cereus* em cultura exponencial, no momento anterior à adição de nisina (controlo). As células observadas apresentaram uma membrana citoplasmática de perfil assimétrico (Fig. 39b,c), alguns mesossomas e um conteúdo citoplasmático normal, apresentando numerosos ribossomas em agregados, e o material nuclear, com estrutura fibrilar, apresentando-se disperso. Não foram observadas células com sinais de lise.

Foi estudado o efeito da concentração de 25 UI/ml de nisina, uma vez que se mostrou como a concentração mais baixa que provocou graves alterações morfológicas nos primeiros minutos, como observado por microscopia óptica (Fig. 2b). Tinhamos igualmente verificado que nos primeiros minutos, a Absorvância desceu de 0,3 para 0,25 e o número de CFU/ml de aproximadamente 10^8 para 10^3. Ao fim de 15 minutos a Absorvância tinha descido para 0,05 e o número de células viáveis manteve-se praticamente estável (Fig. 1a,b). Pelas fotografias apresentadas na figura 40 verificamos que 25 UI/ml de nisina originaram alterações micromorfológicas graves, em amostras retiradas imediatamente após a sua adição, comparando com o controlo (Fig. 39). A maioria das células apresentou sinais de lise muito pronunciados, mantendo-se a morfologia das células, devido à presença da parede celular, mas praticamente sem conteúdo citoplasmático e apresentando sistemas membranares muito dissolvidos. Nas células que não apresentaram este estado avançado de lise pudemos observar uma membrana citoplasmática de perfil simétrico e um espaço periplasmático aumentado, apresentado um conteúdo citoplasmático de aspecto normal. O grau de lise mostrou-se mais elevado aos 5 e 15 minutos, com o aparecimento de numerosos restos celulares, resultantes da desintegração de grande parte das células, por dissolução e fractura das paredes celulares e a saída de sistemas membranares para o exterior, para além de células fantasma e raras células de morfologia e estrutura próxima do normal (Figs. 41 e 42).

A observação de uma amostra retirada 4 horas após a adição de 25 UI/ml de nisina mostrou-se concordante com a subida verificada nos valores da densidade óptica (Fig. 1b), de CFU/ml (Fig. 1a) e de bacilos Gram positivo (Fig. 4b), anteriormente observados. Efectivamente pudemos observar, para além de alguns restos celulares, a presença de numerosos bacilos com morfologia e ultraestrutura que se aproximam do aspecto normal. Embora algumas alterações pareçam visíveis, não seriam então suficientes para impedir o seu crescimento (Fig. 43).

A técnica de fixação usada para a maioria das amostras, cujas fotografias foram apresentadas, foi a que inicia a fixação com o tetróxido de ósmio (OsO_4/GaFaCa).Verificamos uma preservação e visualização razoáveis, particulamente das estruturas membranosas. Em amostras tratadas de modo inverso (GaFaCa/OsO_4) foi visível uma maior ondulação da membrana citoplasmática, mas os resultados no seu conjunto não se mostraram muito diferentes, sendo bem visível a membrana citoplasmática (Fig. 44). Não tendo sido objectivo deste trabalho estudar os melhores processos para preservar as diferentes estruturas celulares, usamos os dois métodos descritos. Os resultados não se mostraram com diferenças de base, em relação às alterações causadas pela nisina, tendo por isso sido escolhidas as fotografias que as representavam, acompanhadas da indicação do processo de fixação usado.

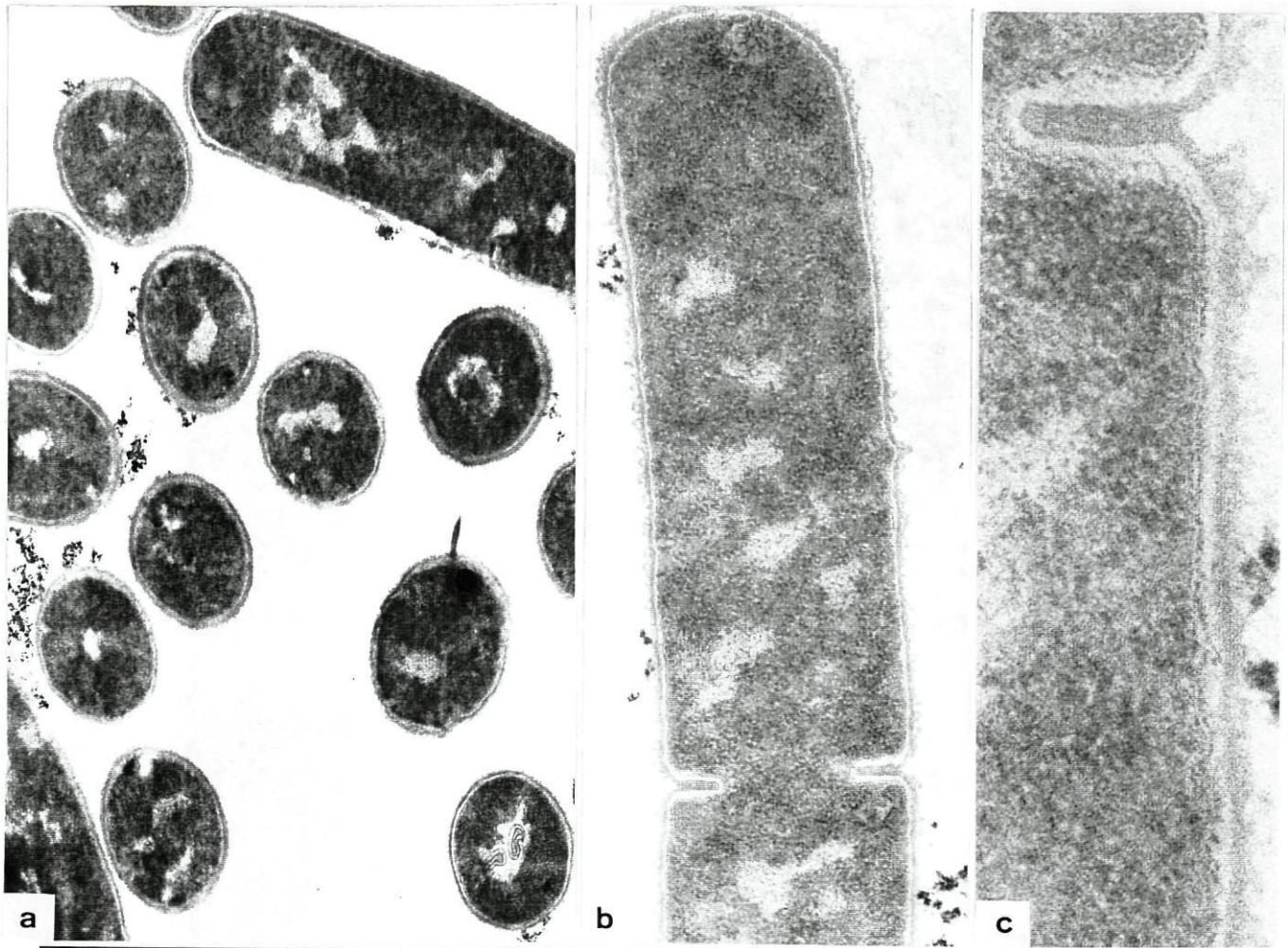


Figura 39 - Ultraestrutura de células de *B. cereus* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), imediatamente antes da adição de nisina (controlo). Fixação OsO_4/GaFaCa.
• **a** - Ampliação 27 000 x; • **b** - Ampliação 60 000 x; • **c** - Ampliação 200 000 x.

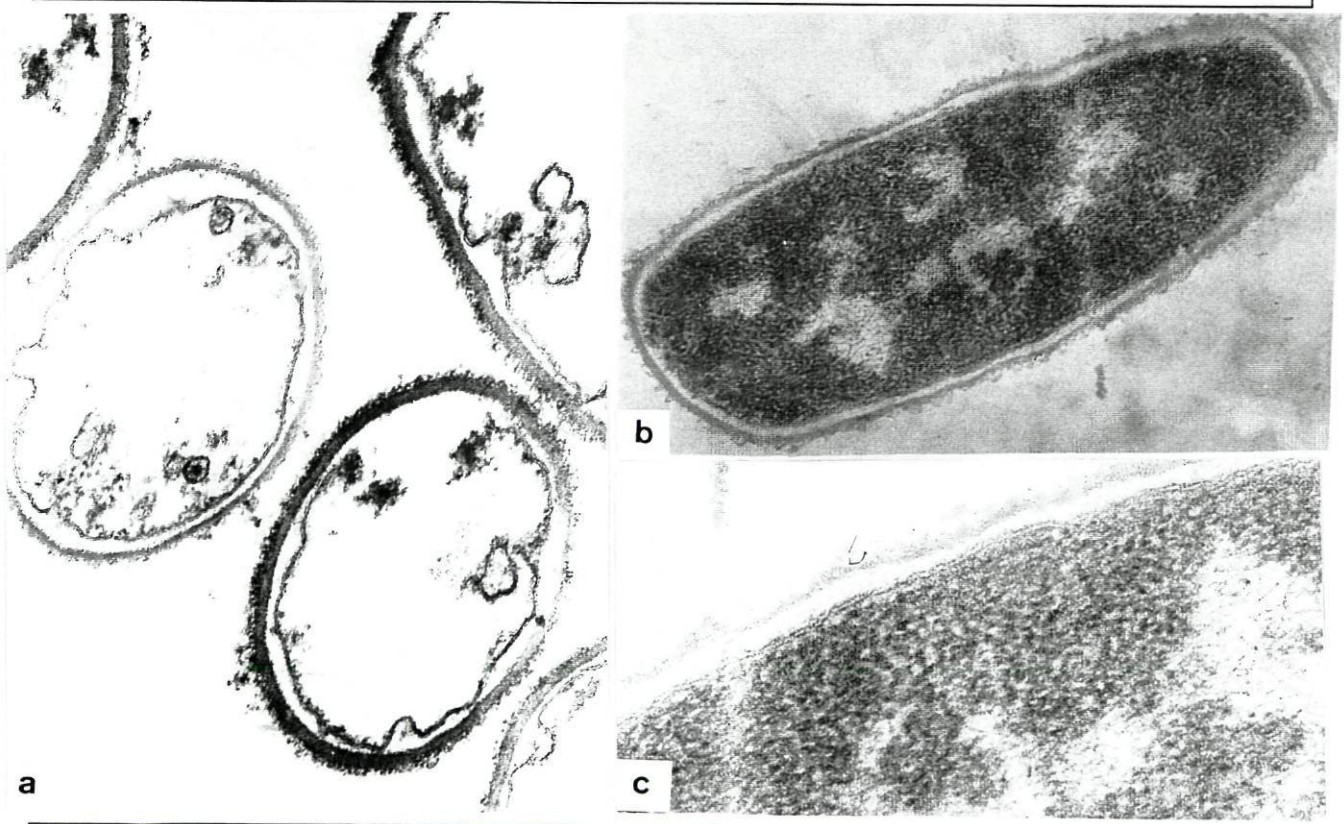


Figura 40 - Ultraestrutura de células de *B. cereus* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), imediatamente após a adição de 25 UI/ml de nisina. Fixação OsO_4/GaFaCa.
• **a** - Ampliação 60 000 x; • **b** - Ampliação 62 000 x; • **c** - Ampliação 124 000 x.

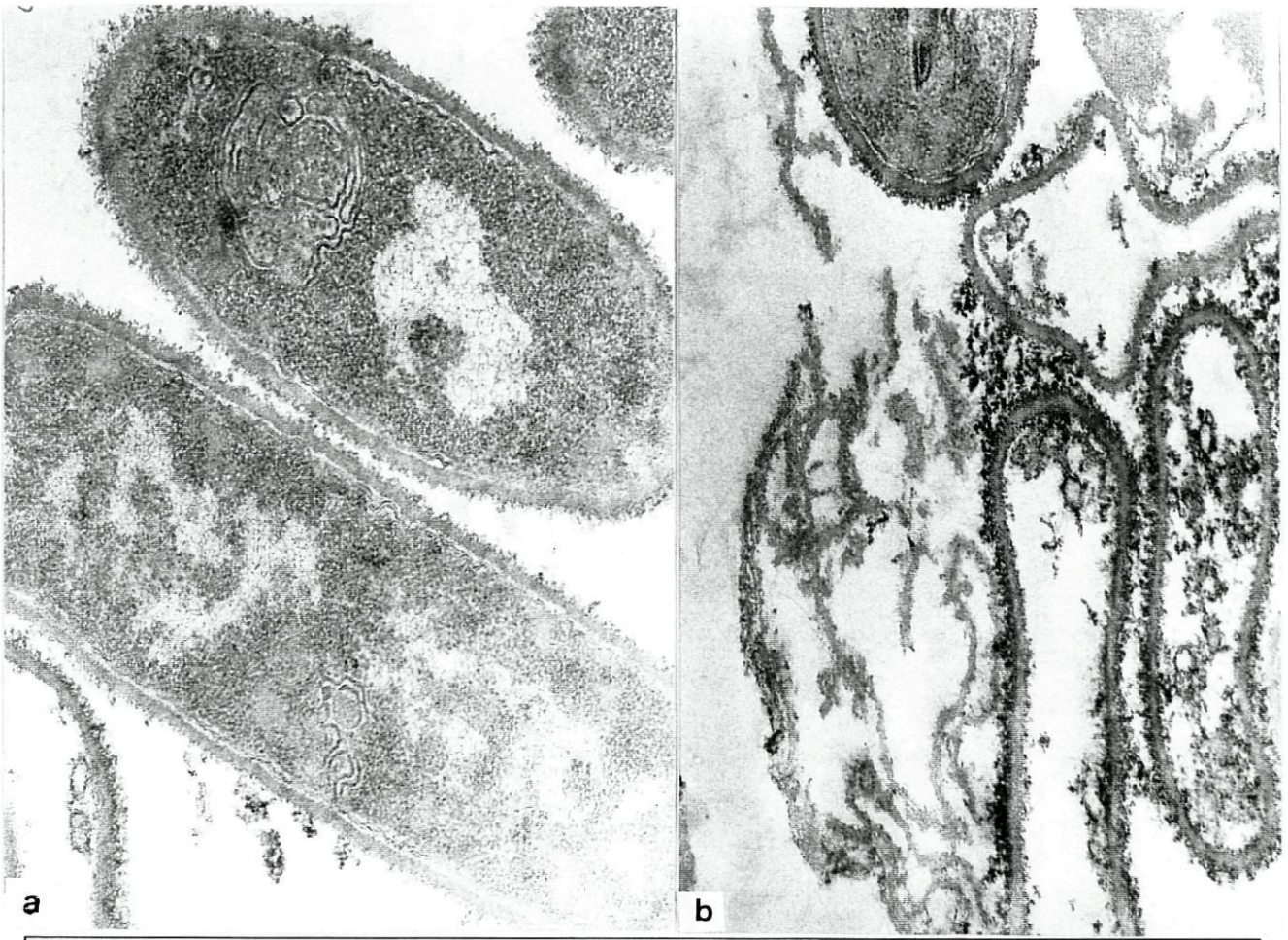


Figura 41 - Ultraestrutura de células de *B. cereus* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 5 minutos após a adição de 25 UI/ml de nisina. Fixação OsO_4/GaFaCa.
• **a** - Ampliação 60 000 x; • **b** - Ampliação 62 000 x.



Figura 42 - Ultraestrutura de células de *B. cereus* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 15 minutos após a adição de 25 UI/ml de nisina. Fixação OsO_4/GaFaCa.
• **a** - Ampliação 26 000 x; • **b** - Ampliação 63 000 x.

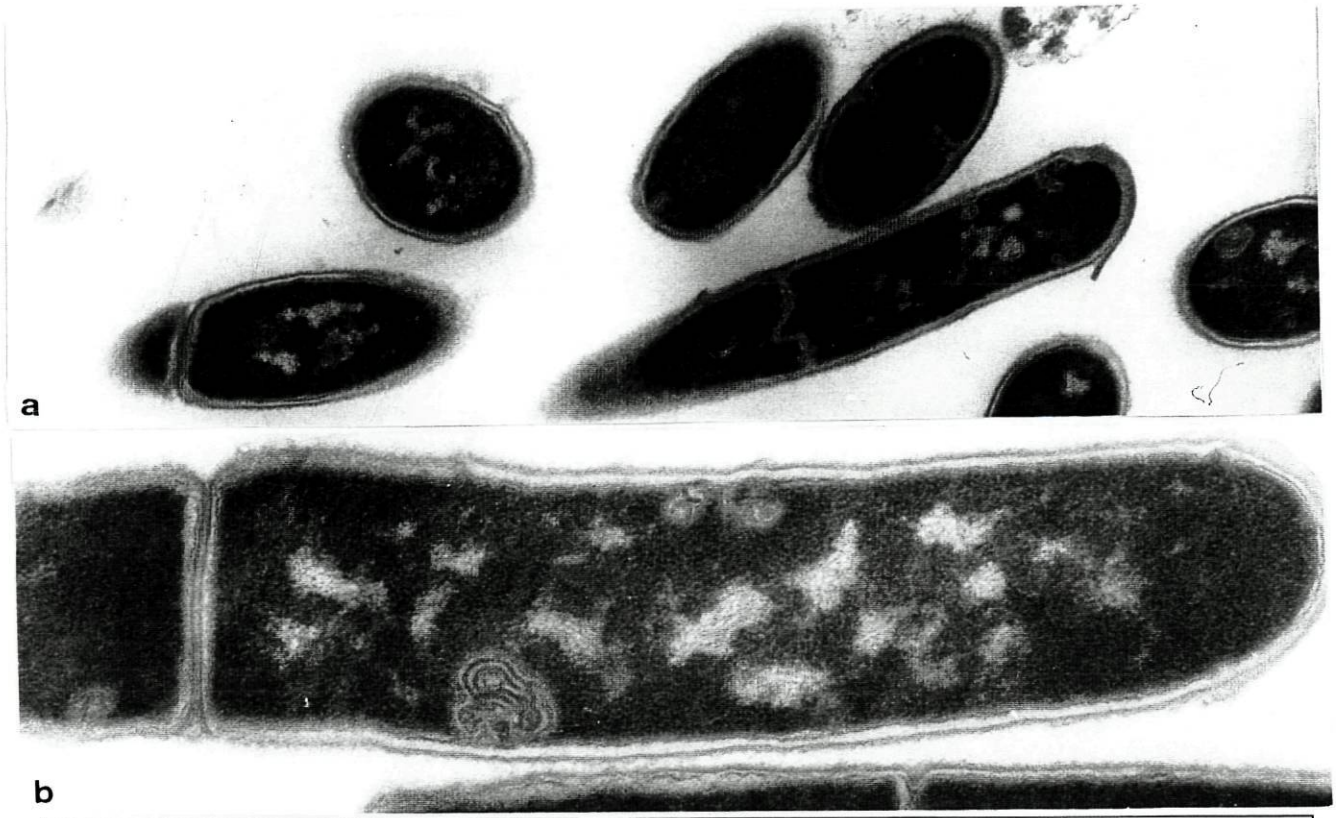


Figura 43 - Ultraestrutura de células de *B. cereus* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 4 horas após a adição de 25 UI/ml de nisina. Fixação OsO_4/GaFaCa.
• **a** - Ampliação 30 000 x; • **b** - Ampliação 63 000 x.

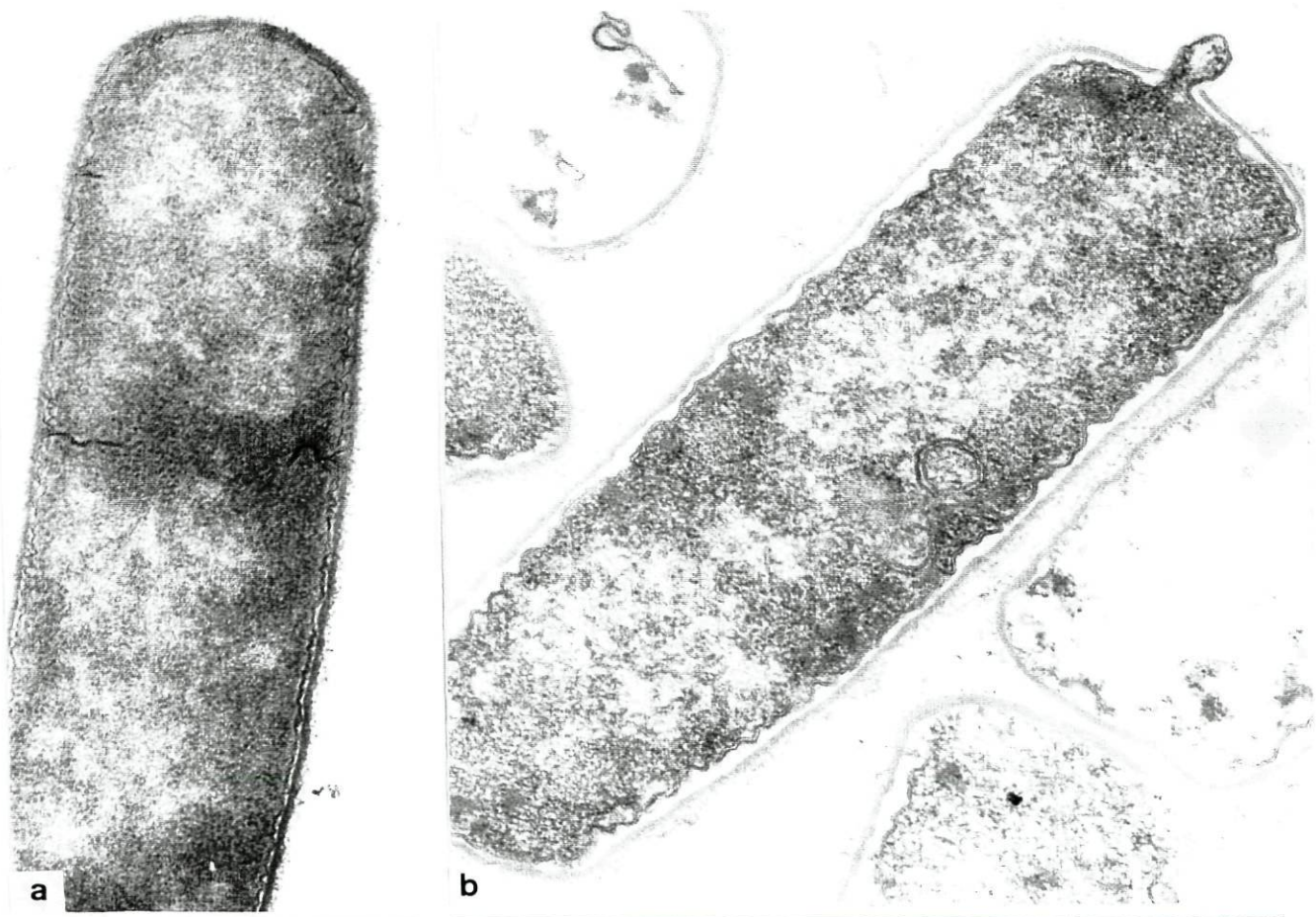


Figura 44 - Ultraestrutura de células de *B. cereus* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3). Fixação GaFaCa/OsO_4.
• **a** - Cultura controlo. Ampliação 56 000 x; • **b** - Cultura tratada com 25 UI/ml de nisina. Ampliação 62 000 x.

3.1.2 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0

Após o estudo turbidimétrico, de viabilidade e morfológico efectuado, foi escolhida a concentração de 100 UI/ml de nisina e um tempo de actuação de 15 minutos, para se estudarem as alterações ultraestruturais induzidas nestas condições, em comparação com o controlo. Na amostra controlo não foram observados sinais de lise, apresentando-se as células com uma morfologia e divisão normais (Fig. 45). O tratamento indicado resultou em alterações micromorfológicas que puderiam justificar a alteração observada em relação à reacção de Gram (Figs. 18,19) e à viabilidade (Fig. 17a), como a simetria apresentada pela membrana citoplasmática. Não foram contudo observados sinais evidentes de lise (Fig. 46), o que por seu lado estaria de acordo com a manutenção verificada na densidade óptica das culturas (Fig. 17b), apresentando as células uma elevada electrodensidade interna, embora os agregados de ribossomas não se apresentem tão nítidos. A parede celular surge com alguns locais menos espessos e até mesmo interrompida (Fig. 46a), o que puderá corresponder a uma estrutura que apresente a sua rigidez alterada e, daí, a sua reacção negativa frente à coloração de Gram. A maioria das células surgiu sem alterações significativas do ponto de vista morfológico, apresentando divisões normais e por vezes mais alongadas.

3.1.3 - Culturas estacionárias em meio de TSB PH 7,3

De modo a verificar os resultados obtidos pelo tratamento de culturas na fase estacionária, do ponto de vista ultraestrutural, retiramos uma amostra 15 minutos após tratamento com 100 UI/ml de nisina. Foi possível observar algumas células com sinais evidentes de lise, mas grande parte das bactérias mostraram alterações micromorfológicas graves (Fig. 47), o que estaria de acordo com a descida de viabilidade (Fig. 29a), mas uma organização e estrutura ainda próxima do normal, com material electrodenso, o que justificaria a insignificante alteração observada na Absorvância a 550 nm (Fig. 29b), das culturas nestas condições.

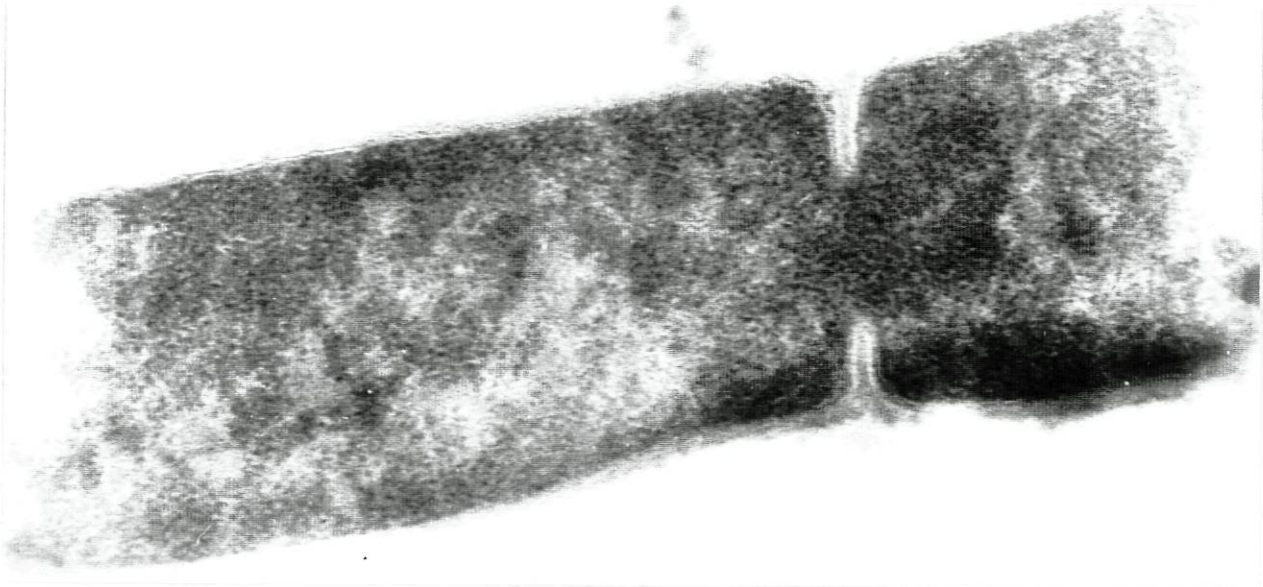


Figura 45 - Ultraestrutura de células de *B. cereus* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (5,0), imediatamente antes da adição de nisina (controlo). Fixação GaFaCa/OsO_4. Ampliação 60 000 x.

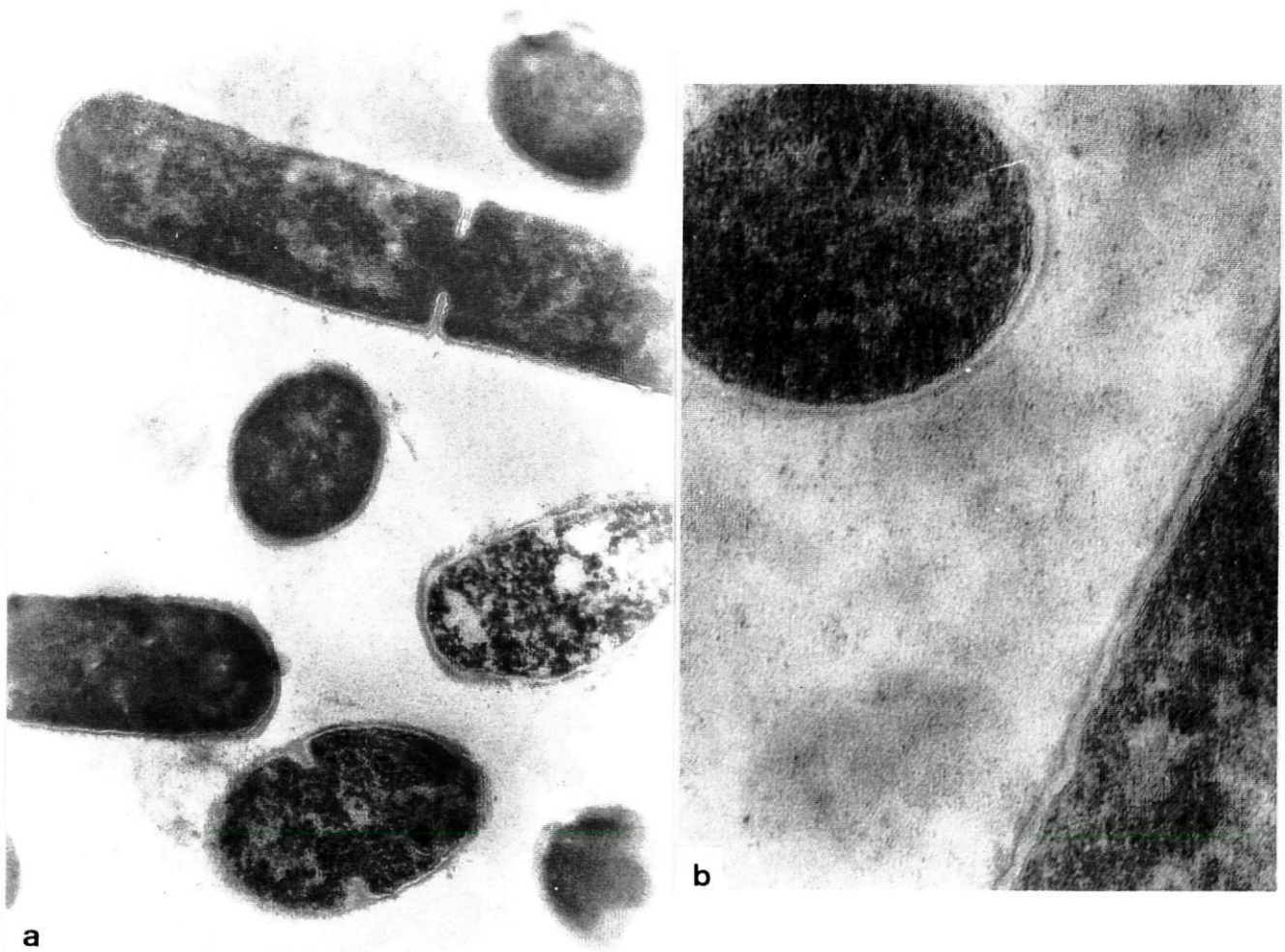


Figura 46 - Ultraestrutura de células de *B. cereus* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (5,0), 15 minutos após a adição de 100 UI/ml de nisina.
• **a** - Fixação GaFaCa/OsO_4. Ampliação 24 000 x; • **b** - Fixação OsO_4/GaFaCa. Ampliação 60 000 x.



Figura 47 - Ultraestrutura de células de *B. cereus* colhidas de uma cultura estacionária em meio TSB PH (7,3), 15 minutos após a adição de 100 UI/ml de nisina. Fixação GaFaCa/OsO_4.Ampliação 12 000 x (inserido-60 000 x)

3.2 - *B. subtilis*

3.2.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3

O efeito da nisina sobre esta espécie bacteriana foi estudado em condições idênticas às usadas para *B. cereus*. Foi possível verificar que o grau de lise provocado pelo tratamento das células com 25 UI/ml de nisina resultou muito inferior e as alterações ultraestruturais ocorridas surgiram mais tardiamente. Esta resposta era esperada dado os resultados apresentados no estudo morfológico (Fig. 6b) e turbidimétrico (Fig. 5b). As amostras colhidas imediatamente após o tratamento com esta concentração de nisina não mostraram alterações detectáveis, em relação ao controlo (Fig. 48). No final de 5 minutos de tratamento foram visíveis células com morfologia e conteúdos citoplasmáticos aparentemente normais mas apresentando uma membrana citoplasmática com perfil simétrico (Fig. 49). O tempo não aumentou significativamente o grau de lise e aos 15 minutos de tratamento observaram-se algumas células bastante mais longas, em divisão contínua, sem septação (Fig. 50).

Como a concentração de 25 UI/ml não provocou alterações muito pronunciadas, foi efectuado um estudo usando uma concentração de nisina mais elevada, 100 UI/ml, e um tempo de actuação mais prolongado. Nestas condições, e ao fim de 15 minutos, foram observadas algumas células com evidentes sinais de lise, fantasmas de células onde foram visíveis fracturas da parede celular, muitos restos celulares, embora, muitas células se apresentassem com aspecto próximo do normal mas com membrana citoplasmática simétrica. O mesmo aspecto foi observado para o tempo de 1 hora de tratamento (Fig. 51).

3.2.2 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0

Os resultados do estudo ultraestrutural das amostras de culturas obtidas nestas condições e tratadas com 100 UI/ml de nisina por 15 minutos, revelaram-se em tudo idênticos aos relatados para *B. cereus*. De salientar a ausência de sinais de lise, a conservação de material electrodenso no interior da célula, e o perfil simétrico da membrana citoplasmática. Não foram apresentadas fotografias, dada a semelhança de efeitos referida em relação ao *B. cereus*.

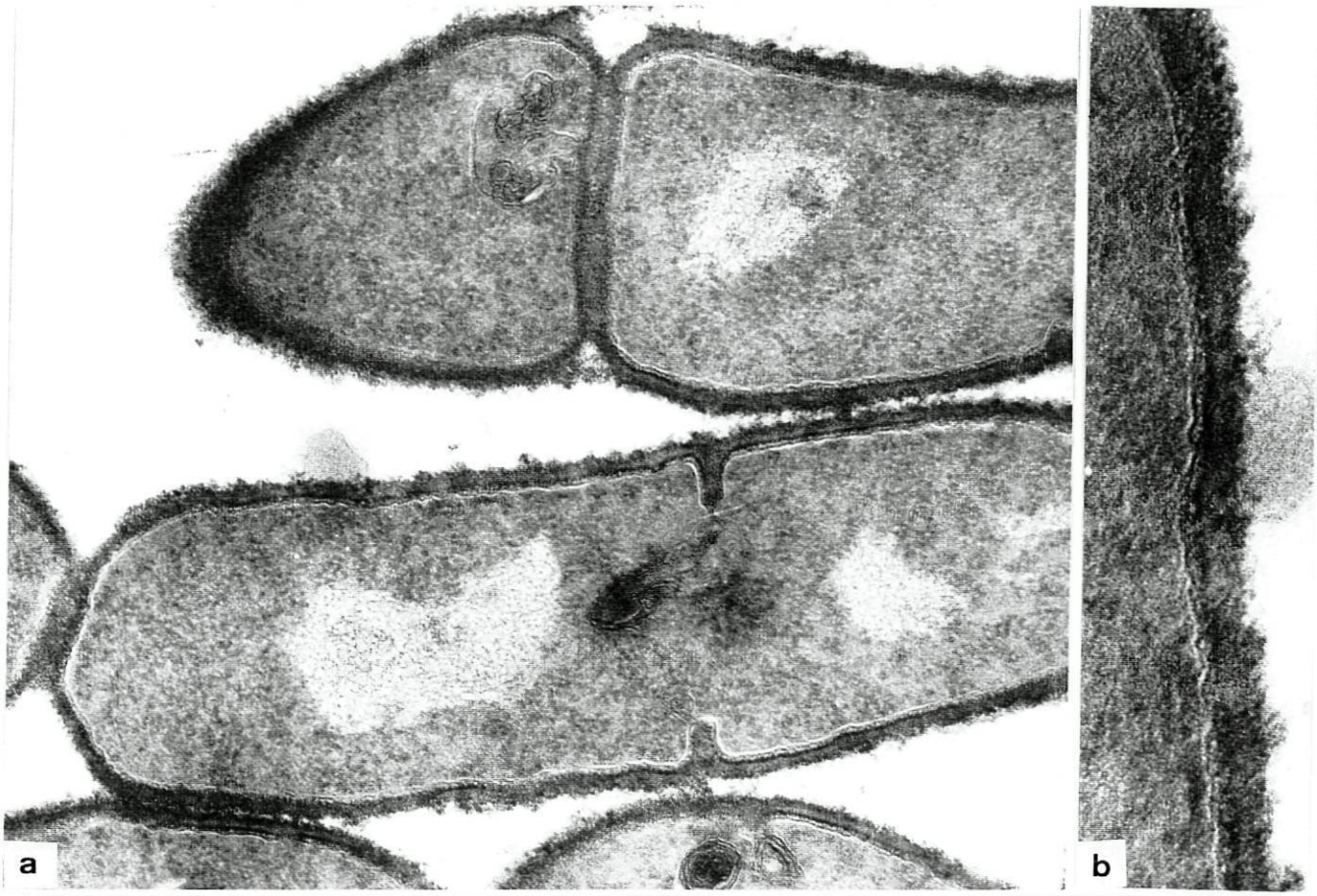


Figura 48 - Ultraestrutura de células de *B. subtilis* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), imediatamente antes da adição de nisina (controlo). Fixação OsO_4/GaFaCa.
• **a** - Ampliação 70 000 x; • **b** - Ampliação 170 000 x.



Figura 49 - Ultraestrutura de células de *B. subtilis* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 5 minutos após a adição de 25 UI/ml de nisina. Fixação GaFaCa/OsO_4.
• **a** - Ampliação 29 000 x; • **b** - Ampliação 150 000 x.

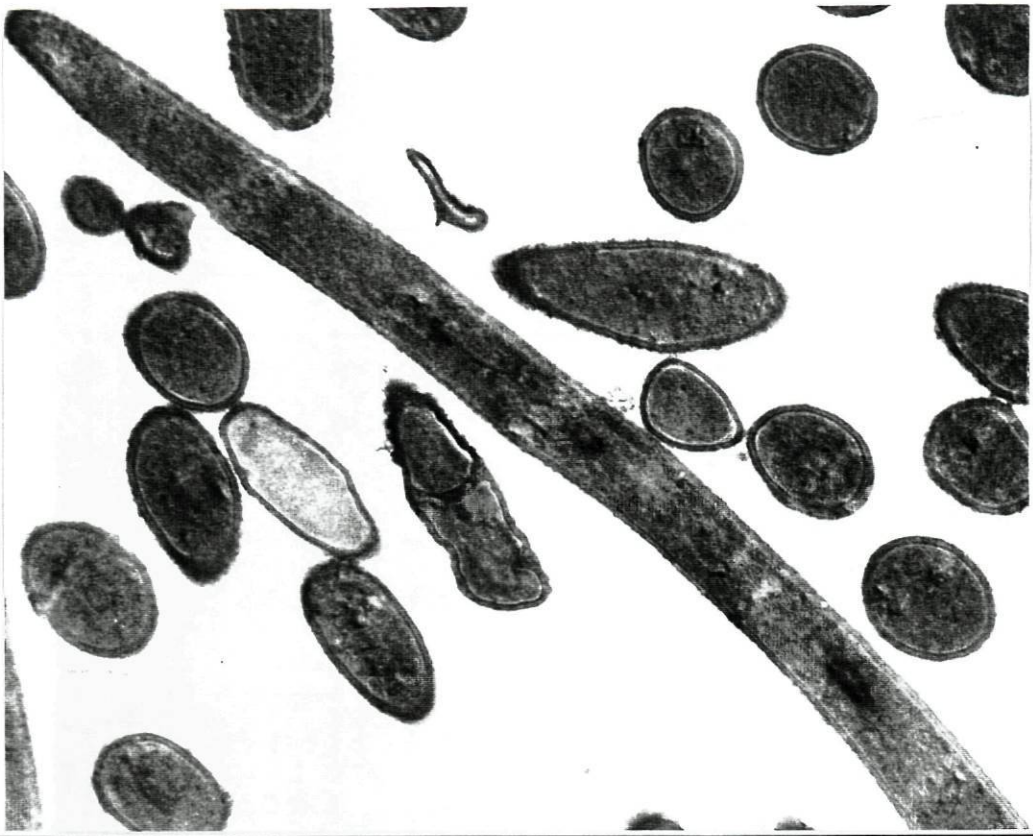


Figura 50 - Ultraestrutura de células de *B. subtilis* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 15 minutos após a adição de 25 UI/ml de nisina. Fixação GaFaCa/OsO_4. Ampliação 27 000 x.



Figura 51 - Ultraestrutura de células de *B. subtilis* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 1 hora após a adição de 100 UI/ml de nisina. Fixação GaFaCa/OsO_4.
• **a** - Ampliação 68 000 x; • **b** - Ampliação 84 000 x; • **c** - Ampliação 68 000 x.

3.3 - *E. faecium*

3.3.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3

O tratamento de culturas exponenciais, com 25 UI/ml de nisina, revelou alterações ultraestruturais nas células de *E. faecium*, relativamente ao controlo (Fig. 52), que não se revelaram significativas, imediatamente após a sua adição (Fig. 53). Com o tempo, as alterações tornaram-se mais evidentes (Figs. 54 e 55), sem contudo ser observado um grau de lise tão elevado como o verificado para *B. cereus*. Foram visíveis alguns restos celulares, algumas células com conteúdo citoplasmático alterado e a membrana citoplasmática simétrica mas, também se observaram muitas células de aparência normal. Um tratamento de 4 horas resultou no reaparecimento de células com uma ultraestrutura normal (Fig. 56), o que estaria de acordo com a subida do número de células viáveis e da densidade óptica (Fig. 9a,b).

Uma vez que as alterações foram pouco intensas para esta concentração, foi igualmente testada a concentração de 100 UI/ml. A figura 57 mostra um maior grau de lise observado nesta situação, aos 15 minutos, o que está de acordo com as microfotografias ópticas apresentadas (Fig. 11c). São visíveis danos na estrutura da parede celular, particularmente nas zonas do septo de divisão e membranas citoplasmáticas praticamente dissolvidas. Muitas das células mantêm contudo material electrodenso, como os agregados de ribossomas, o que justifica que os valores da densidade óptica não tenham ainda descido significativamente para este tempo (Fig. 9b).

3.3.2 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0

Dado que os resultados do estudo turbidimétrico (Fig. 23b) se revelaram diferentes para esta estirpe, quando comparados com as restantes (Figs. 17b e 20b), estudamos do ponto de vista ultraestrutural amostras controlo (Fig. 58) e amostras tratadas com 100 UI/ml de nisina, por um tempo de 15 minutos. Verificamos que, nestas condições, as células apresentaram uma morfologia e ultraestrutura muito alterada (Fig. 59), sendo visíveis rupturas ao nível da parede celular, a presença de uma parede celular quase electrotransparente e mesmo a sua total desintegração com a formação de protoplastos. Este resultado encontra-se de acordo com a descida da Absorvância verificada nestas condições e para este microrganismo, pois relativamente às restantes estirpes apenas se observaram alterações micromorfológicas mais ligeiras, sem sinais de lise celular.

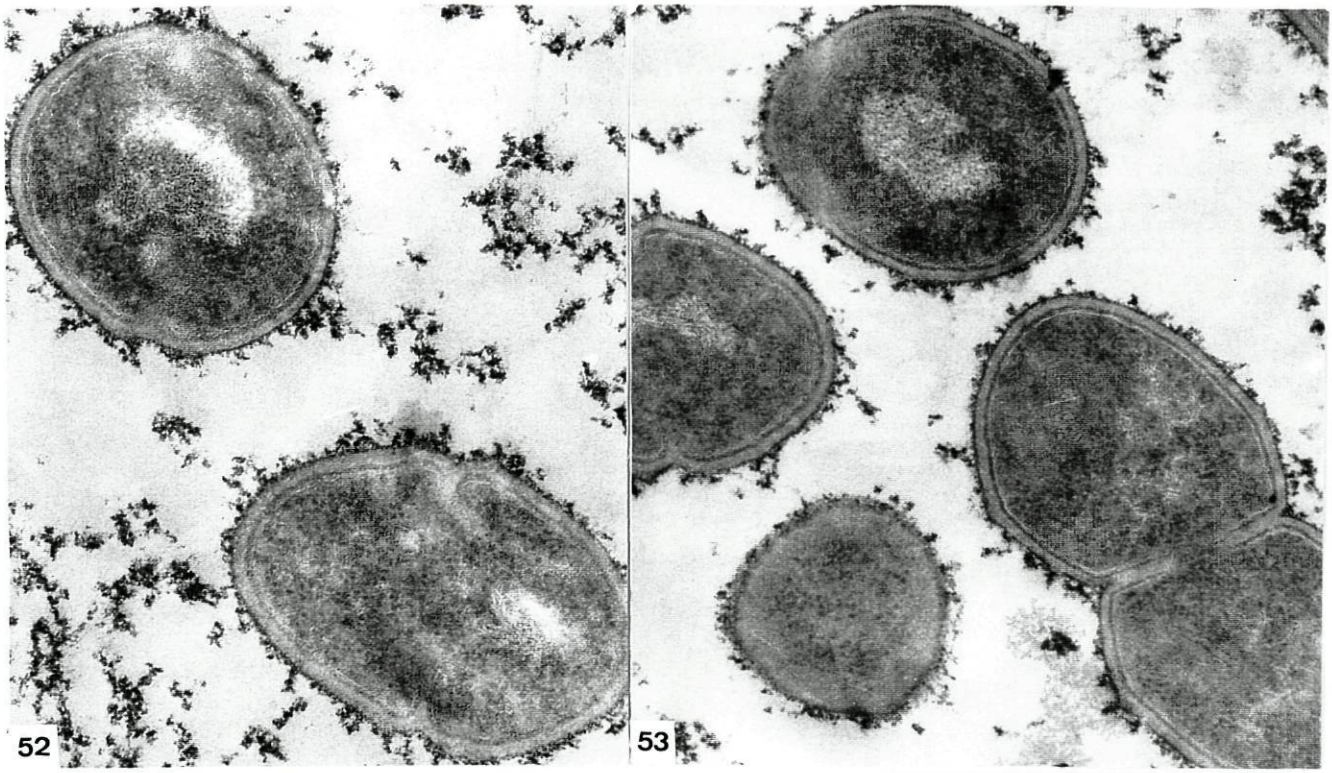


Figura 52 - Ultraestrutura de células de *E. faecium* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), imediatamente antes da adição de nisina (controlo). Fixação OsO_4/GaFaCa. Ampliação 68 000 x.

Figura 53 - Ultraestrutura de células de *E. faecium* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), imediatamente após a adição de 25 UI/ml de nisina. Fixação OsO_4/GaFaCa. Ampliação 58 000 x.

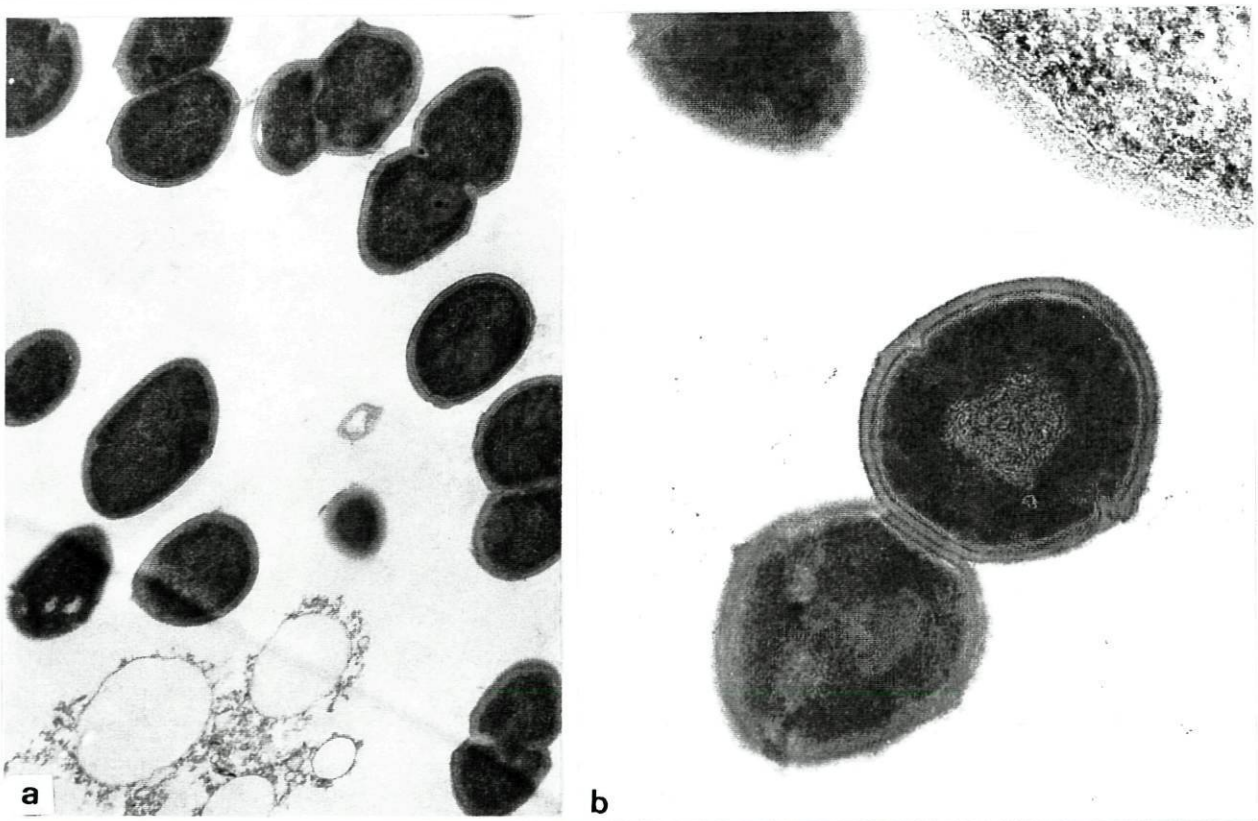


Figura 54 - Ultraestrutura de células de *E. faecium* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 5 minutos após a adição de 25 UI/ml de nisina. Fixação GaFaCa/OsO_4.
• **a** - Ampliação 28 000 x; • **b** - Ampliação 58 000 x (inserido-150 000x).

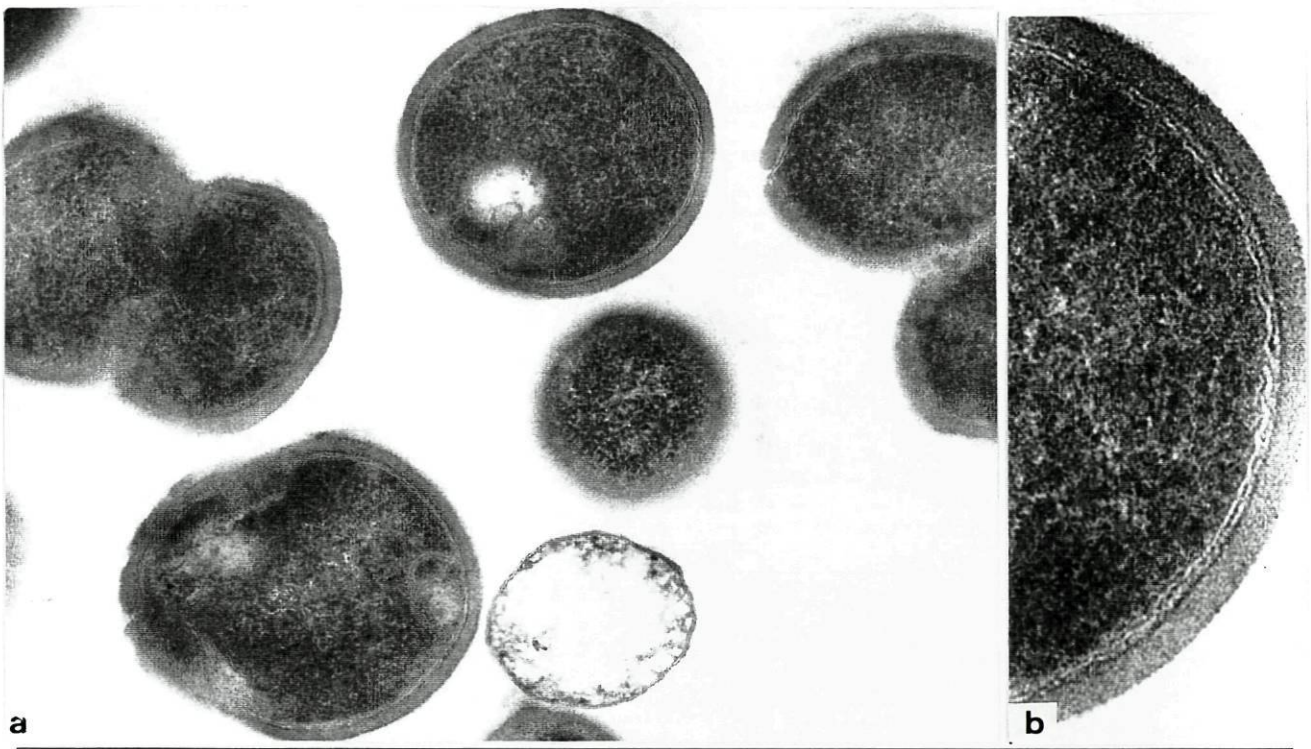


Figura 55 - Ultraestrutura de células de *E. faecium* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 15 minutos após a adição de 25 UI/ml de nisina. Fixação GaFaCa/OsO_4.
• **a** - Ampliação 62 000 x; • **b** - Ampliação 150 000 x.

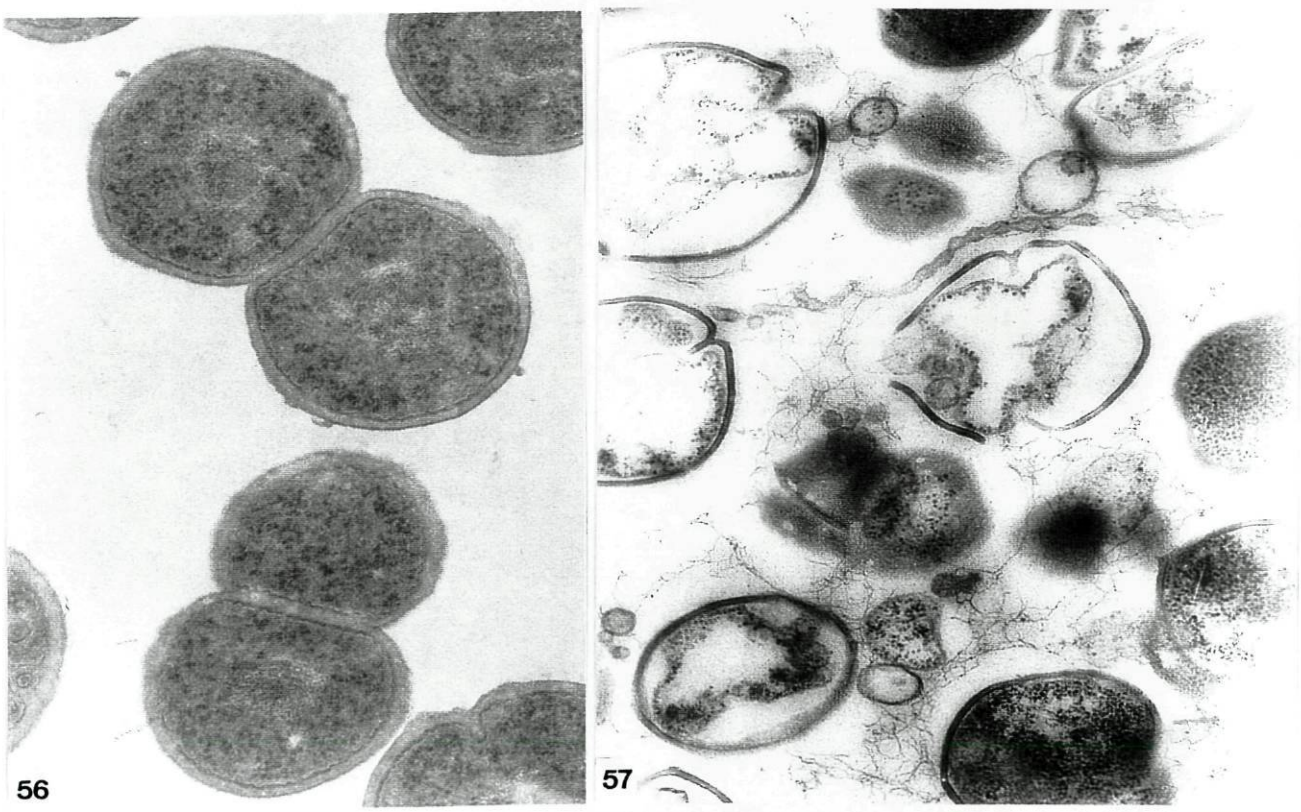


Figura 56 - Ultraestrutura de células de *E. faecium* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 4 horas após a adição de 25 UI/ml de nisina. Fixação OsO_4/GaFaCa. Ampliação 60 000 x.

Figura 57 - Ultraestrutura de células de *E. faecium* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 15 minutos após a adição de 100 UI/ml de nisina. Fixação GaFaCa/OsO_4. Ampliação 32 000 x.

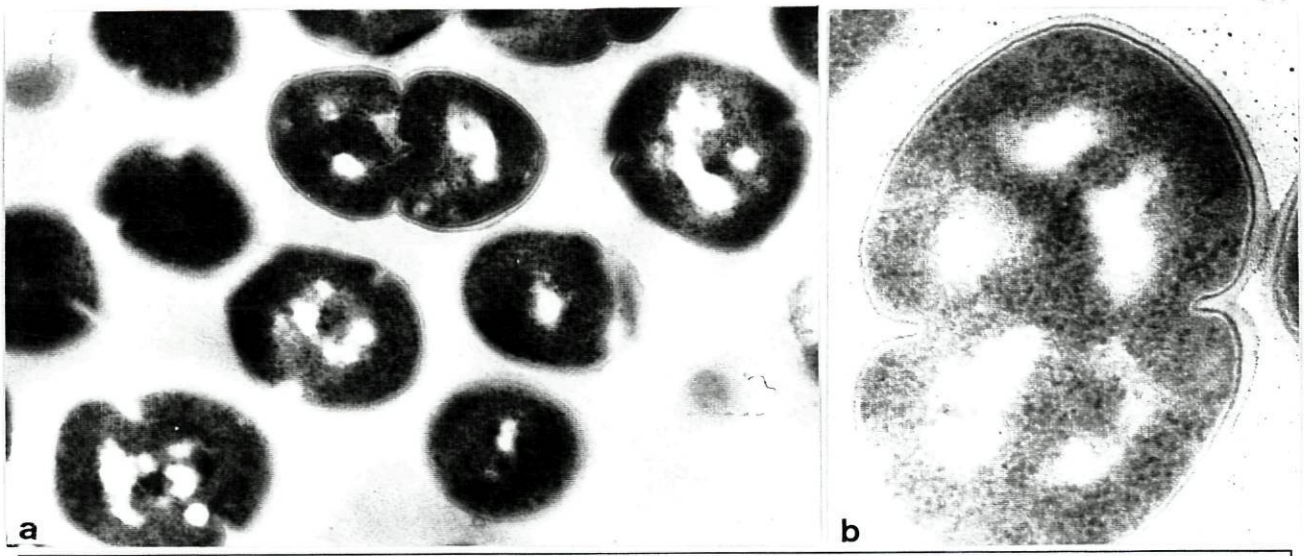


Figura 58 - Ultraestrutura de células de *E. faecium* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (5,0), imediatamente antes da adição de nisina (controlo). Fixação GaFaCa/OsO_4.
• **a** - Ampliação 30 000 x; • **b** - Ampliação 60 000 x.

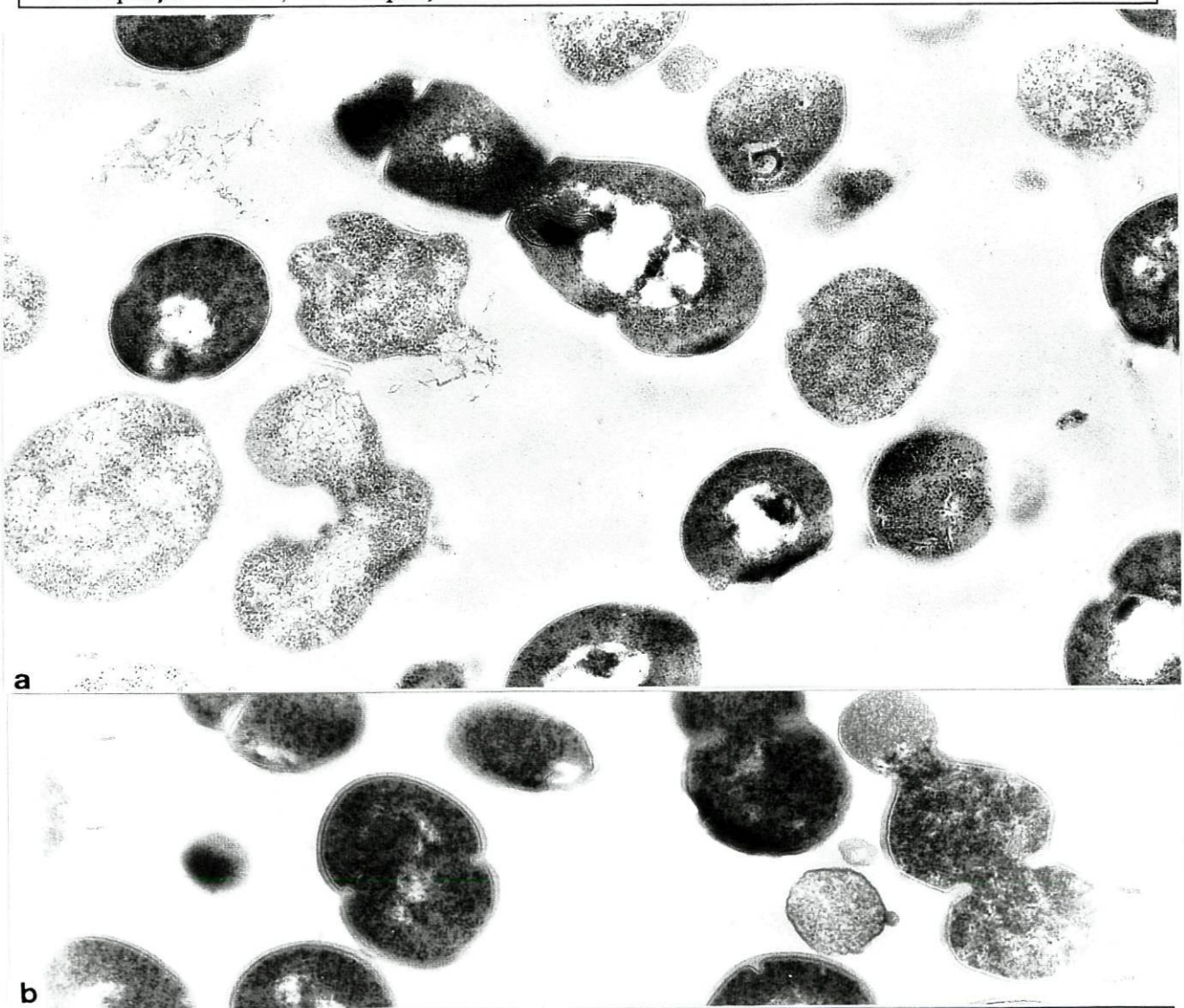


Figura 59 - Ultraestrutura de células de *E. faecium* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (5,0), 15 minutos após a adição de 100 UI/ml de nisina.
• **a** - Fixação OsO_4/GaFaCa. Ampliação 26 000 x; • **b** - Fixação GaFaCa/OsO_4. Ampliação 30 000 x.

3.4 - *L. monocytogenes*

3.4.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3

O facto de a concentração de 25 UI/ml de nisina ter provocado ligeiras descidas no número de células viáveis e manutenção dos valores da densidade óptica, durante toda a incubação, (Fig. 13a,b), levou-nos a escolher a concentração de 100 UI/ml pois, para esta concentração e um tempo de 15 minutos, eram visíveis, por microscopia óptica, alguns prejuízos nas células (Fig. 15c).

A figura 60 mostra-nos a ultraestrutura de células de *L. monocytogenes* sem tratamento (controlo), podendo observar-se a morfologia, o conteúdo citoplasmático e a assimetria da membrana citoplasmática, não sendo observadas células com sinais de lise.

Um tratamento com 100 UI/ml de nisina por um período de 15 minutos resultou na lise de algumas células e em muitas células com aspecto normal. Muitas células apresentaram algumas particularidades como o material nuclear em rede fibrilar, espessura pouco habitual do septo de divisão, a membrana citoplasmática com um perfil simétrico, o espaço periplasmático aumentado, sendo ainda visíveis algumas rupturas ao nível da parede celular (Fig. 61). O facto de a maioria das células manter o seu conteúdo intracelular, como ribossomas, poderá justificar o reduzido efeito observado sobre a densidade óptica da cultura (Fig. 13b).

3.4.2 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0

Para apoiar os resultados obtidos por microscopia óptica, de alteração morfológica das células incubadas nestas condições (Figs. 27a e 28a), foram efectuados estudos ultraestruturais. Como já referimos anteriormente, esta estirpe bacteriana cresceu mal para este valor de PH e a densidade óptica não foi alterada pela adição de nisina na fase exponencial, ao contrário do número de células viáveis (Fig. 26a,b).

A morfologia apresentou-se de facto alterada, com o aparecimento de formas aberrantes, como se pôde observar na amostra controlo (Fig. 62), sendo contudo visíveis vestígios de restos celulares e células algo danificadas. O tratamento com nisina na concentração de 100 UI/ml por 15 minutos tornou visíveis alguns restos resultantes da desintegração (Fig. 63).

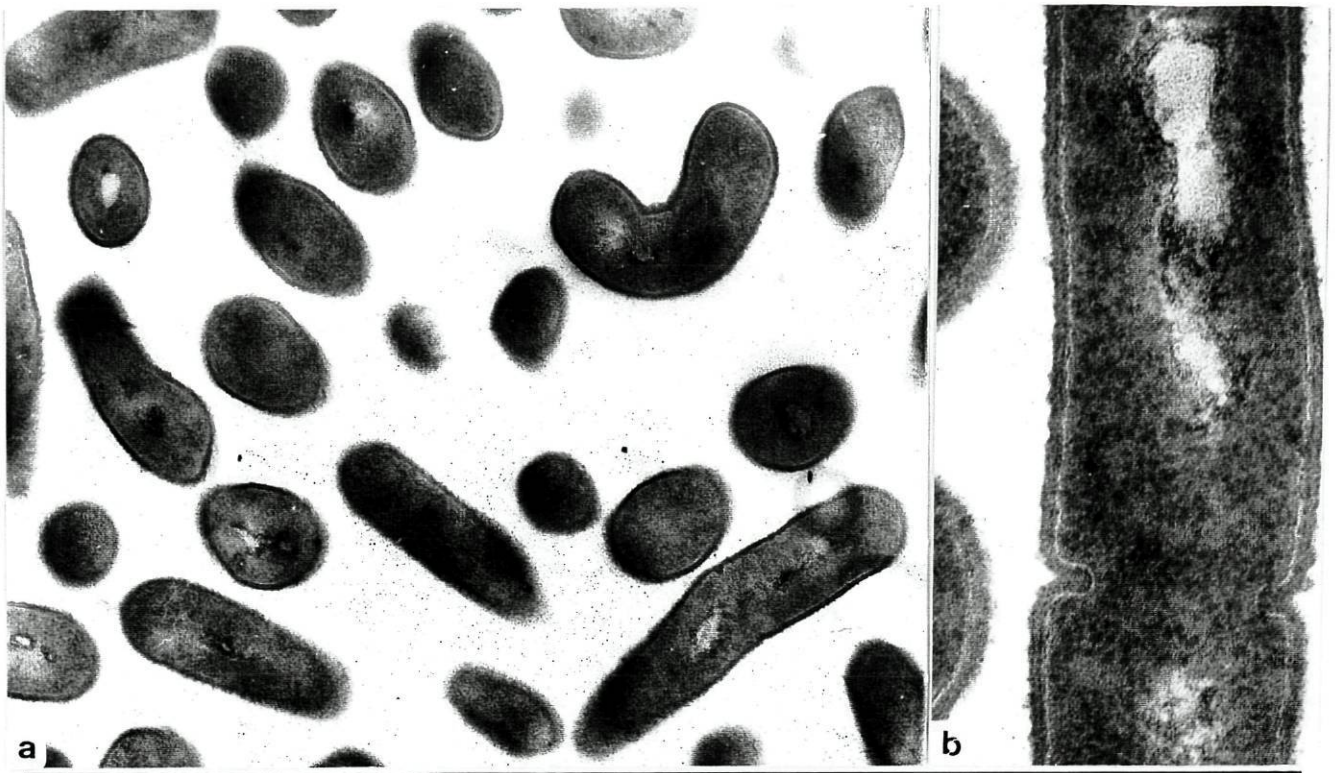


Figura 60 - Ultraestrutura de células de *L. monocytogenes* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), imediatamente antes da adição de nisina (controlo). Fixação GaFaCa/OsO_4.
• **a** - Ampliação 28 000 x; • **b** - Ampliação 78 000 x.

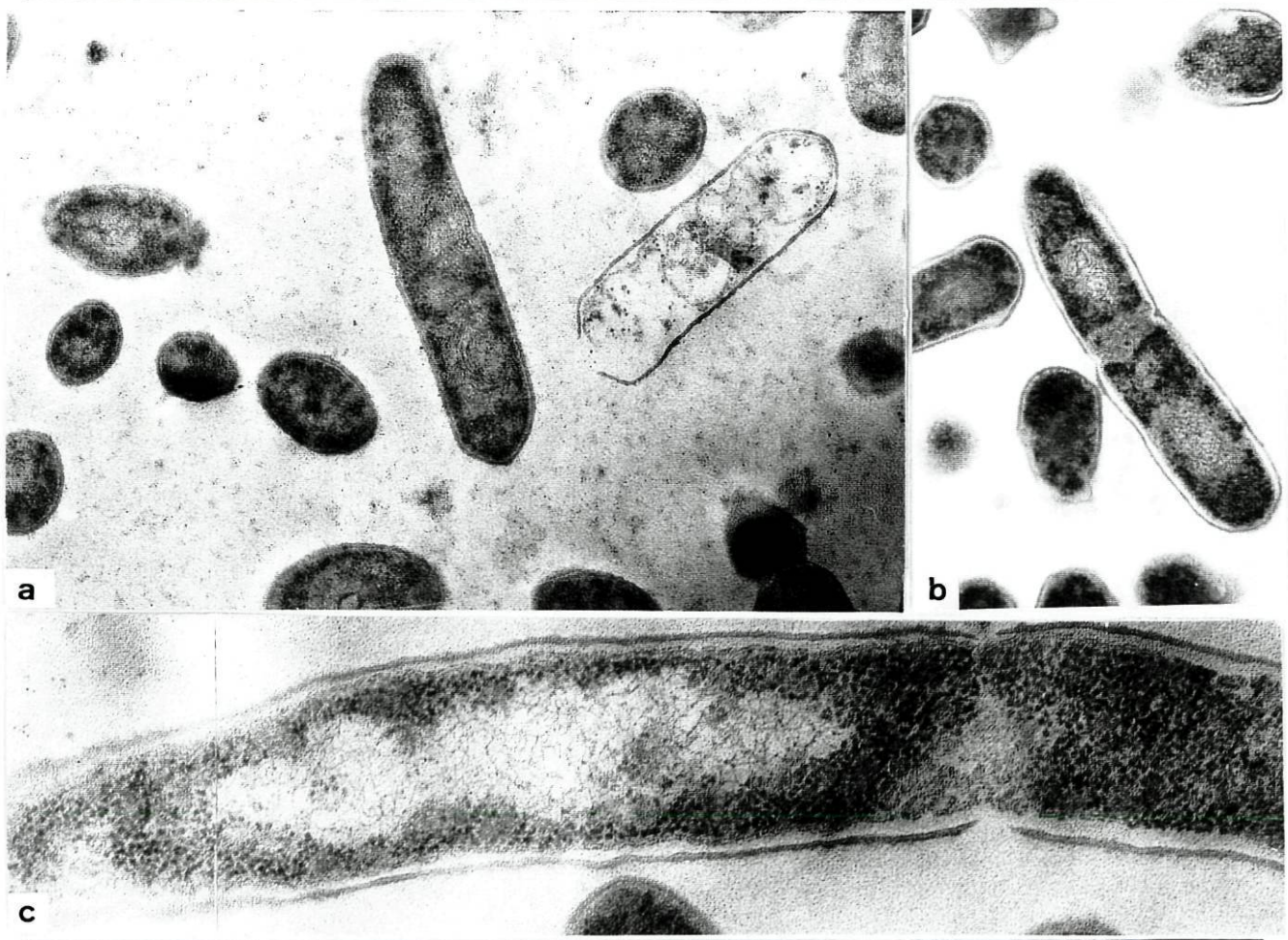


Figura 61 - Ultraestrutura de células de *L. monocytogenes* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (7,3), 15 minutos após a adição de 100 UI/ml de nisina.
• **a** - Fixação GaFaCa/OsO_4. Ampliação 29 000 x; • **b** - Fixação OsO_4/GaFaCa. Ampliação 28 000 x;
• **c** - Fixação OsO_4/GaFaCa. Ampliação 58 000 x.



Figura 62 - Ultraestrutura de células de *L. monocytogenes* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (5,0), imediatamente antes da adição de nisina (controlo). Fixação GaFaCa/OsO_4.
• **a** - Ampliação 25 000 x; • **b** - Ampliação 60 000 x.

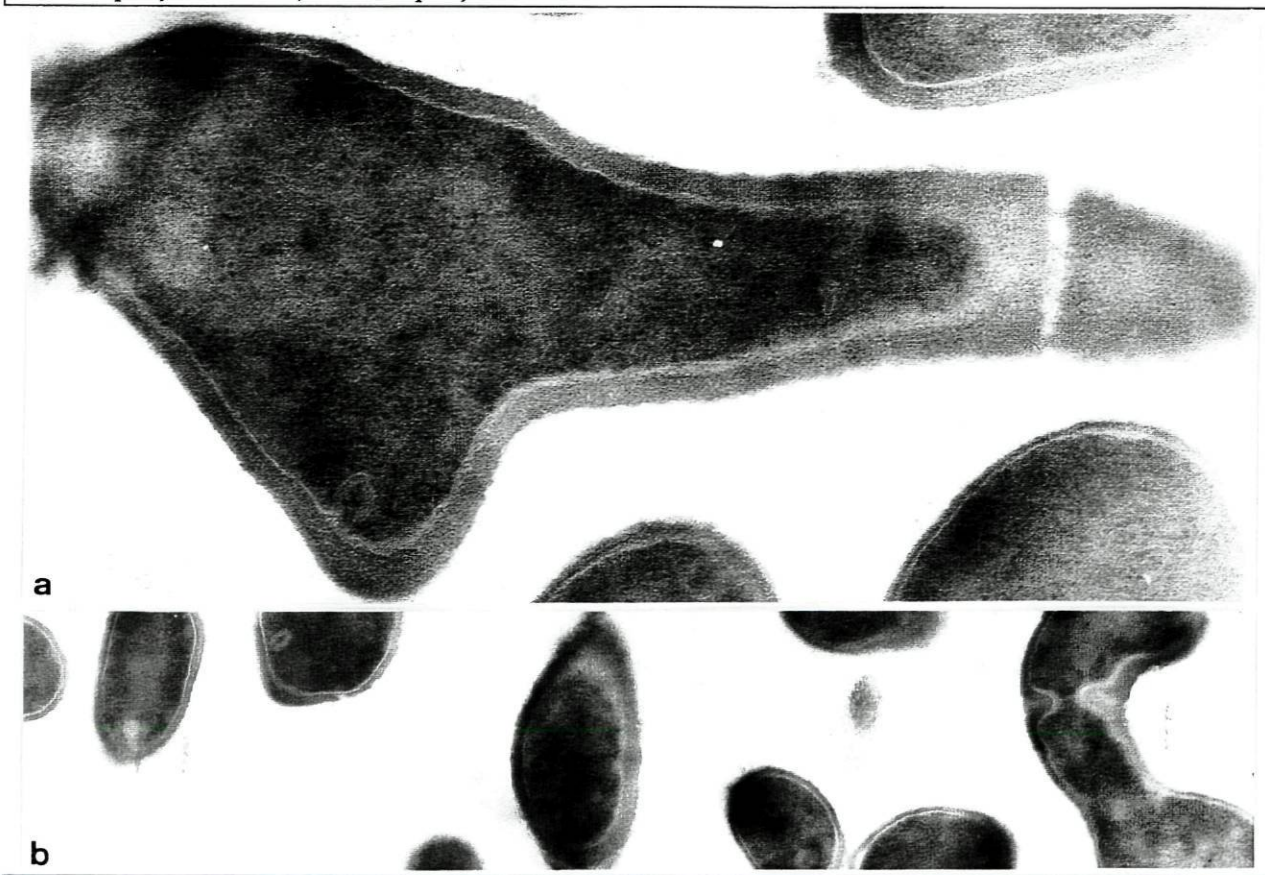


Figura 63 - Ultraestrutura de células de *L. monocytogenes* colhidas de uma cultura exponencial em meio TSB PH (5,0), 15 minutos após a adição de 100 UI/ml de nisina. Fixação GaFaCa/OsO_4.
• **a** - Ampliação 60 000 x; • **b** - Ampliação 29 000 x.

3.5 - Efeito da nisina sobre protoplastos bacterianos

Os protoplastos foram obtidos a partir das diferentes espécies bacterianas estudadas, como descrito em material e métodos, partindo de culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3.

Microfotografias de microscopia electrónica permitiram-nos comparar amostras controlo com amostras tratadas por nisina. Para este estudo foi usada a concentração de 25 UI/ml de nisina e um tempo de actuação de 5 minutos, uma vez que o resultado aos 30 minutos se revelou idêntico.

A partir da amostra controlo pudemos observar protoplastos de forma redonda, apresentando uma membrana citoplasmática com perfil assimétrico, raras células em desintegração, fragmentos dispersos e particularmente de parede celular: *B. cereus* (Fig. 64a); *B. subtilis* (Fig. 65a); *E. faecium* (Fig. 66a) e *L. monocytogenes* (Fig. 67a).

O tratamento durante 5 minutos com 25 UI/ml de nisina provocou um esvaziamento da maioria dos protoplastos apresentando-se apenas vísivel a sua membrana circulante de perfil simétrico e restos celulares. Foram mantidos, embora em muito pequeno número, protoplastos intactos e células intactas: *B. cereus* (Fig. 64b); *B. subtilis* (Fig. 65b); *E. faecium* (Fig. 66b) e *L. monocytogenes* (Fig. 67b).

Figura 64 - Ultraestrutura de protoplastos de *B. cereus*. Fixação GaFaCa/OsO_4.
- **a** - Na ausência de nisina (controlo). Ampliação 66 000 x.
- **b** - 5 minutos após tratamento com 25 UI/ml de nisina. Ampliação 31 000 x.

Figura 65 - Ultraestrutura de protoplastos de *B. subtilis*. Fixação GaFaCa/OsO_4.
- **a** - Na ausência de nisina (controlo). Ampliação 66 000 x.
- **b** - 5 minutos após tratamento com 25 UI/ml de nisina. Ampliação 30 000 x.

Figura 66 - Ultraestrutura de protoplastos de *E. faecium*. Fixação GaFaCa/OsO_4.
- **a** - Na ausência de nisina (controlo). Ampliação 30 000 x.
- **b** - 5 minutos após tratamento com 25 UI/ml de nisina. Ampliação 29 000 x.

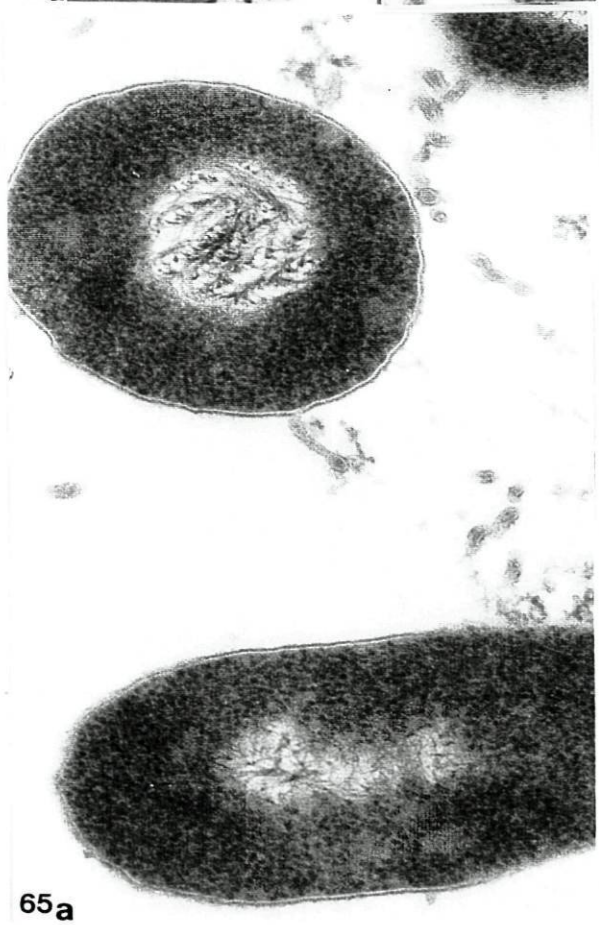
Figura 67 - Ultraestrutura de protoplastos de *L. monocytogenes*. Fixação GaFaCa/OsO_4.
- **a** - Na ausência de nisina (controlo). Ampliação 60 000 x.
- **b** - 5 minutos após tratamento com 25 UI/ml de nisina. Ampliação 27 000 x.



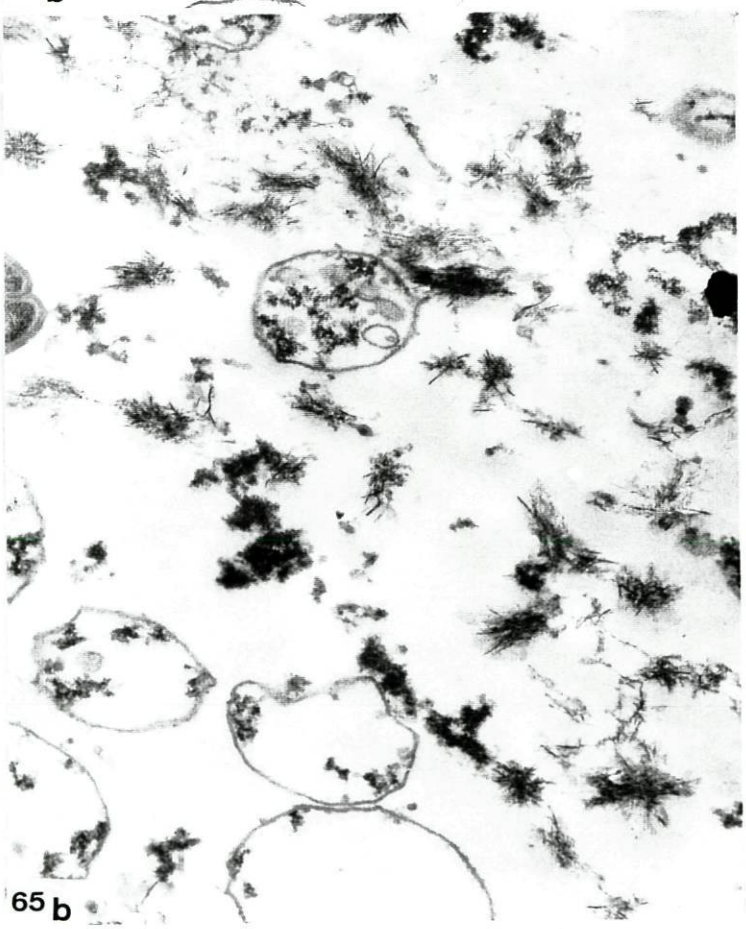
64a



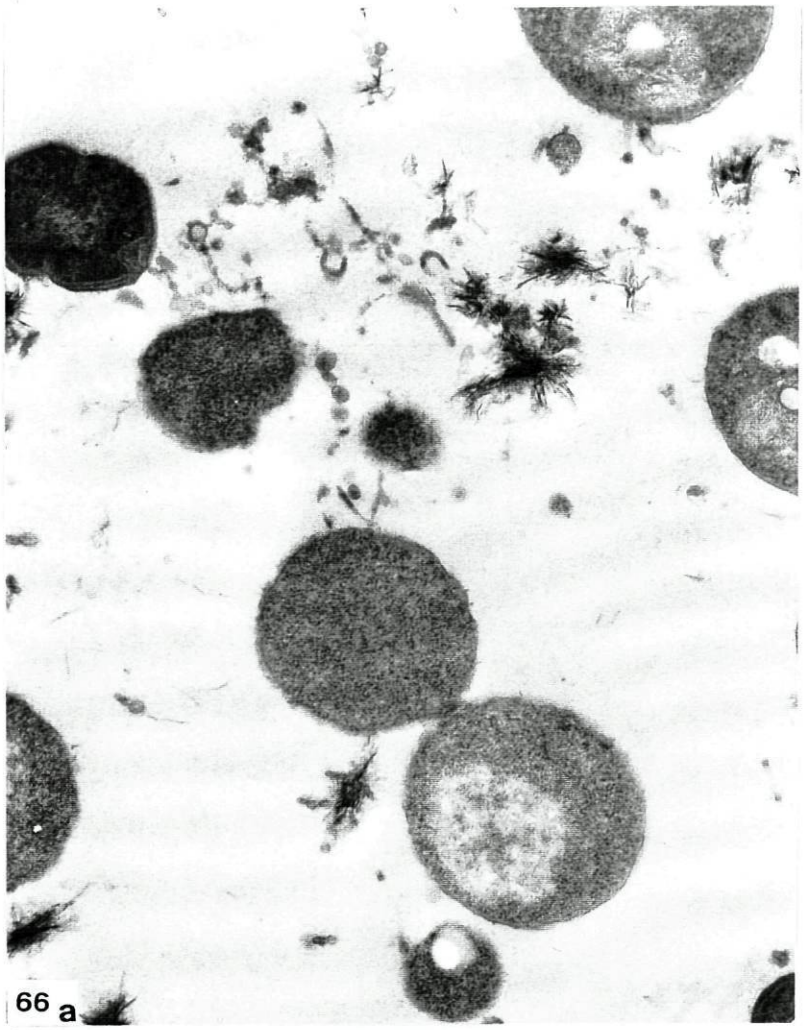
64b



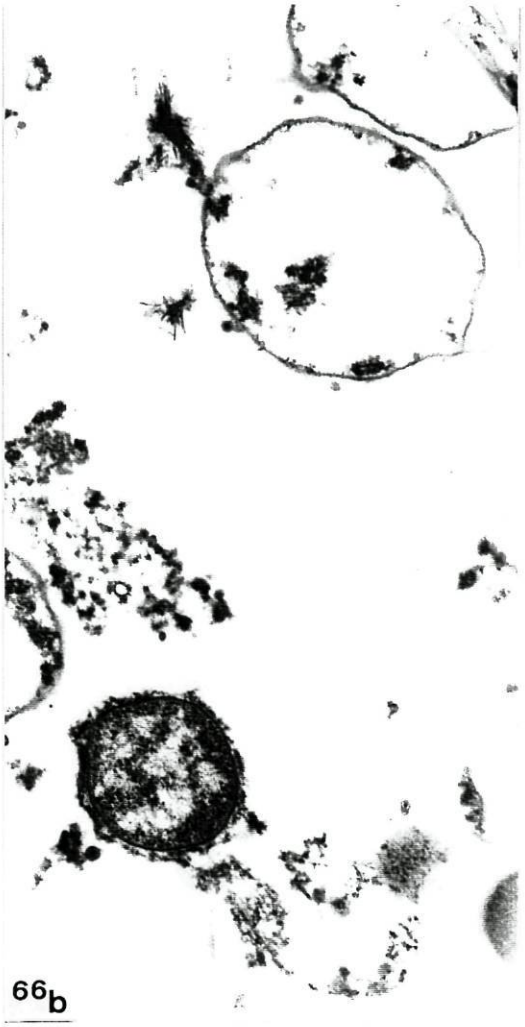
65a



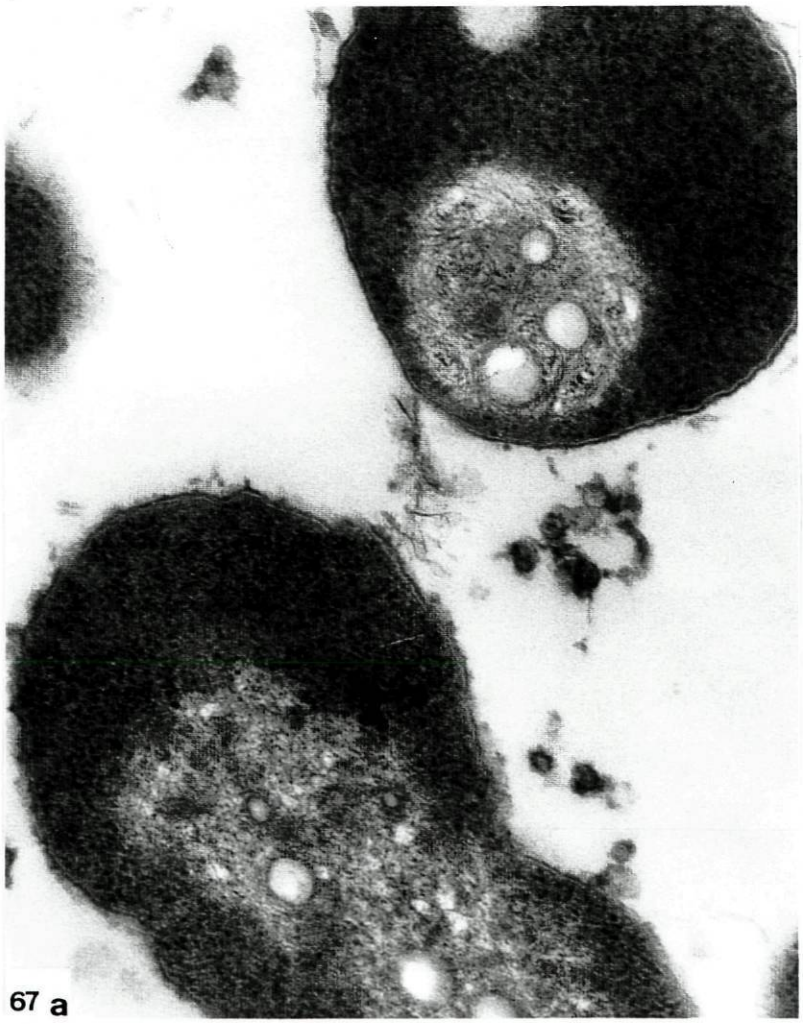
65b



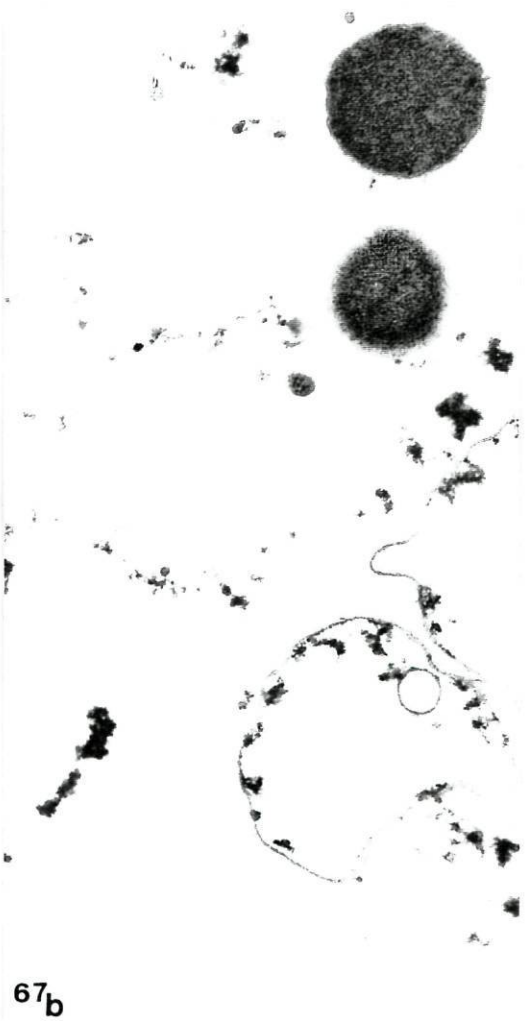
66 a



66 b



67 a



67 b

4 - Alterações fisiológicas induzidas pela nisina

4.1 - Alterações de permeabilidade da membrana citoplasmática

Observamos o efeito da nisina sobre as células bacterianas, nomeadamente ao nível da ultraestrutura, e verificamos o aparecimento muito precoce da alteração do perfil da membrana citoplasmática de assimétrico para simétrico, embora a rapidez e intensidade da resposta tenha variado com a espécie bacteriana e a concentração de nisina usada.

Para avaliar da integridade desta estrutura foram efectuados ensaios para estudar o efluxo de potássio (K^+) intracelular. A técnica habitualmente utilizada para efectuar estas determinações recorria a uma avaliação do ião K^+ por fotometria de chama em filtrados de suspensões bacterianas, antes e após a adição da nisina. Uma grande limitação desta tecnologia consiste no tempo que é necessário para obter um filtrado isento de células. A filtração das culturas requer equipamento e operadores a actuar de forma sincronizada, de modo a minorar o mais possível o tempo que medeia entre a adição do composto a testar e a obtenção de um filtrado isento de células. Perante esta limitação, e depois de constatar que a saída de K^+ intracelular ocorreu nos primeiros segundos após a adição da nisina, para *B. cereus*, foi adoptado o método de avaliação por potenciometria directa usando um eléctrodo selectivo ao ião K^+, tendo assim sido possível determinar continuamente e directamente na suspensão bacteriana a concentração extracelular de K^+, no tempo real. Este foi assim o processo escolhido para avaliar da cinética de libertação do ião K^+ intracelular, ao longo do tempo, em função da adição de diferentes concentrações de nisina.

As determinações foram efectuadas pelas duas técnicas, pelo que se apresentam resultados das duas situações, sendo de salientar que as unidades em que se apresentam são diferentes. Os ensaios efectuados por potenciometria directa incidiram unicamente sobre bactérias que se desenvolveram em meio a PH 7,3 (Fig. 68). O estudo por fotometria de chama foi efectuado sobre bactérias que se desenvolveram em meios com PH 7,3 e PH 5,0 (Figs. 69,70).

Os registos apresentados mostram o decorrido durante os primeiros 10 minutos, imediatamente após a adição da nisina, tendo início no tempo zero (imediatamente antes da adição).

Verificamos que os valores se mantiveram sem alterações relevantes durante 30 minutos de incubação (dados não registados nos gráficos).

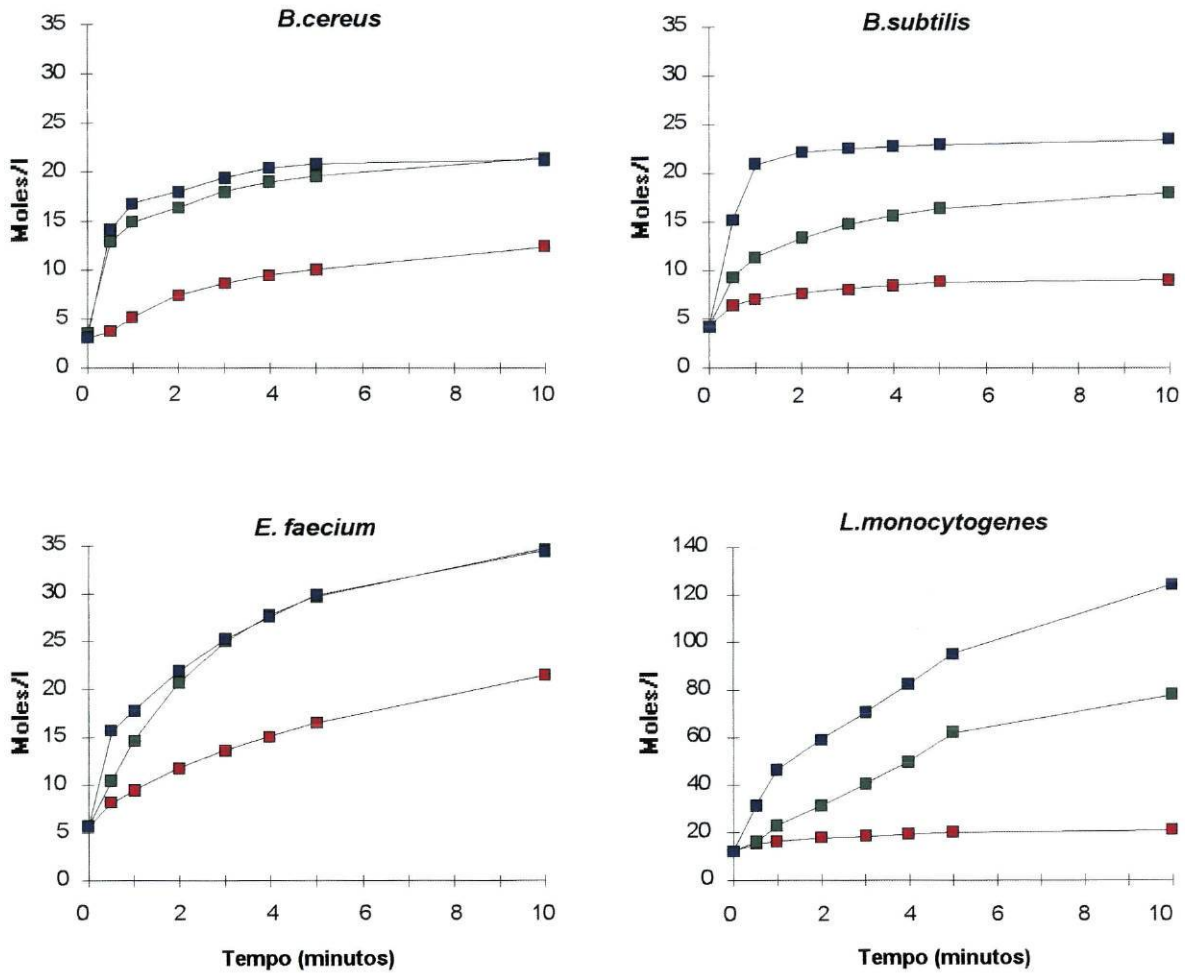


Figura 68 - Efluxo de K^+ observado por adição de nisina (■ 10 UI/ml; ■ 25 UI/ml; ■ 100 UI/ml), a suspensões bacterianas em água de peptona 0,1%, preparadas a partir de culturas exponenciais no meio descrito para o efeito e com uma concentração de 3-5 x 10^8 células/ml. As determinações foram efectuadas por potenciometria directa usando um eléctrodo selectivo de K^+, mergulhado directamente nas suspensões celulares.
A concentração de ião K^+ foi expressa em [Moles/l x 10^{-5}]. De notar o facto de os valores de partida serem mais elevados para a *L. monocytogenes*.

Esta técnica permitiu-nos acompanhar e registar continuamente o que ocorreu no tempo. Verificamos que as saídas de potássio foram muito pronunciadas nos primeiros 60 segundos, continuando no tempo de uma forma mais progressiva. A resposta foi naturalmente dependente da concentração de nisina tendo-se revelado muito reduzida para 10 UI/ml e significativa para 25 e 100 UI/ml. Em relação ao *B. cereus*, verificamos uma resposta semelhante pela adição de 25 ou de 100 UI/ml. Para *B. subtilis* verificamos uma resposta muito acentuada para 100 UI/ml

(praticamente todo o ião foi extracelular ao fim de 60 segundos), sendo a saída bastante mais lenta e inferior para 25 UI/ml. *E. faecium* e *L. monocytogenes* registam efluxos mais lentos, sendo os teores em potássio intracelular mais elevados para estas espécies (Fig. 68).

O estudo por fotometria de chama confirmou que grande parte do potássio que deixou a célula bacteriana o fez nos 2 primeiros minutos após a adição de nisina e igualmente verificamos as diferenças registadas em relação à concentração de nisina e à espécie bacteriana. Por esta técnica comparamos o teor de K^+, após tratamento, com o teor total do ião presente na suspensão bacteriana, determinado após destruição das células bacterianas por fervura (Fig. 69).

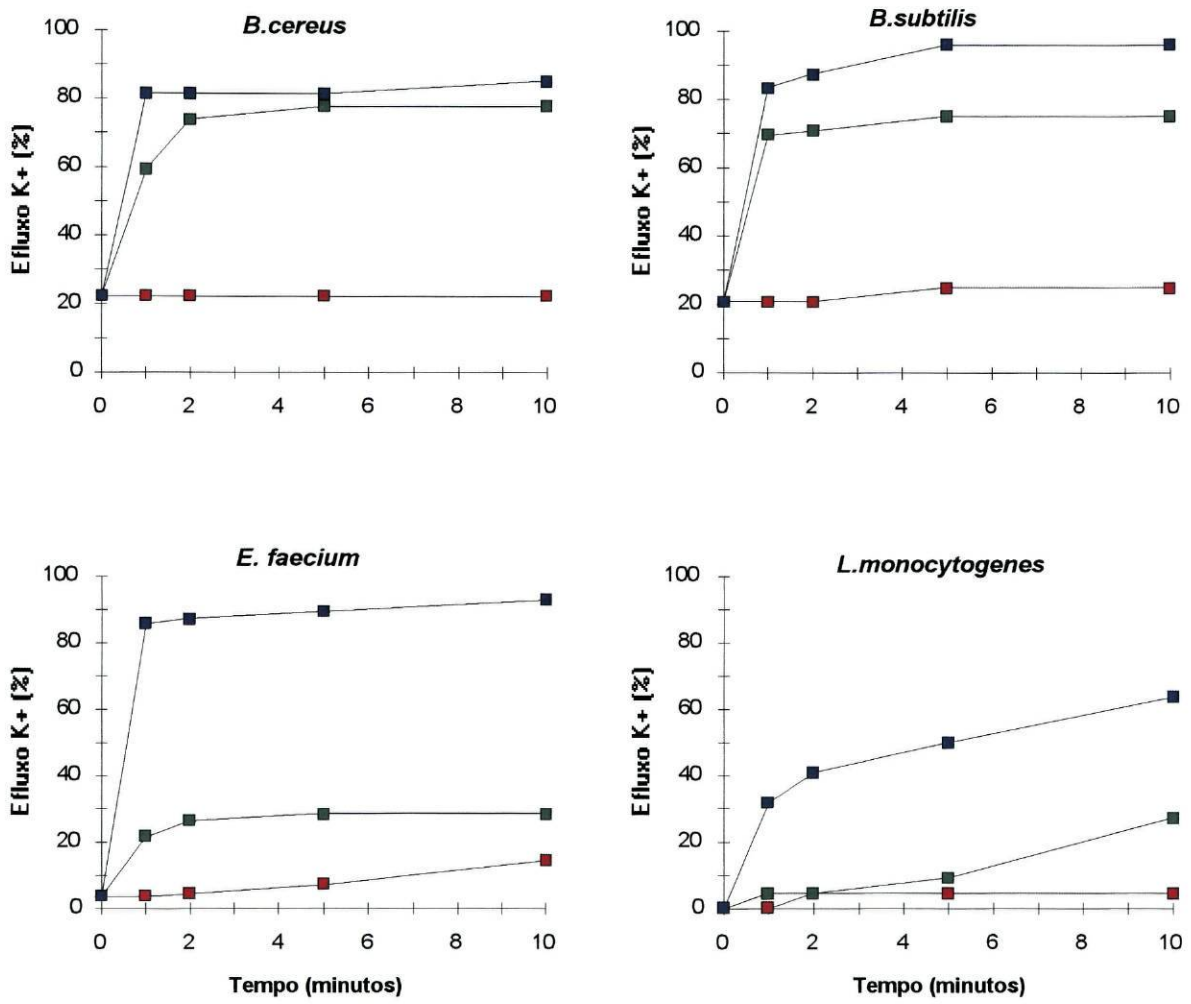


Figura 69 - Efluxo de K^+ observado por adição de nisina a suspensões bacterianas em água de peptona 0,1%, preparadas a partir de culturas exponenciais no meio descrito para o efeito (PH 7,3) e com uma concentração de 3-5 x 10^8 células/ml. As determinações foram efectuadas por fotometria de chama em filtrados das suspensões da amostra controlo ■ e tratadas (■ 25 UI/ml; ■ 100 UI/ml). A concentração do ião K^+ foi expressa em %, calculada em relação ao total de potássio. Os 100% de K^+ foram determinados nos filtrados das suspensões celulares das diferentes estirpes fervidas durante 30 minutos.

Quando as células foram cultivadas em meio de cultura com um PH inicial (5,0), os resultados deste estudo mostraram algumas diferenças, particularmente na rapidez de saída do ião para a concentração mais baixa de 25 UI/ml de nisina, para todas as espécies bacterianas. De facto, para esta situação a resposta obtida com 25 e 100 UI/ml de nisina foi muito idêntica (Fig. 70). Estes resultados indicam que a membrana citoplasmática apresenta a sua integridade danificada. Os estudos turbidimétricos e de microscopia óptica tinham revelado ausência de lise quando a nisina foi adicionada a culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0 mas, as células apresentavam uma reacção ao Gram alterada, ou seja coradas de vermelho e sem viabilidade.

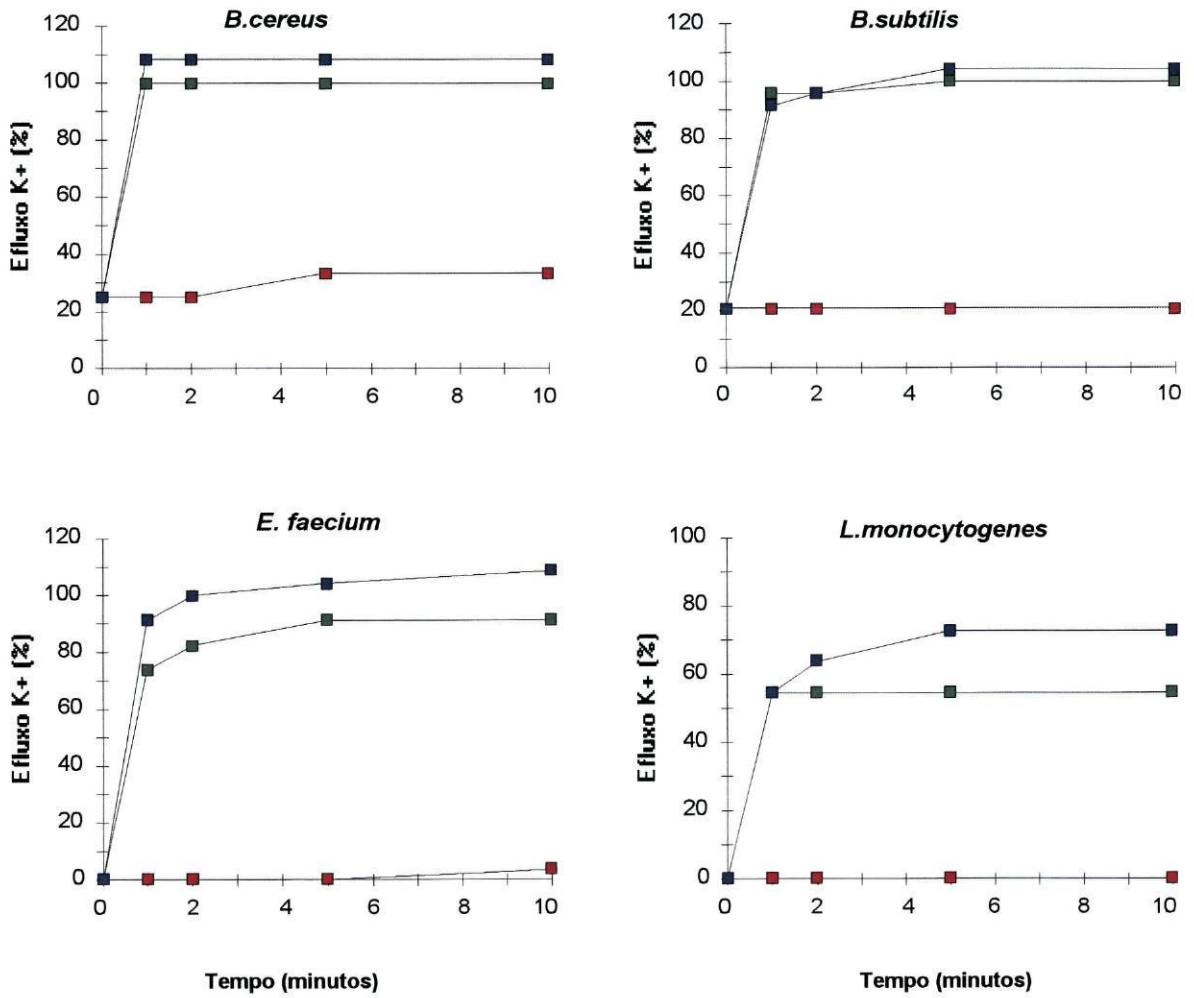


Figura 70 - Efluxo de K^+ observado por adição de nisina a suspensões bacterianas em água de peptona 0,1%, preparadas a partir de culturas exponenciais no meio descrito para o efeito (PH 5,0) e com uma concentração de 3-5 x 10^8 células/ml. As determinações foram efectuadas por fotometria de chama em filtrados das suspensões da amostra controlo ■ e tratadas (■ 25 UI/ml; ■ 100 UI/ml). A concentração do ião K^+ foi expressa em %, calculada em relação ao total de potássio. Os 100% de K^+ foram determinados nos filtrados das suspensões celulares das diferentes estirpes fervidas durante 30 minutos.

4.2 - Inibição da actividade enzimática localizada na membrana citoplasmática

4.2.1- Inibição da actividade respiratória

A actividade respiratória em células bacterianas pode ser avaliada quantitativamente através da redução do ião trifenil tetrazólio a diformazan, baseada na actividade da desidrogenase succínica, a qual é uma enzima localizada na membrana citoplasmática (Machtiger e Fox, 1973; Pollock e col., 1971).

Os resultados apresentados para *E. faecium* e *L. monocytogenes* não podem ser directamente comparáveis uma vez que para suspensões com idêntica densidade óptica os valores de Absorvância do controlo de *B. cereus* e *B. subtilis* foram da ordem de 2,5-3,5 e para *E. faecium* e *L. monocytogenes* apenas de 0,1- 0,2.

A actividade respiratória diminuiu bruscamente por tratamento de suspensões celulares de *B. cereus,* durante 10 minutos, com 5 UI/ml de nisina. Para *B. subtilis* apenas obtivemos uma inibição superior a 50% para uma concentração de nisina de 25 UI/ml. Em relação ao *E. faecium* e *L. monocytogenes*, e tendo em conta o facto de 100 % corresponderem a uma actividade muito baixa, verificamos que essa actividade não foi significativamente afectada pela nisina para o *E. faecium* mas, foi inibida em mais de 50% para *L. monocytogenes,* por tratamento com 25 UI/ml de nisina (Fig. 71).

O mesmo estudo efectuado por tratamento, com diferentes concentrações de nisina, de suspensões bacterianas preparadas a partir de culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0 revelou-nos um efeito mais intenso para as concentrações mais baixas do lantibiótico. Unicamente o *E. faecium* não respondeu ao tratamento, tendo apenas sido usadas as concentrações de 5, 12,5 e 25 UI/ml de nisina. A resposta obtida para *B. cereus* e *B. subtilis* foi muito idêntica quando se usaram estas condições (Fig. 72).

As figuras 71b e 72b representam, de uma forma comparativa, a resposta das diferentes espécies bacterianas, perante a mesma concentração de nisina.

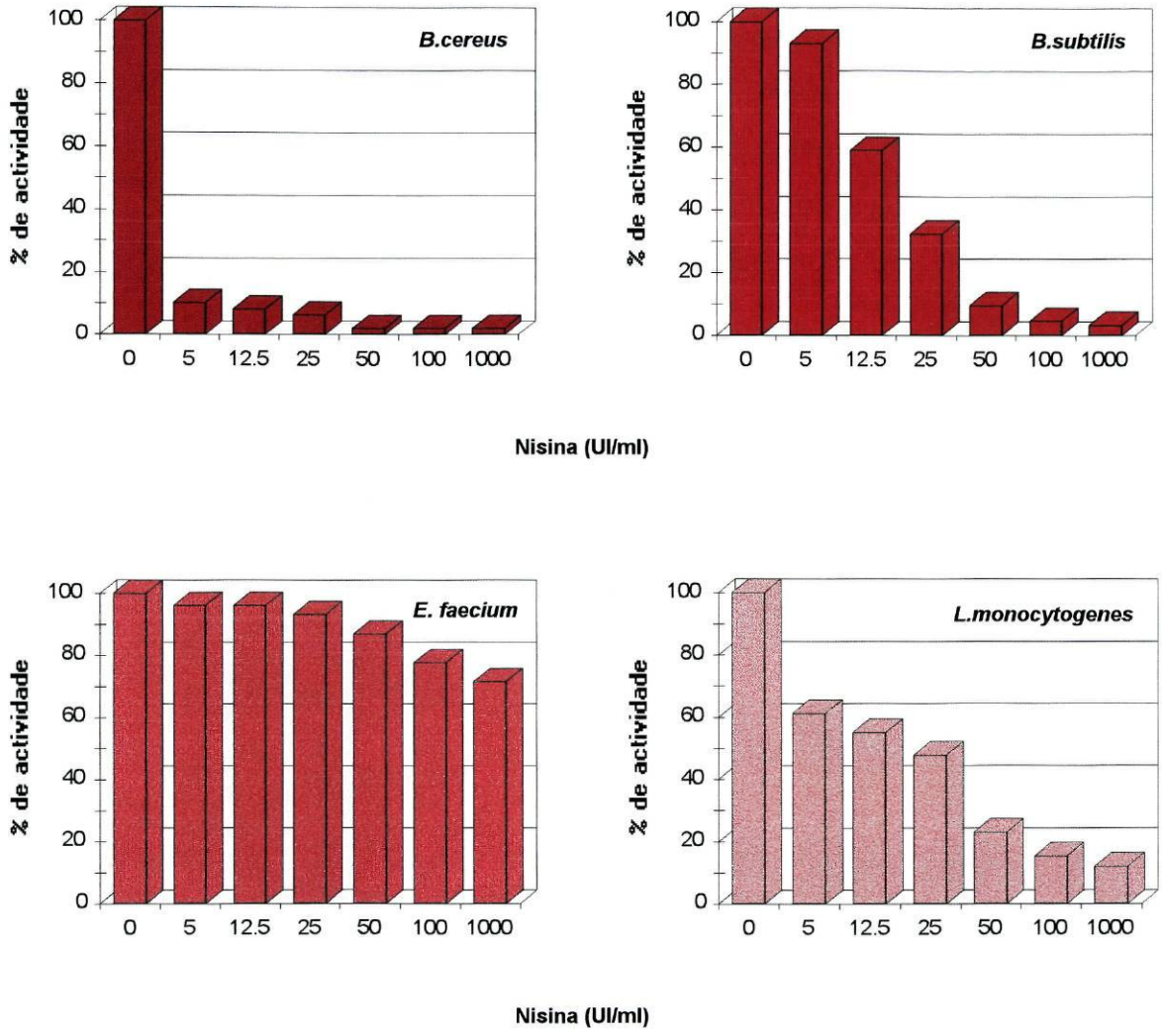


Figura 71-a - Actividade respiratória em células bacterianas obtidas de culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3. Inibição da actividade redutora do ião trifenil tetrazólio, em função da concentração de nisina adicionada às suspensões celulares das diferentes estirpes. Consideramos como 100% de actividade o valor de Absorvância a 485 nm resultante da redução do tetrazólio, obtido nas suspensões bacterianas não tratadas.

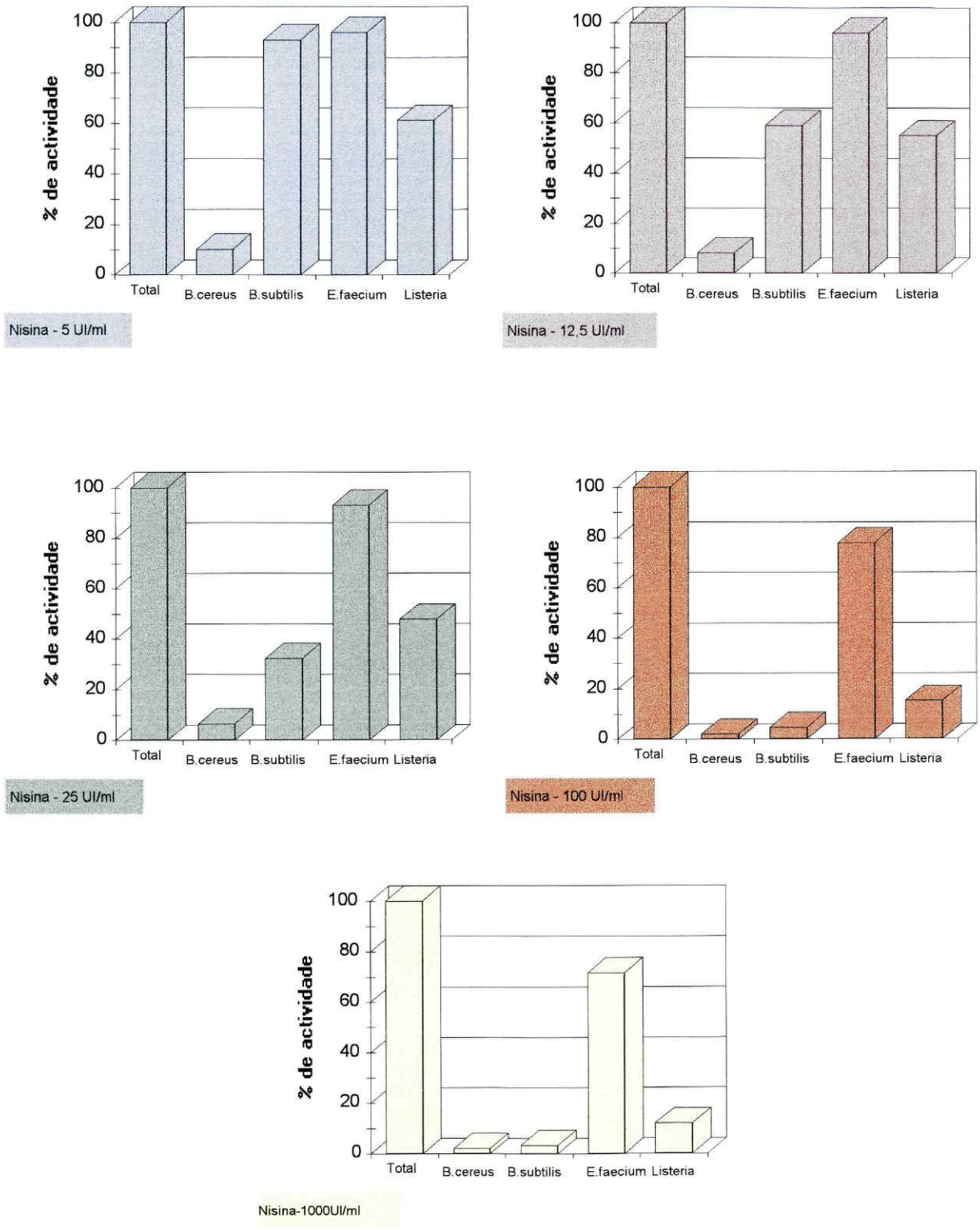


Figura 71-b - Representação comparativa em função da concentração de nisina. Actividade respiratória em células bacterianas obtidas de culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3. Inibição da actividade redutora do ião trifenil tetrazólio em função da concentração de nisina adicionada às suspensões celulares das diferentes estirpes. Consideramos como 100% de actividade o valor de Absorvância a 485 nm resultante da redução do tetrazólio, obtida nas suspensões bacterianas não tratadas.

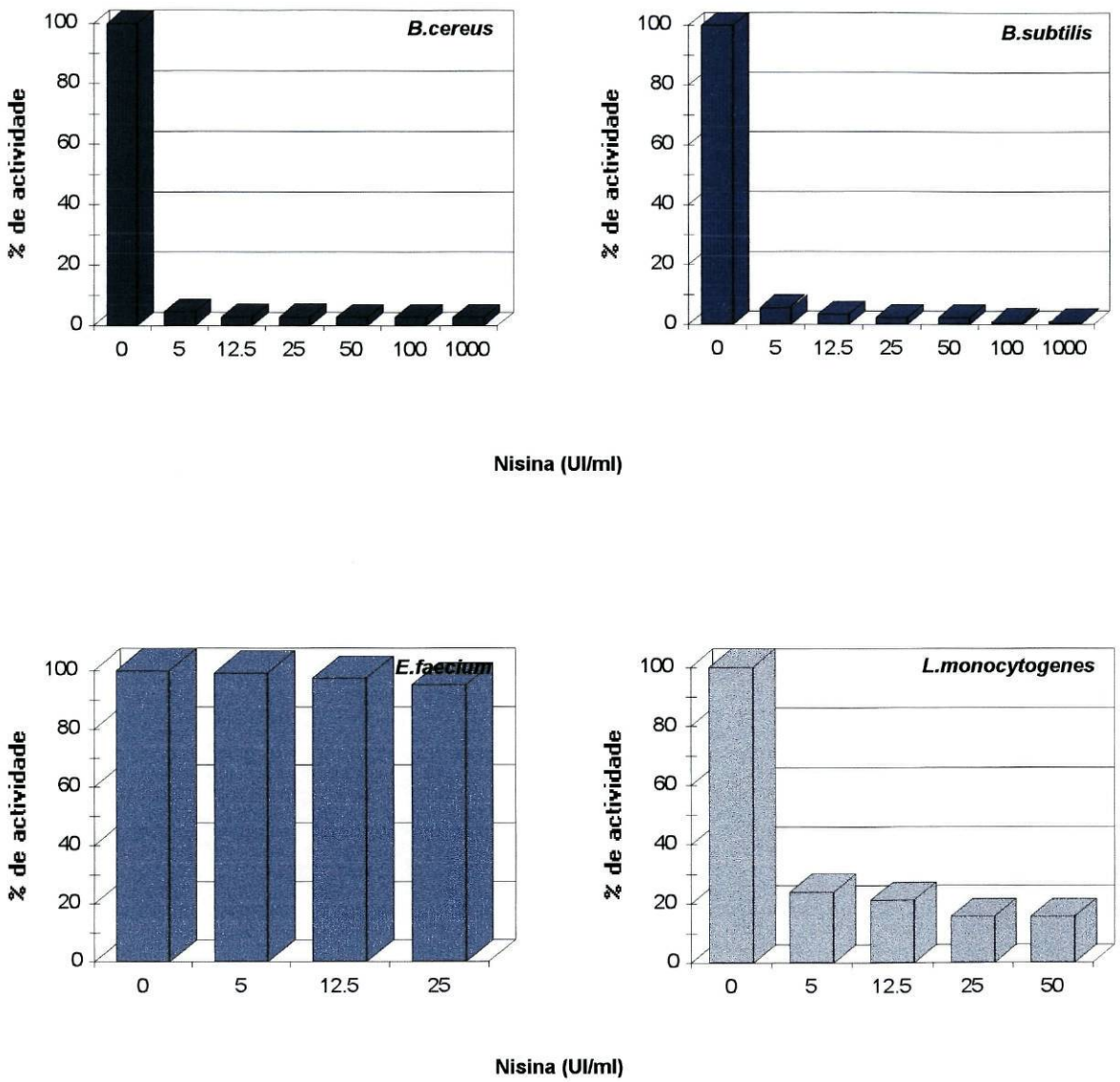


Figura 72-a - Actividade respiratória em células bacterianas obtidas em meio de TSB PH 5,0. Inibição da actividade redutora do ião trifenil tetrazólio, em função da concentração de nisina adicionada às suspensões celulares das diferentes estirpes. Consideramos como 100% de actividade o valor de Absorvância a 485 nm resultante da redução do tetrazólio, obtida nas suspensões bacterianas não tratadas.

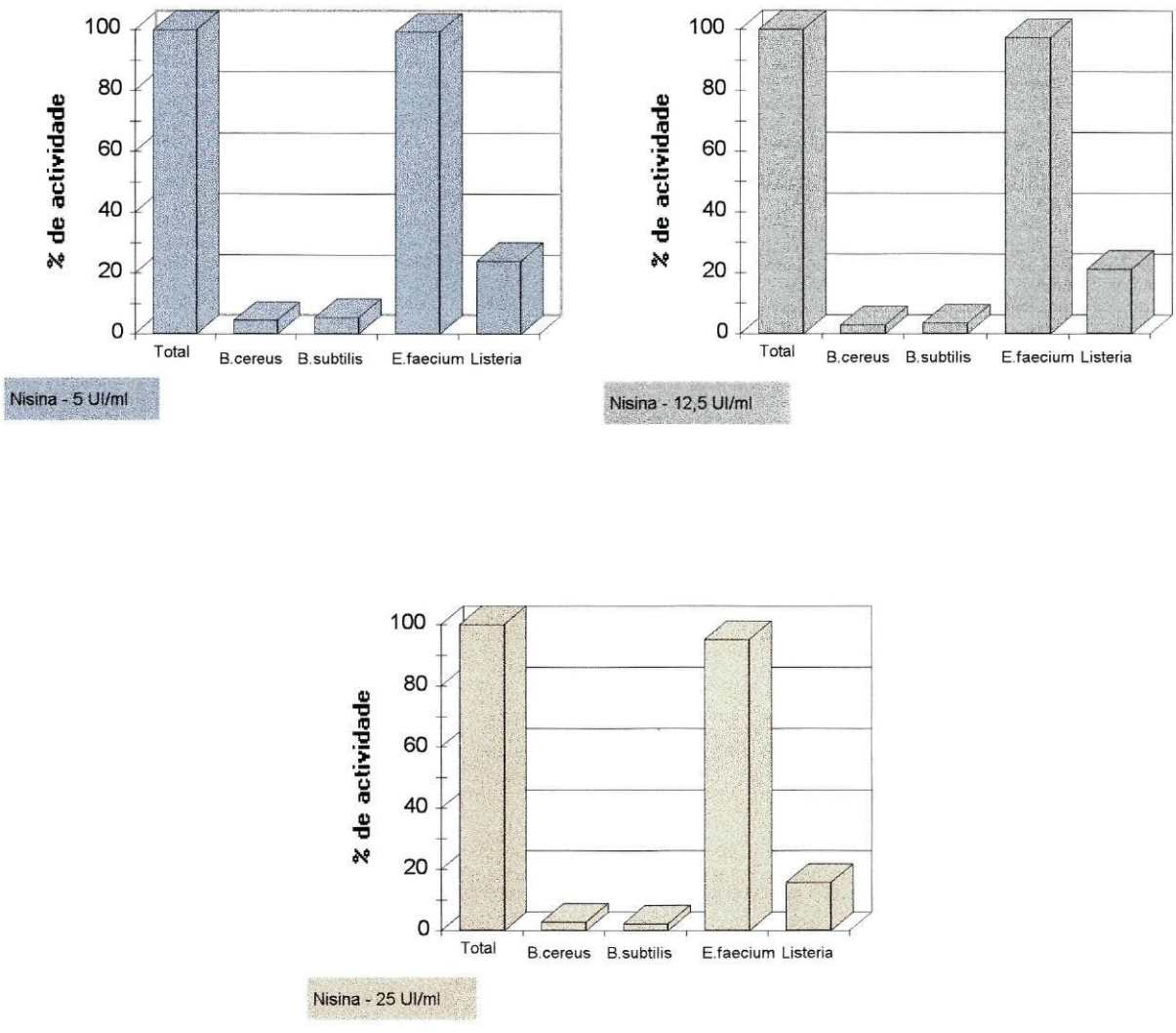


Figura 72-b - Representação comparativa em função da concentração de nisina. Actividade respiratória em células bacterianas obtidas em meio de TSB PH 5,0. Inibição da actividade redutora do ião trifenil tetrazólio em função da concentração de nisina adicionada às suspensões celulares das diferentes estirpes. Consideramos como 100% de actividade o valor de Absorvância a 485 nm resultante da redução do tetrazólio, obtida nas suspensões bacterianas não tratadas.

4.2.2 - Actividade da desidrogenase succínica em membranas isoladas

Na tentativa de estudar o efeito directo da nisina sobre a actividade de enzimas com localização na membrana citoplasmática, e cuja função é dependente da composição fosfolipídica dessa estrutura, obtivemos membranas isoladas das diferentes estirpes bacterianas, tendo estas sido usadas para o estudo da actividade enzimática da desidrogenase succínica. Os resultados apresentados na figura 73 revelaram uma actividade da enzima em presença do substrato (succinato de sódio), a qual foi visível para o controlo, por uma descida da Absorvância a 600 nm, num tempo aproximado de 3 minutos. Será de salientar o facto de a actividade desta enzima se ter revelado quase nula para *E. faecium* e para *L. monocytogenes*. A espécie que mostrou maior actividade, em membranas isoladas de células obtidas de culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3, foi o *B.cereus*.

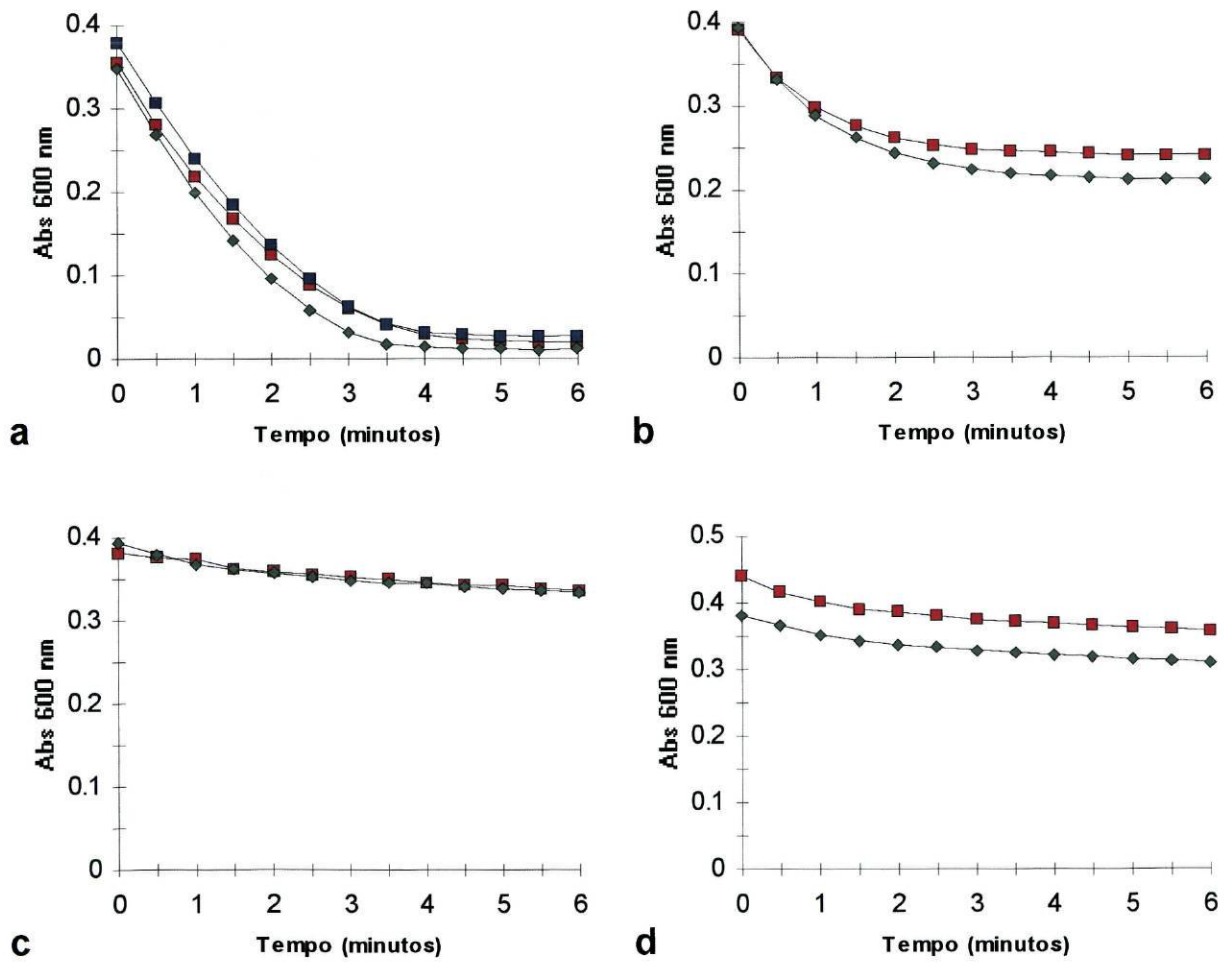


Figura 73 - Actividade da desidrogenase succínica em membranas isoladas a partir de culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3. A actividade foi avaliada em função do decréscimo dos valores da Absorvância a 600 nm, para amostras controlo ■ e amostras tratadas por 10 minutos com nisina (■ 100 UI/ml; ◆ 1000 UI/ml).
a - *B. cereus*; **b** - *B. subtilis*; **c** - *E. faecium*; **d** - *L. monocytogenes*.

Os resultados obtidos a partir de suspensões de membranas tratadas com nisina, durante 10 minutos, revelaram que a actividade desta enzima não foi significativamente afectada. Concentrações baixas de nisina não mostraram efeitos inibidores desta actividade e, por isso, a concentração apresentada é de 1000 UI/ml. No entanto, mesmo para esta concentração, os sinais de inibição da actividade desta enzima foram muito reduzidos.

Os resultados obtidos a partir de membranas isoladas de células colhidas da fase exponencial em meio de TSB PH 5,0 (Fig. 74) não se mostraram significativamente diferentes dos anteriores, no que respeita à inibição da actividade desta enzima. Contudo, uma diferença muito significativa foi observada na actividade enzimática para *B. subtilis*, a qual se mostrou mais intensa que para *B. cereus* e que era bastante mais reduzida para membranas isoladas de culturas a PH 7,3.

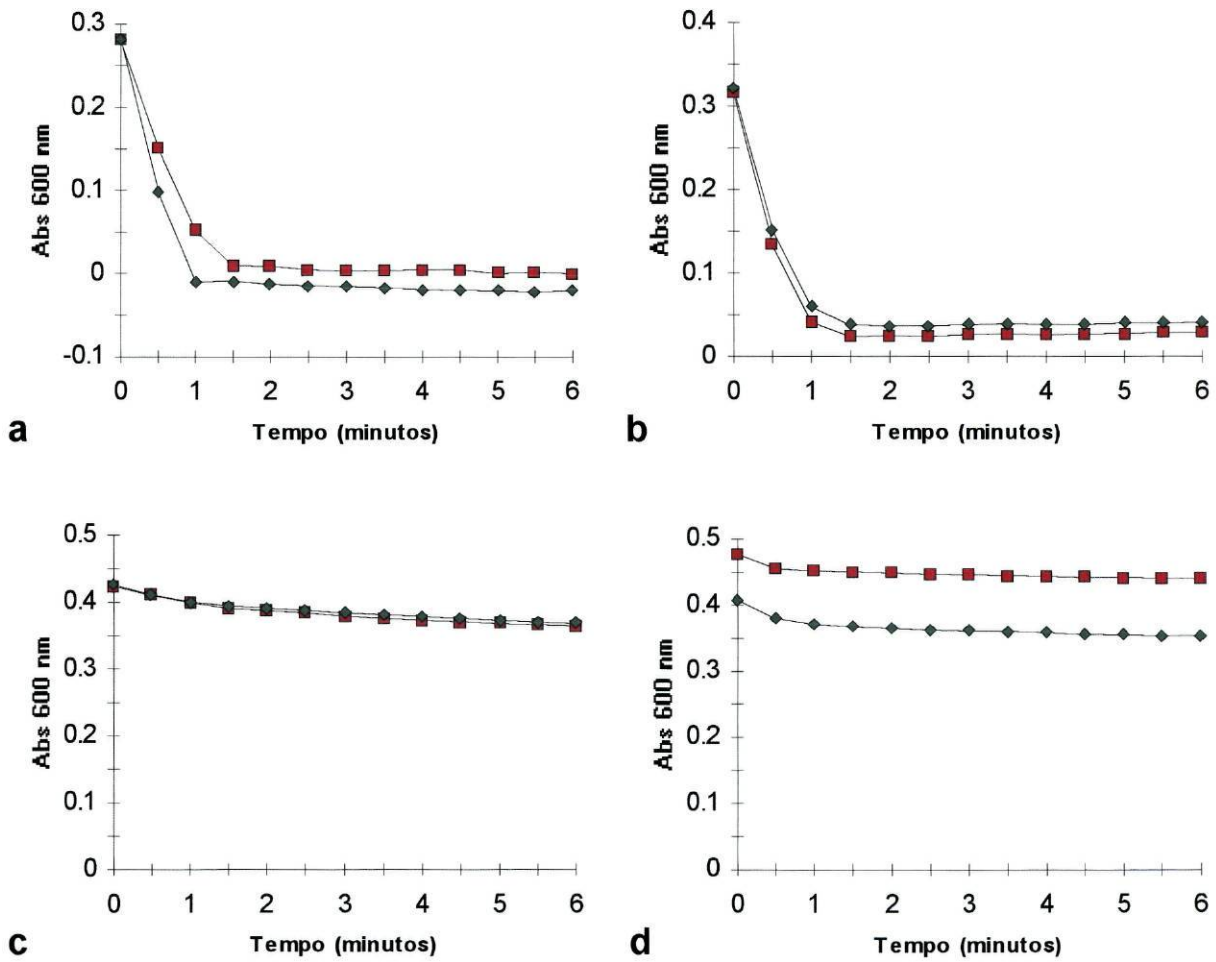


Figura 74 - Actividade da desidrogenase succínica em membranas isoladas a partir de culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0. A actividade foi avaliada em função do decréscimo dos valores da Absorvância a 600 nm, para amostras controlo ■ e amostras tratadas por 10 minutos com 1000 UI/ml de nisina ◆.
a - *B. cereus*; **b** - *B. subtilis*; **c** - *E. faecium*; **d** - *L. monocytogenes*.

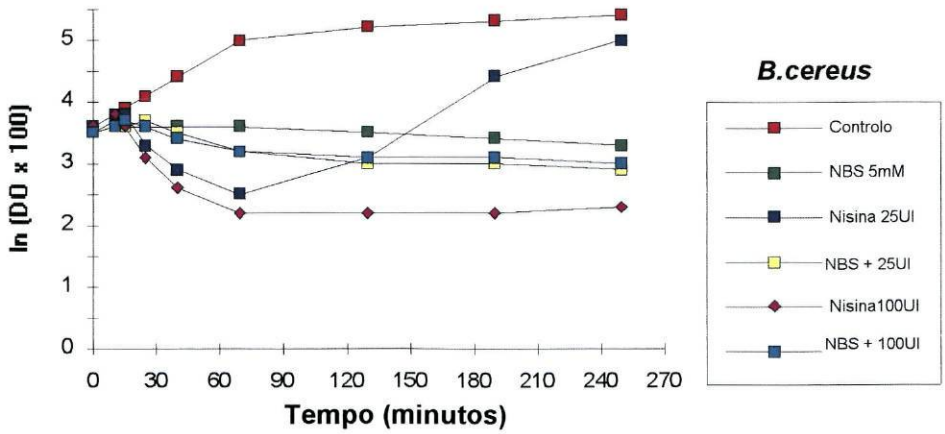
5 - Efeito da N-bromossuccinimida na lise celular induzida pela nisina

Este estudo incidiu sobre as alterações espectrofotométricas, por avaliação da Absorvância a 550 nm, e de morfologia, avaliada por microscopia óptica. O efeito da N-bromossuccinimida (NBS) foi estudado sobre culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3 e sobre suspensões celulares em diferentes tampões e a diferentes valores de PH.

5.1 - Estudo espectrofotométrico

5.1.1 - Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3

Tinhamos verificado anteriormente que a adição de nisina a culturas exponenciais das estirpes estudadas resultou em lise celular, observada pela acentuada descida da densidade óptica e aspecto obtido por microscopia óptica. O grau de lise foi diferente, dependendo da espécie bacteriana e da concentração de nisina. Verificamos igualmente que para culturas exponenciais em meio de TSB PH 5,0 a bacteriólise praticamente não ocorreu. Este resultado anterior justifica a escolha das culturas exponenciais em TSB PH 7,3 para efectuar este estudo.



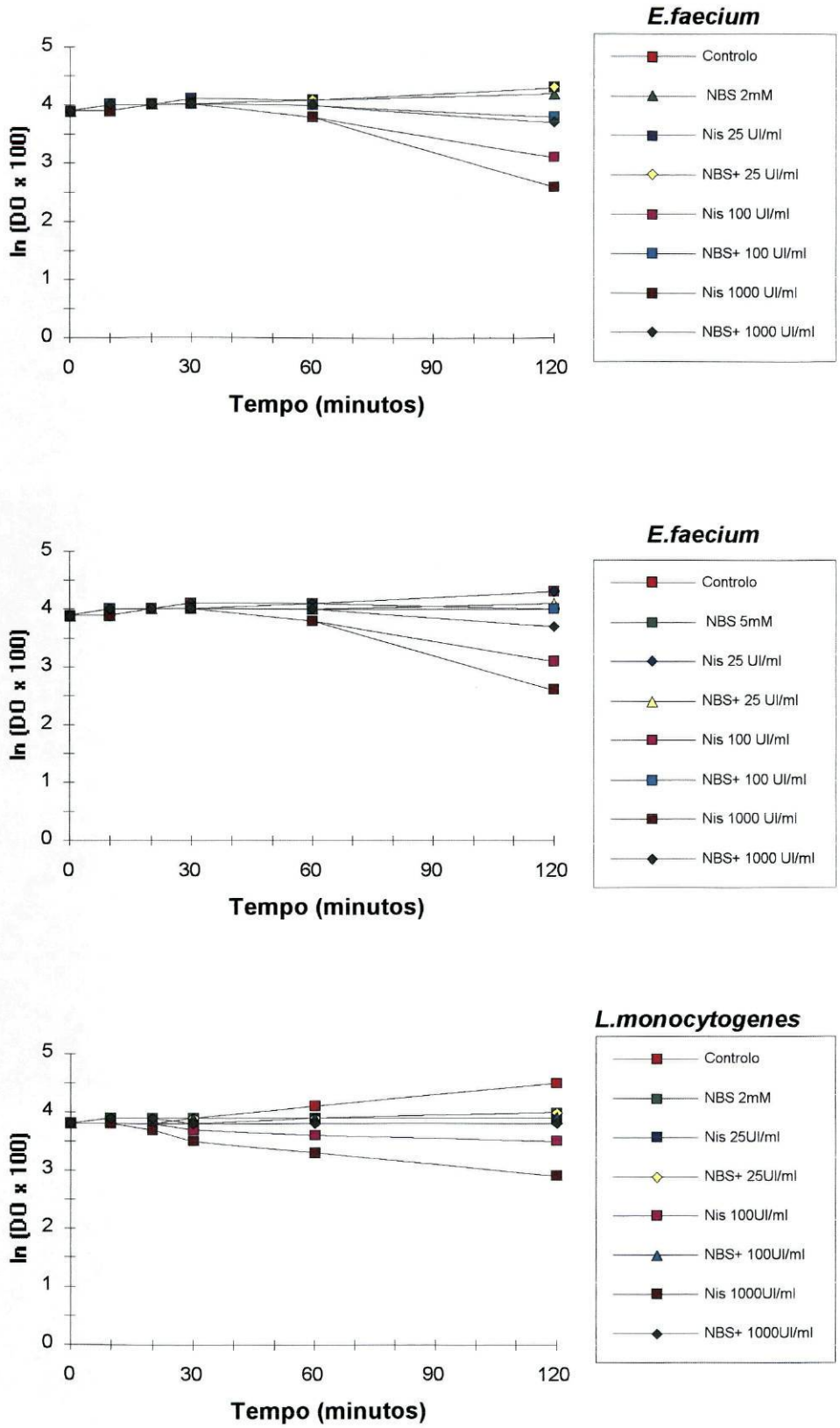


Figura 75 - Efeito da NBS na cinética de lise bacteriana. Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3 foram tratadas com NBS (2 mM ou 5 mM), com nisina, ou com nisina 10 minutos após tratamento com NBS. Avaliação espectrofotométrica da Absorvância a 550 nm.

Verificamos, através dos gráficos da figura 75, apresentados para *E. faecium*, que a utilização de uma concentração de 2 ou de 5 mM de NBS não afectou significativamente a resposta sobre o efeito da adição posterior da nisina, e, por este facto, a maioria das experiências foram realizadas com a concentração final de NBS 2 mM.

Uma vez que usamos culturas exponenciais em meio de TSB, a densidade óptica das culturas subiu durante a incubação, para o controlo.

Da análise dos gráficos da figura 75 pudemos concluir que o tratamento prévio das culturas, por 10 minutos, com NBS 2 mM ou 5 mM, resultou num ligeiro acréscimo nos valores da Absorvância a 550 nm e numa estabilização desses valores, após a adição da nisina. Assim, a NBS protegeu as células da bacteriólise provocada pela posterior adição da nisina. O efeito da nisina, usada isoladamente, foi testado simultaneamente, e os resultados foram os que anteriormente descrevemos, dependentes da espécie bacteriana e da sua concentração.

A NBS, isoladamente, provocou igualmente uma estabilização dos valores da Absorvância mas, relativamente ao controlo, verificamos que estas células se encontravam inviáveis, uma vez que a densidade óptica não voltou a aumentar, e efectuado um isolamento em gelose sangue, a partir dessas culturas, verificamos ausência de desenvolvimento, bem como para as culturas tratadas com NBS mais nisina. As culturas tratadas com nisina recuperaram o crescimento mais cedo ou mais tarde, conforme a concentração usada, e o isolamento a partir dessas culturas revelou desenvolvimento.

Os resultados apresentados pelo *B. subtilis* foram muito idênticos aos do *B. cereus*, com respostas mais acentuadas por adição de nisina, mesmo nas mais baixas concentrações, relativamente ao *E. faecium* e à *L. monocytogenes*.

5.1.2 - Suspensões celulares em tampão Tris-HCl

5.1.2.1 - Tampão Tris-HCl 0,05M; PH 8,0

Tal como nas culturas exponenciais, verificamos que a concentração final de 2 mM ou de 5 mM em NBS não afectou significativamente os resultados, como o demonstrou a experiência apresentada para *B. cereus* (Fig. 76). De salientar foi o facto de a suspensão bacteriana de *B. cereus* neste tampão, controlo, apresentar uma baixa estabilidade, ocorrendo uma descida

progressiva dos valores da Absorvância em função do tempo. A NBS mostrou inibir, igualmente, esta autólise espontânea.

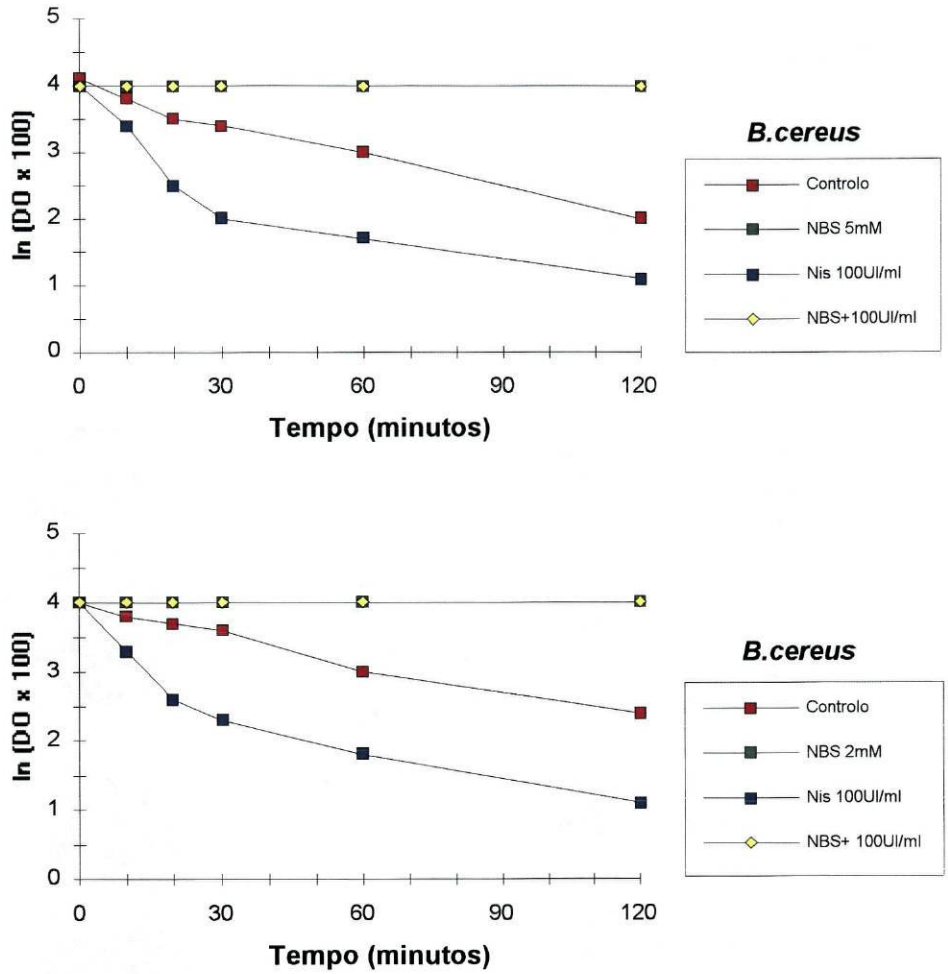
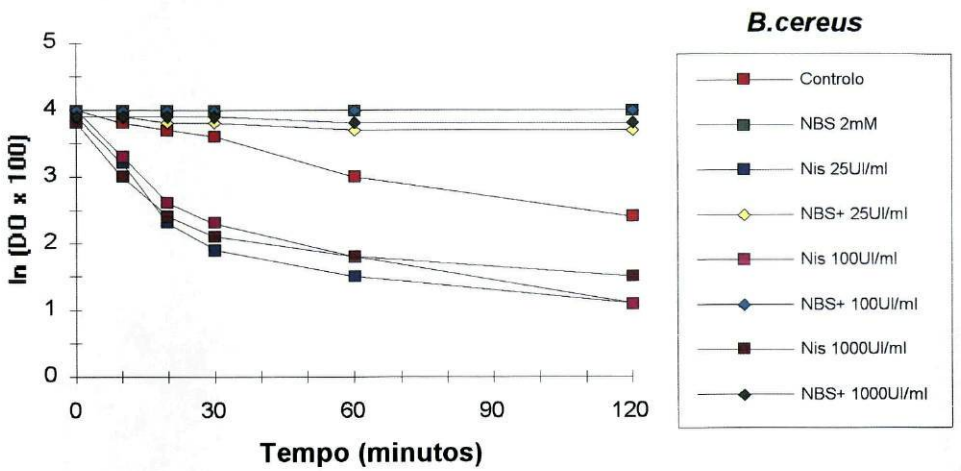


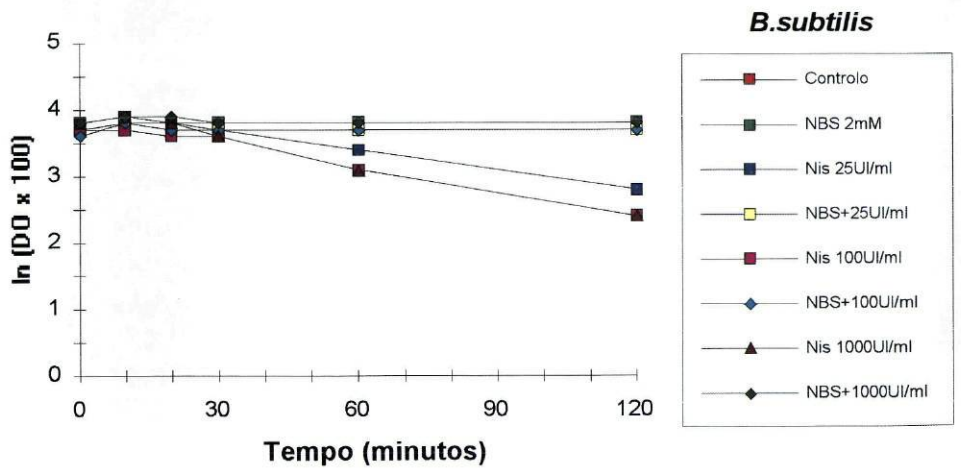
Figura 76 - Comparação do efeito da concentração de (2 mM) ou de (5 mM) de NBS na cinética de lise de *B. cereus*. As células da fase exponencial de crescimento foram suspensas em tampão Tris-HCl (0,05M; PH 8,0).

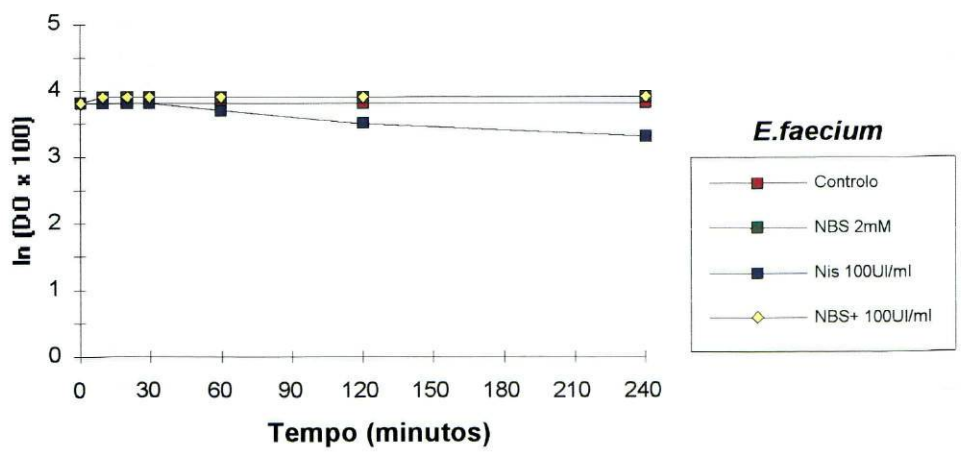
Feita a análise dos gráficos apresentados na figura 77, pudemos concluir que a resposta foi ligeiramente diferente conforme a espécie bacteriana em questão. Uma diferença significativa diz respeito à estabilidade dos diferentes microrganismos no tampão. Como já referimos anteriormente, a suspensão de *B. cereus* não foi muito estável durante toda a incubação, no entanto, esta instabilidade não foi observada nas suspensões dos outros microrganismos.

Relativamente ao efeito da nisina sobre a densidade óptica das suspensões celulares, verificamos que se confirmavam as conclusões tiradas para as culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3. Baixas concentrações de nisina afectaram acentuadamente a densidade óptica para *B.*

cereus, tendo uma resposta mais lenta e progressiva sido observada para *B. subtilis*. Para *E. faecium* e *L. monocytogenes* a descida foi ainda mais lenta e menos acentuada. Em todas as situações, e para qualquer das concentrações de nisina, verificamos que o tratamento prévio com NBS 2 mM, por 10 minutos, resultou numa estabilização dos valores da Absorvância a 550 nm.







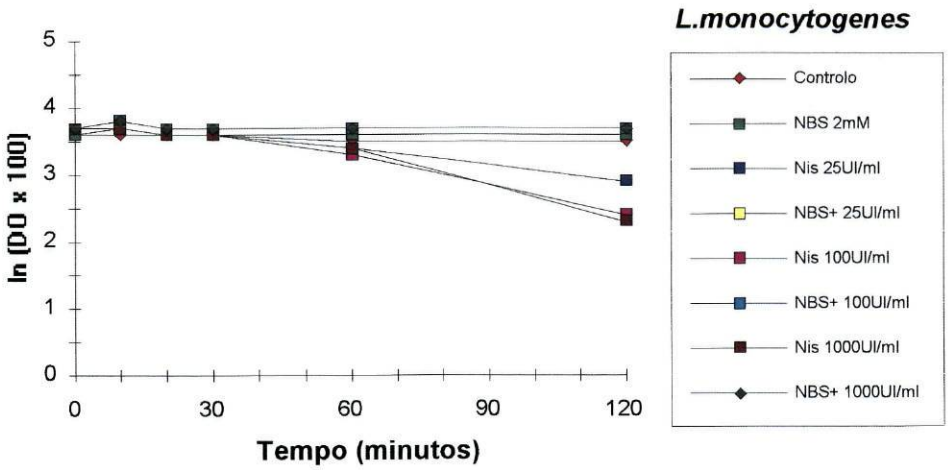
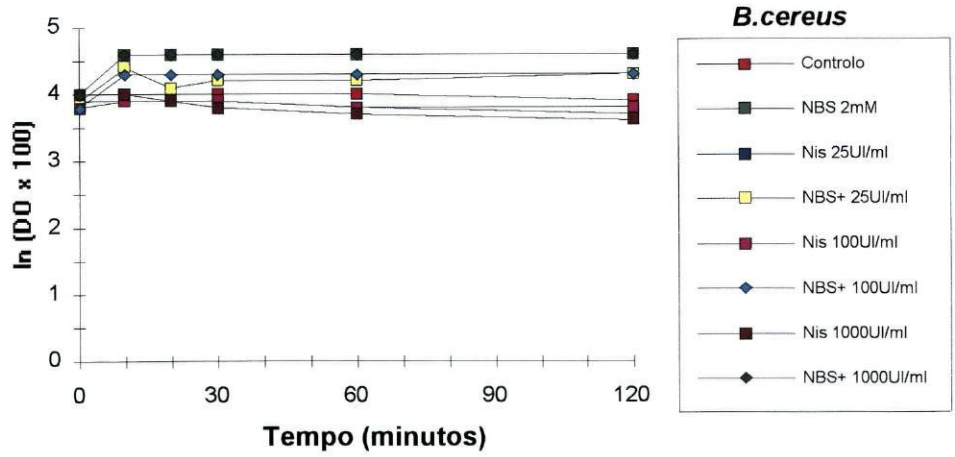


Figura 77 - Efeito da NBS (2 mM) na cinética de lise bacteriana. As células da fase exponencial de crescimento foram suspensas em tampão Tris-HCl (0,05M; PH 8,0).

5.1.2.2 - Tampão Tris-HCl 0,05M; PH 5,0

Como principais diferenças, relativamente ao tratamento de suspensões bacterianas nas mesmas condições mas a PH (8,0), temos: o aumento da Absorvância (cerca de 0,5) verificado quando da adição da NBS, o qual se manteve praticamente durante todo o período de incubação, ou sofreu ligeiros decréscimos com o tempo; os resultados foram diferentes dos anteriormente obtidos, com decréscimos muito ligeiros na densidade óptica quando da adição de nisina nas diferentes concentrações, com excepção para *E. faecium* no qual se observaram efeitos significativos pela adição de 100 UI/ml de nisina; estabilidade da densidade óptica das suspensões celulares durante praticamente toda a incubação, mesmo para *B. cereus* (Fig. 78). Os resultados foram idênticos para NBS 2 mM ou 5 mM. A adição de nisina não afectou significativamente a densidade óptica das suspensões tratadas com NBS 2 mM, por 10 minutos.



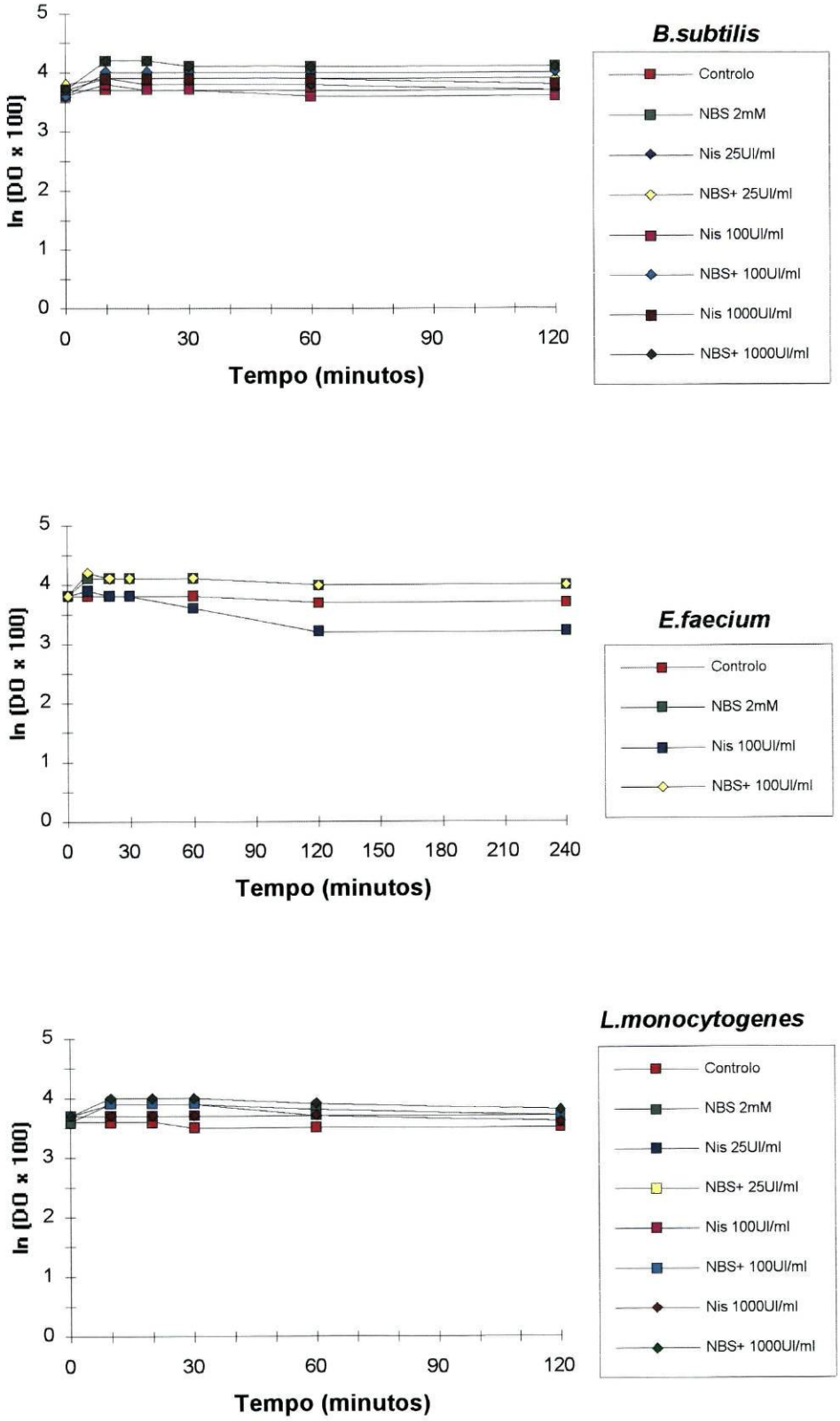


Figura 78 - Efeito da NBS (2 mM) na cinética de lise bacteriana. As células da fase exponencial de crescimento foram suspensas em tampão Tris-HCl (0,05M; PH 5,0).

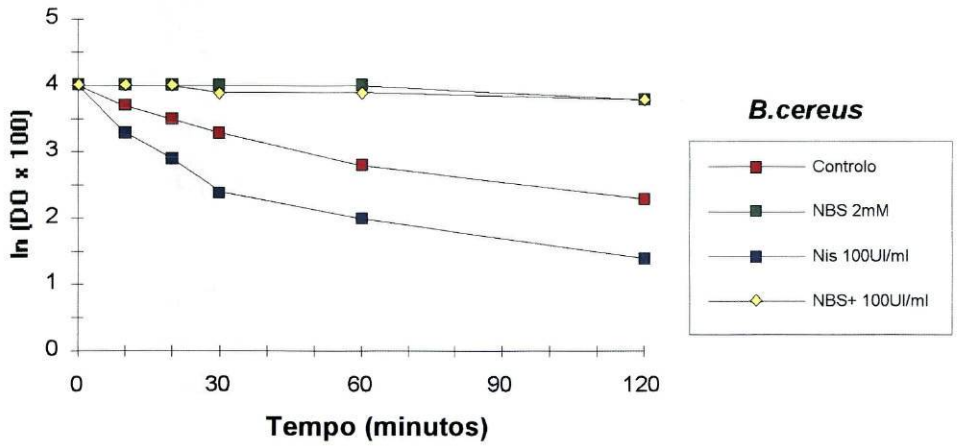
5.1.3 - Suspensões celulares em tampão de fosfatos

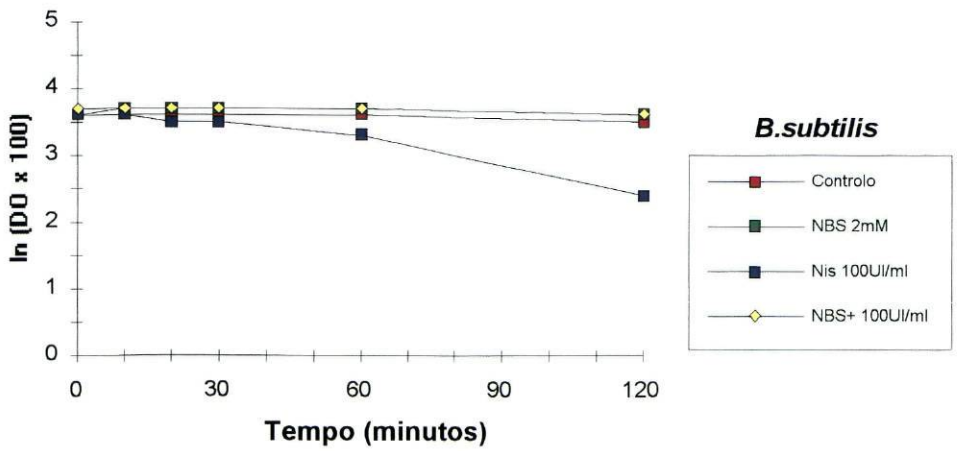
De um modo geral, poderemos dizer que os resultados foram muito idênticos trabalhando com suspensões em tampão Tris-HCl ou em tampão de fosfatos.

5.1.3.1 - Tampão de fosfato de sódio 0,05M; PH 8,0

Para *B. cereus* verificamos, mais uma vez, uma instabilidade da suspensão bacteriana a este valor de PH, a qual não foi verificada para as restantes estirpes.

A adição de NBS 2 mM resultou numa manutenção dos valores da Absorvância e inibiu a autólise provocada pela nisina, nestas condições. A concentração de nisina estudada foi apenas a de 100 UI/ml com excepção do *E. faecium* para o qual foram testadas todas as concentrações, pelo facto de a intensidade de resposta ter sido mais acentuada neste tampão que em Tris-HCl (Fig. 79).





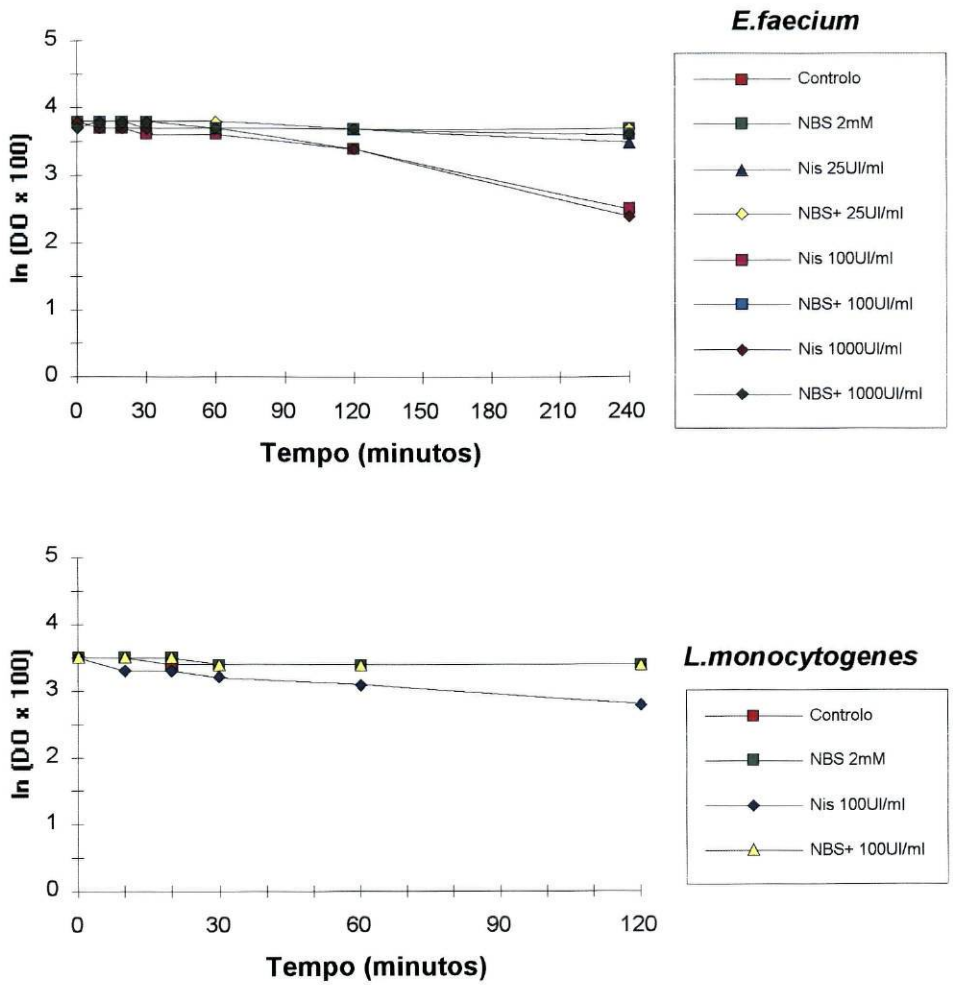
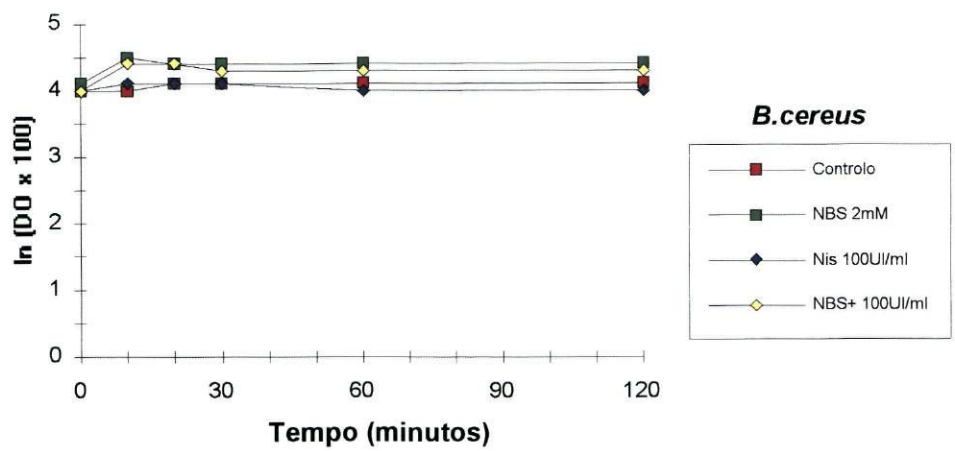


Figura 79 - Efeito da NBS (2 mM) na cinética de lise bacteriana. As células da fase exponencial de crescimento foram suspensas em tampão de fosfato de sódio (0,05M; PH 8,0).

5.1.3.2 - Tampão de fosfato de sódio 0,05M; PH 5,0

Tal como para Tris-HCl PH 5,0 e TSB PH 5,0, a adição da nisina não afectou significativamente a densidade óptica das culturas, resultando em efeitos menos notórios para a NBS (Fig. 80).



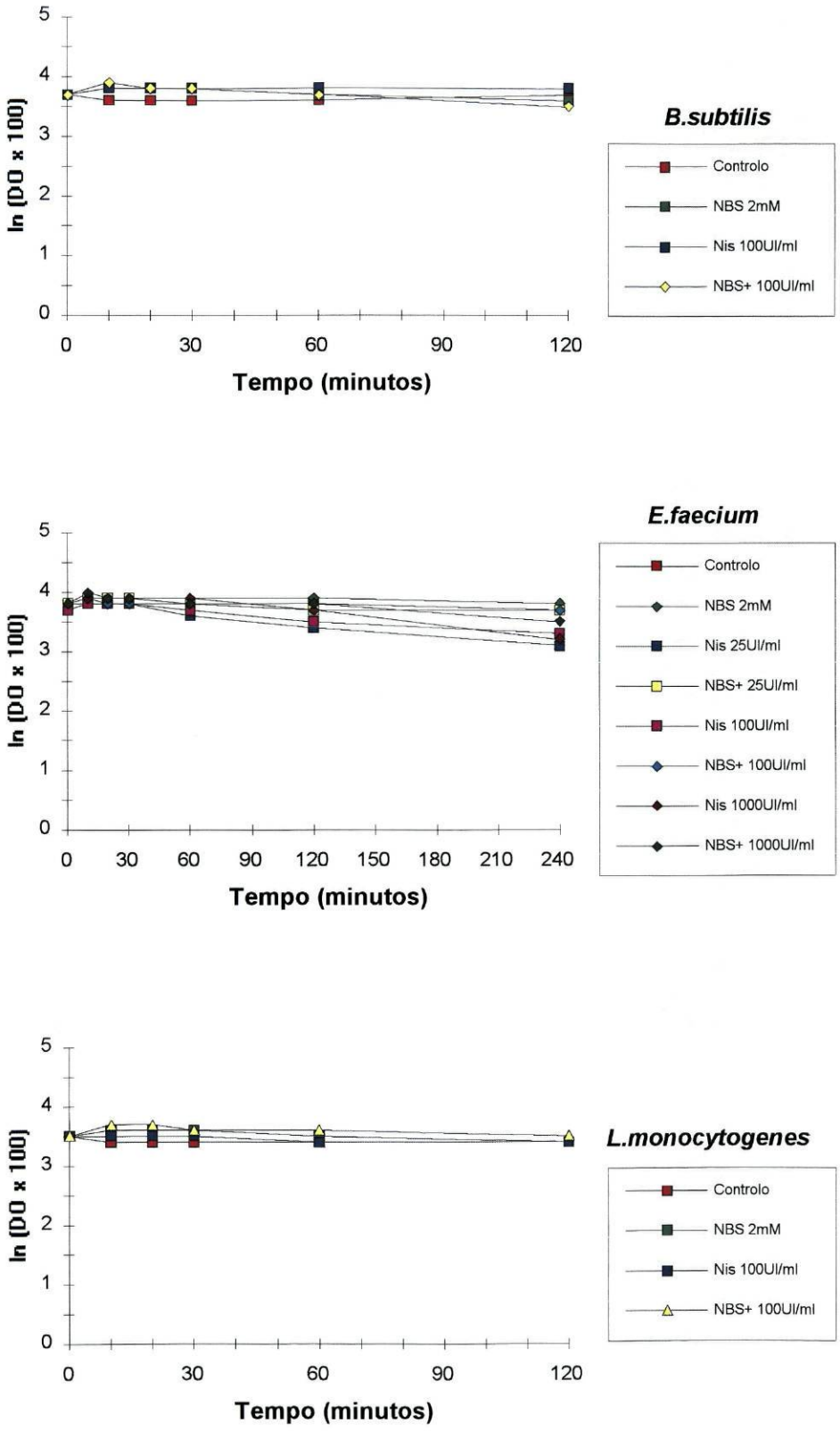


Figura 80 - Efeito da NBS (2 mM) na cinética de lise bacteriana. As células da fase exponencial de crescimento foram suspensas em tampão de fosfato de sódio (0,05M; PH 5,0).

De um modo muito geral, podemos dizer que os resultados foram: idênticos usando NBS 2 mM ou 5 mM; idênticos usando tampão Tris-HCl ou fosfato de sódio 0,05M (com ligeiras diferenças para *E. faecium*); diferentes para PH 5,0 e PH 8,0. A adição de NBS resultou numa subida da Absorvância a 550 nm a qual foi da ordem de 0,3-0,5 quando em tampão Tris-HCl PH 5,0 e de 0-0,1 para tampão PH 8,0. O efeito verificado em tampão de fosfatos PH 5,0 foi diferente conforme as espécies e foi da ordem de 0,5 para o *B. cereus* e de apenas 0,1 para as restantes estirpes.

O efeito de autólise, induzida pela nisina, foi visível nas suspensões a PH 8,0 e por isso nessas situações foi observado um efeito inibidor da autólise celular por tratamento prévio das suspensões, por 10 minutos, com NBS. O efeito da nisina sobre a densidade óptica das suspensões a PH 5,0 foi muito reduzido, com excepção para *E. faecium* em que não foram muito diferentes os resultados a PH 5,0 e 8,0, e, por isso, o efeito do tratamento com NBS 10 minutos antes da nisina não se fez sentir.

A estabilidade das suspensões bacterianas nos tampões a PH 5,0 foi verificada para todas as estirpes estudadas, enquanto em tampão a PH 8,0 o *B. cereus* se mostrou instável quanto à densidade óptica e durante todo o período de incubação estudado, correspondendo a uma autólise espontânea nesta situação.

Para confirmar que a ausência de efeito autolítico, quando a nisina foi adicionada 10 minutos após a NBS, não correspondeu a uma destruição da nisina pela NBS, as suspensões foram centrifugadas 10 minutos após a adição, as células lavadas, ressuspensas em novo tampão e tratadas com nisina. Os resultados obtidos indicaram uma resposta idêntica, pelo que pudemos concluir que a presença de NBS no tampão não impediria a acção da nisina, por inactivação.

Relativamente à viabilidade celular das diferentes suspensões bacterianas, tratadas e não tratadas, ao fim de 2 horas de incubação, verificamos, por isolamento em meio de gelose sangue, ausência de crescimento para as suspensões tratadas com NBS e NBS + Nis, relativamente ao controlo para o qual se observou um desenvolvimento abundante. As suspensões tratadas com nisina comportaram-se de forma diferente conforme o PH, a concentração de nisina e a espécie bacteriana.

5.2 - Estudo morfológico

Este estudo incidiu sobre os efeitos do tampão, da nisina, da NBS 2 mM e da nisina após tratamento de 10 minutos com NBS. As microfotografias apresentadas foram obtidas a partir de experiências realizadas sobre suspensões celulares de *B. cereus*, em tampão de Tris-HCl PH 8,0 e 5,0, uma concentração de nisina de 1000 UI/ml e de NBS 2 mM.

5.2.1 - Suspensões celulares em tampão Tris-HCl

5.2.1.1 - Tampão Tris-HCl 0,05M; PH 8,0

De acordo com o estudo espectrofotométrico, (Fig. 77), verificamos que as células de *B. cereus* mostraram sinais de lise quando suspensas nestas condições. Imediatamente após suspensão das células no tampão pudemos observar alguns bacilos apresentando uma reacção negativa ao Gram e numerosos restos resultantes da autólise, para além de bacilos Gram positivo normais (Fig. 81a). Uma incubação de 10 minutos no tampão intensificou a rede de restos celulares, por desaparecimento dos bacilos com reacção negativa ao Gram (Fig. 81b). A NBS foi testada nas mesmas condições e foi registado que 10 minutos após a sua adição os sinais de lise celular foram reduzidos, se bem que cerca de 50% dos bacilos apresentassem reacção Gram negativa (Fig. 81c). O efeito da nisina foi estudado isoladamente, quando adicionada nas condições descritas, e verificamos que ao fim de 10 minutos de incubação, na presença de 1000 UI/ml da bacteriocina, raras células apresentaram uma morfologia normal com reacção positiva ou negativa à coloração de Gram, no seio de redes de restos celulares (Fig. 81d).

As amostras colhidas após 30 minutos de incubação revelaram um aumento no grau de lise das células suspensas em tampão (controlo) sendo raros os bacilos Gram positivo (Fig. 82a) e uma manutenção do aspecto nas suspensões tratadas com NBS (Fig. 82b). Na suspensão tratada com nisina as células intactas estavam praticamente ausentes, sendo a lise de aproximadamente 100% (Fig. 82c). O efeito da adição de 1000 UI/ml de nisina, à suspensão tratada por 10 minutos com NBS, revelou-se completamente diferente do anterior e próximo do encontrado para as suspensões tratadas apenas com NBS (Fig. 82d). Este resultado confirmou o do estudo

espectrofotométrico, no qual foi verificada uma estabilização dos valores da Absorvância a 550 nm (Fig. 77-*B. cereus*) e daí, a conclusão de que a NBS protege as células da lise celular que ocorre por adição directa de nisina. Nas amostras tratadas com NBS foi observada a presença de bacilos apresentando um alongamento significativo (Fig. 82b,d).

Observadas as amostras colhidas 60 minutos após suspensão e tratamentos, verificamos que os resultados não foram muito diferentes dos descritos para o tempo de 30 minutos, apresentando apenas um maior número de células em lise para o controlo, e sinais de alguma lise para a suspensão tratada com nisina após NBS (Fig. 83).

Observações efectuadas no final de 2 horas revelaram aspectos idênticos.

O mesmo estudo efectuado sobre *B. subtilis*, *E. faecium* e *L. monocytogenes* mostrou como principal diferença o aspecto das suspensões controlo, uma vez que não foram observados sinais de lise significativos mas, apenas bactérias Gram positivo, com algumas apresentando reacção negativa mas de morfologia normal. As suspensões tratadas com nisina mostraram sinais de lise inferiores e mais tardiamente atingidos. O tratamento com NBS e nisina após NBS não revelou diferenças em relação ao *B. cereus*.

❖

As experiências com *E. faecium* foram igualmente efectuadas em tampão de fosfato de sódio 0,05M mas não foram observadas diferenças significativas, em relação às anteriormente apresentadas.

Estudos morfológicos sobre culturas em TSB PH 7,3, descritos relativamente ao aspecto turbidimétrico, não mostraram notáveis diferenças, com excepção para o controlo onde não se observaram alterações, como nas suspensões em tampão, uma vez que as células mantiveram a capacidade de continuar o seu normal desenvolvimento.

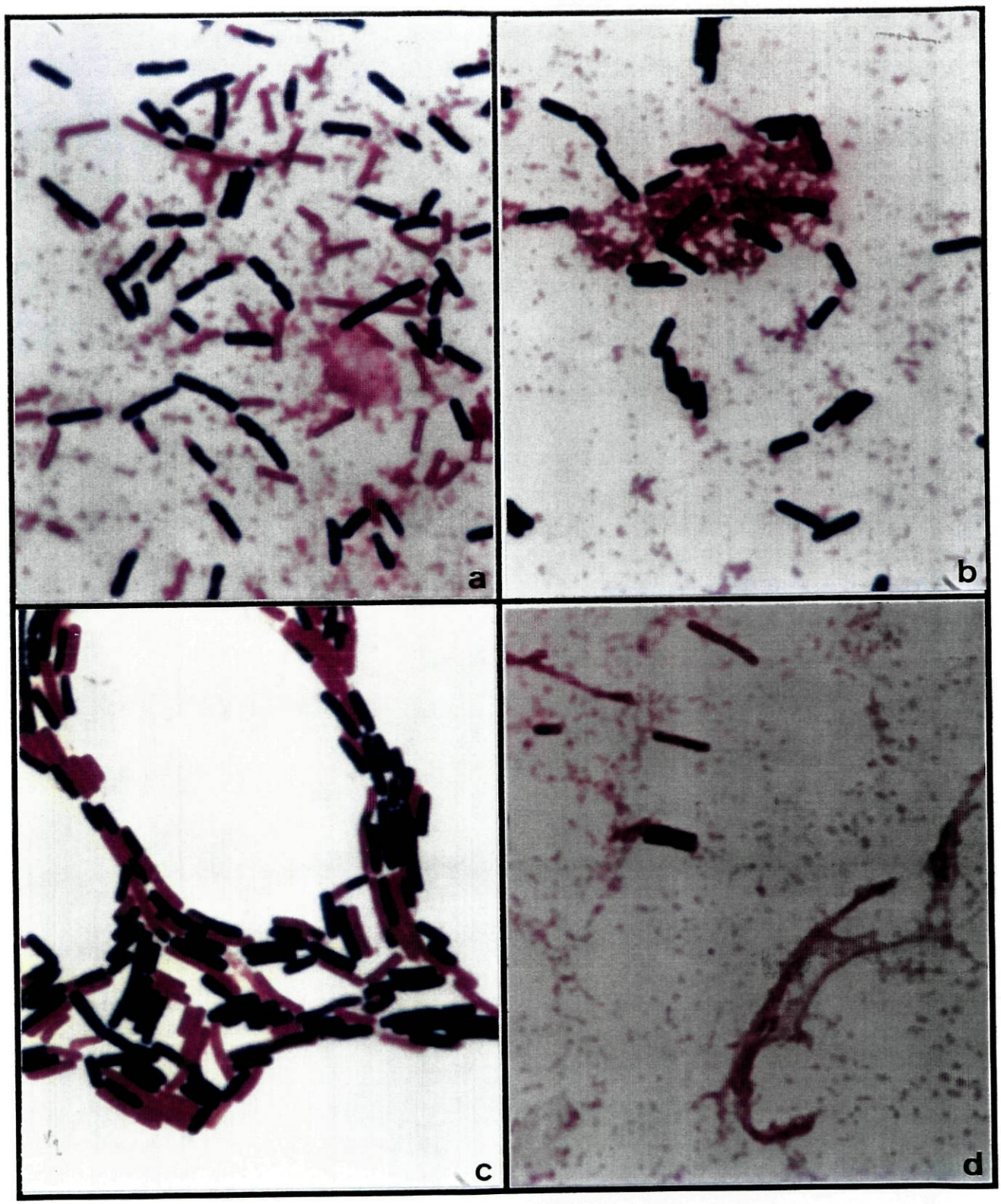


Figura 81 - Microfotografias ópticas de células de *B. cereus,* a partir de culturas exponenciais (TSB PH 7,3), suspensas em tampão Tris-HCl PH 8,0. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo, imediatamente após suspensão; • **b** - controlo, 10 minutos após suspensão; • **c** - NBS (2 mM), 10 minutos após adição; • **d** - 1000 UI/ml de nisina, 10 minutos após adição.

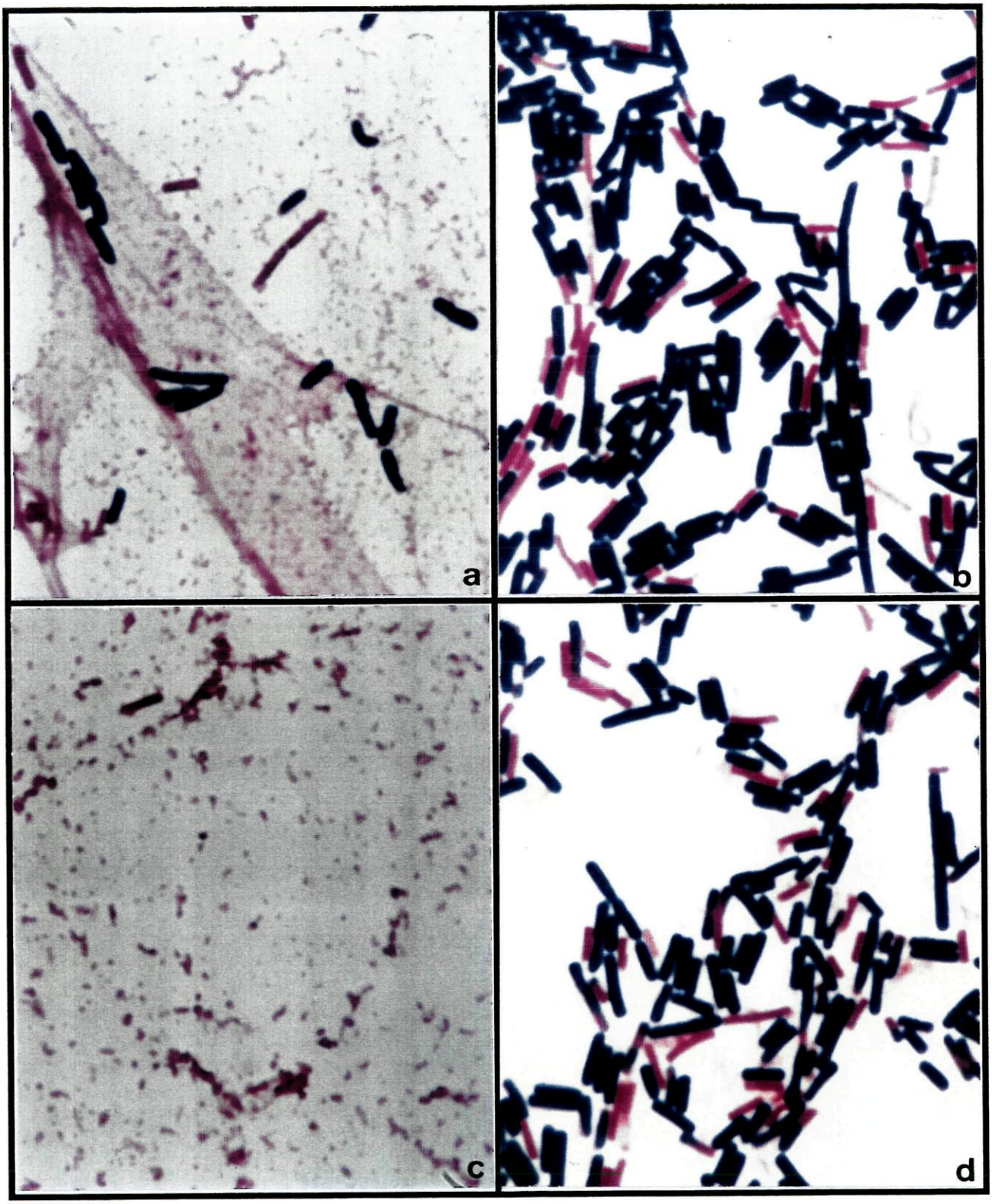


Figura 82 - Microfotografias ópticas de células de *B. cereus,* a partir de culturas exponenciais (TSB PH 7,3), suspensas em tampão Tris-HCl PH 8,0. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo, 30 minutos após suspensão; • **b** - NBS (2 mM), 30 minutos após adição; • **c** - 1000 UI/ml de nisina, 30 minutos após adição; • **d** - NBS (2 mM) 10 minutos + 1000 UI/ml de nisina, 20 minutos após adição.

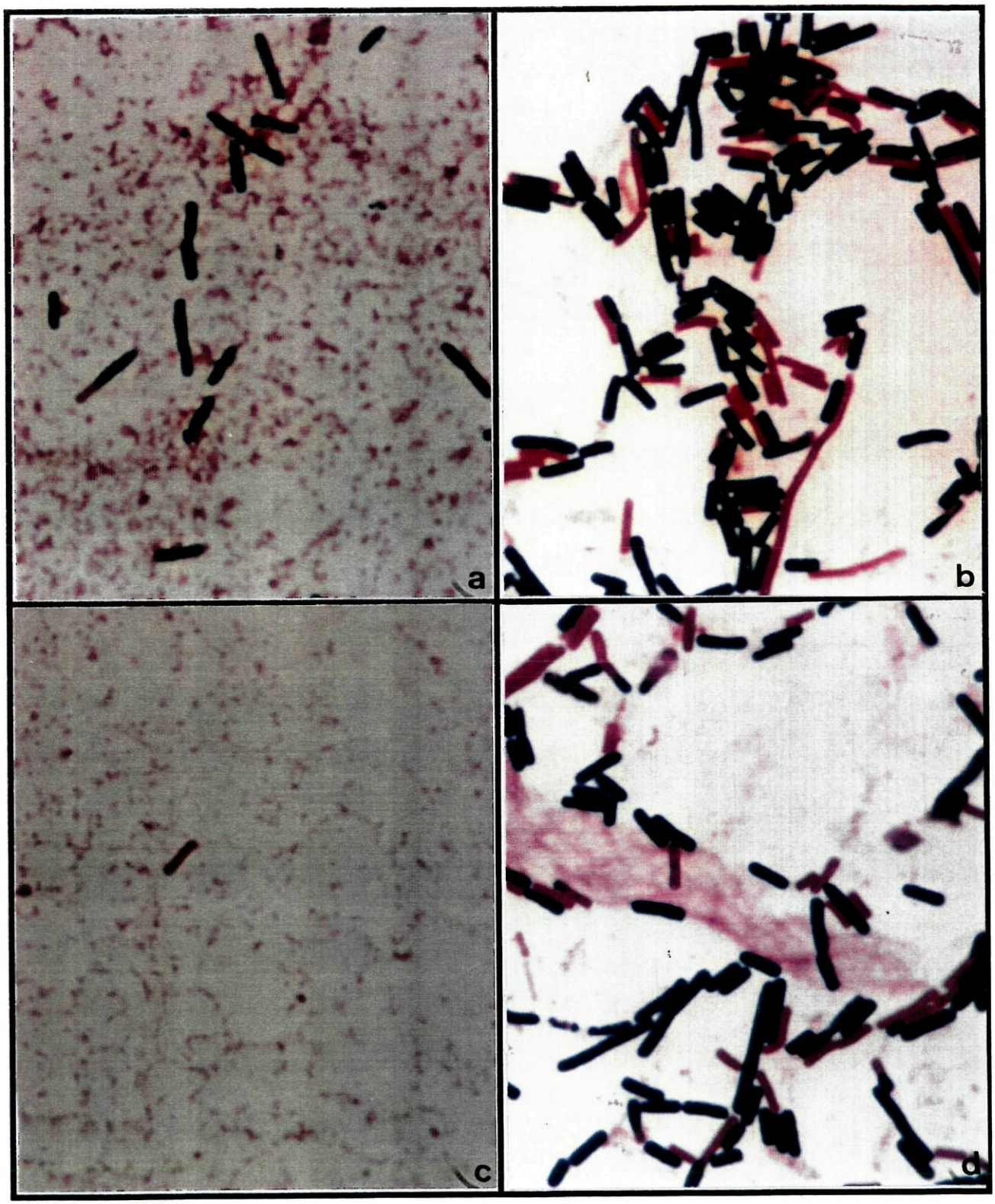


Figura 83 - Microfotografias ópticas de células de *B. cereus,* a partir de culturas exponenciais (TSB PH 7,3), suspensas em tampão Tris-HCl PH 8,0. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo, 60 minutos após suspensão; • **b** - NBS (2 mM), 60 minutos após adição; • **c** - 1000 UI/ml de nisina, 60 minutos após adição; • **d** - NBS (2 mM) 10 minutos + 1000 UI/ml de nisina, 50 minutos após adição.

5.2.1.2 - Tampão Tris-HCl 0,05M; PH 5,0

Os resultados foram diferentes dos anteriormente descritos, particularmente no que respeita à lise celular das suspensões controlo e das suspensões tratadas com nisina.

Como esperavamos, a partir do estudo espectrofotométrico (Fig. 78-*B. cereus*), as células foram mais estáveis a este valor de PH e foram observados numerosos bacilos Gram positivo e muitos de morfologia normal mas com reacção negativa, quer imediatamente após suspensão, quer após 10 minutos de incubação (Fig. 84a,b). Com o tempo, observamos um aumento do número de células apresentando uma coloração vermelha, algumas delas ligeiramente deformadas e alguns restos resultantes da desintegração (Figs. 85a e 86a).

O tratamento das suspensões celulares com NBS (Figs. 84c,85b e 86b) e com NBS seguida de nisina após 10 minutos (Figs. 85d e 86d) resultou em imagens de microscopia óptica muito idênticas às obtidas para PH 8,0. Uma comparação efectuada entre as duas imagens deixou supôr um maior volume das células intactas, quando a PH 5,0 e podemos recordar que a adição de NBS a este valor de PH provocou um acréscimo nos valores da Absorvância, sugerindo uma tumefação das células. Nas amostras tratadas com NBS foi observada a presença de bacilos apresentando um alongamento significativo (Figs. 84c,85b,85d,86b).

A adição de nisina isolada levou a uma alteração do aspecto em relação ao controlo, uma vez que a quase totalidade dos bacilos surgiu corada de vermelho e mais finos que os raros bacilos Gram positivo presentes, ao fim de 10 minutos de tratamento (Fig. 84d). Ao fim de 30 minutos (Fig. 85c) e de 60 minutos (fig. 86c) o aspecto não variou muito, sendo contudo de salientar o aumento de material extracelular resultante de alguma lise bacteriana e a diminuição no número de bacilos Gram positivo. Por comparação, pudemos concluir que a lise que ocorreu a este valor de PH foi inferior à verificada a PH 8,0, o que aliás seria de esperar tendo em conta os resultados turbidimétricos (Fig. 17b) e morfológicos (Figs. 18d, 19d), obtidos para TSB PH 5,0.

Repetidos estes ensaios para as restantes espécies estudadas, verificamos um paralelismo na resposta da NBS, da nisina e da nisina 10 minutos após NBS. O controlo apresentou diferenças de comportamento, já que a maioria das células de *B. subtilis*, *E. faecium* e *L. monocytogenes* mantiveram a sua positividade ao Gram durante as 2 horas de incubação, ao contrário do *B. cereus*.

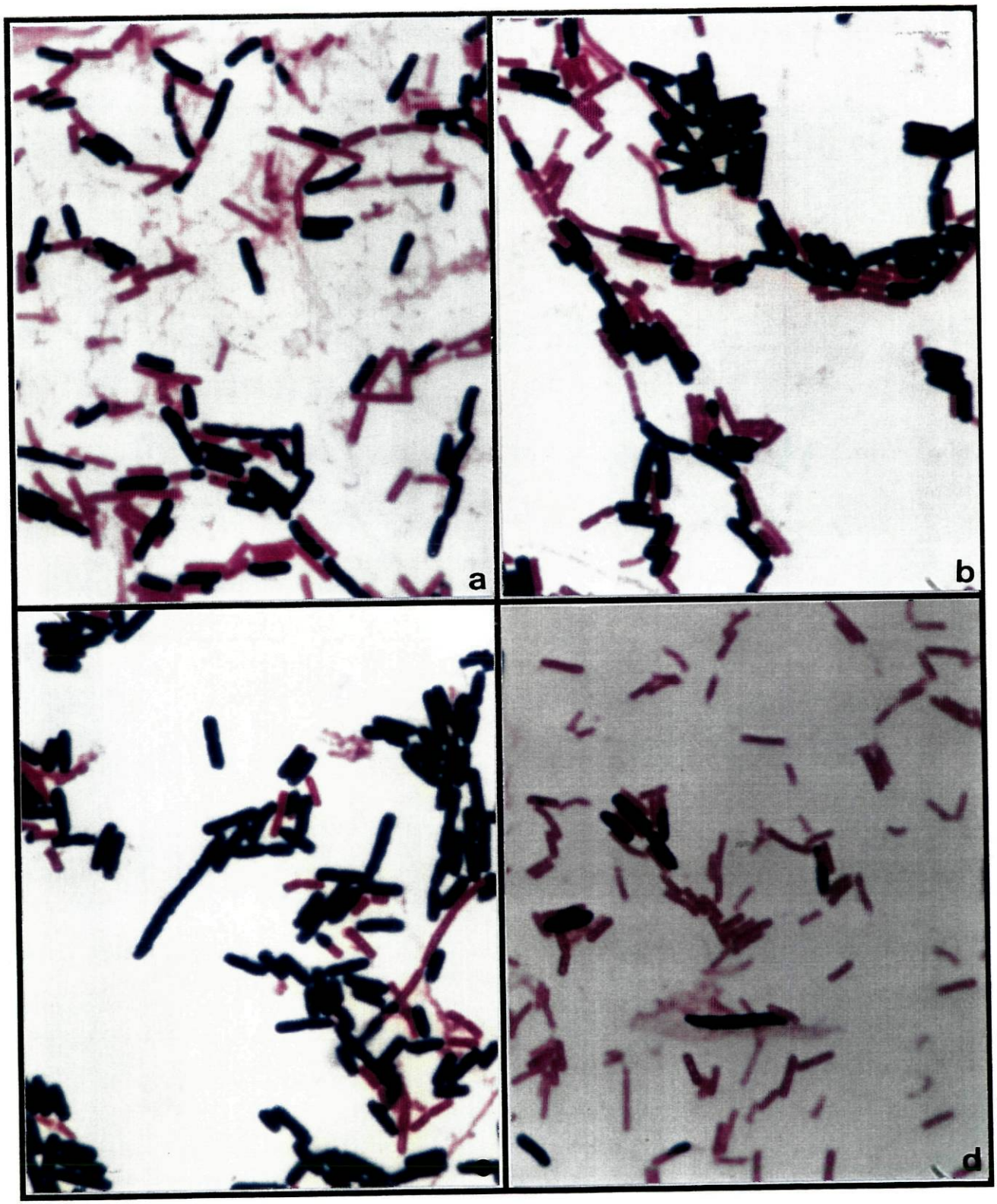


Figura 84 - Microfotografias ópticas de células de *B. cereus,* a partir de culturas exponenciais (TSB PH 7,3), suspensas em tampão Tris-HCl PH 5,0. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo, imediatamente após suspensão; • **b** - controlo, 10 minutos após suspensão; • **c** - NBS (2 mM), 10 minutos após adição; • **d** - 1000 UI/ml de nisina, 10 minutos após adição.

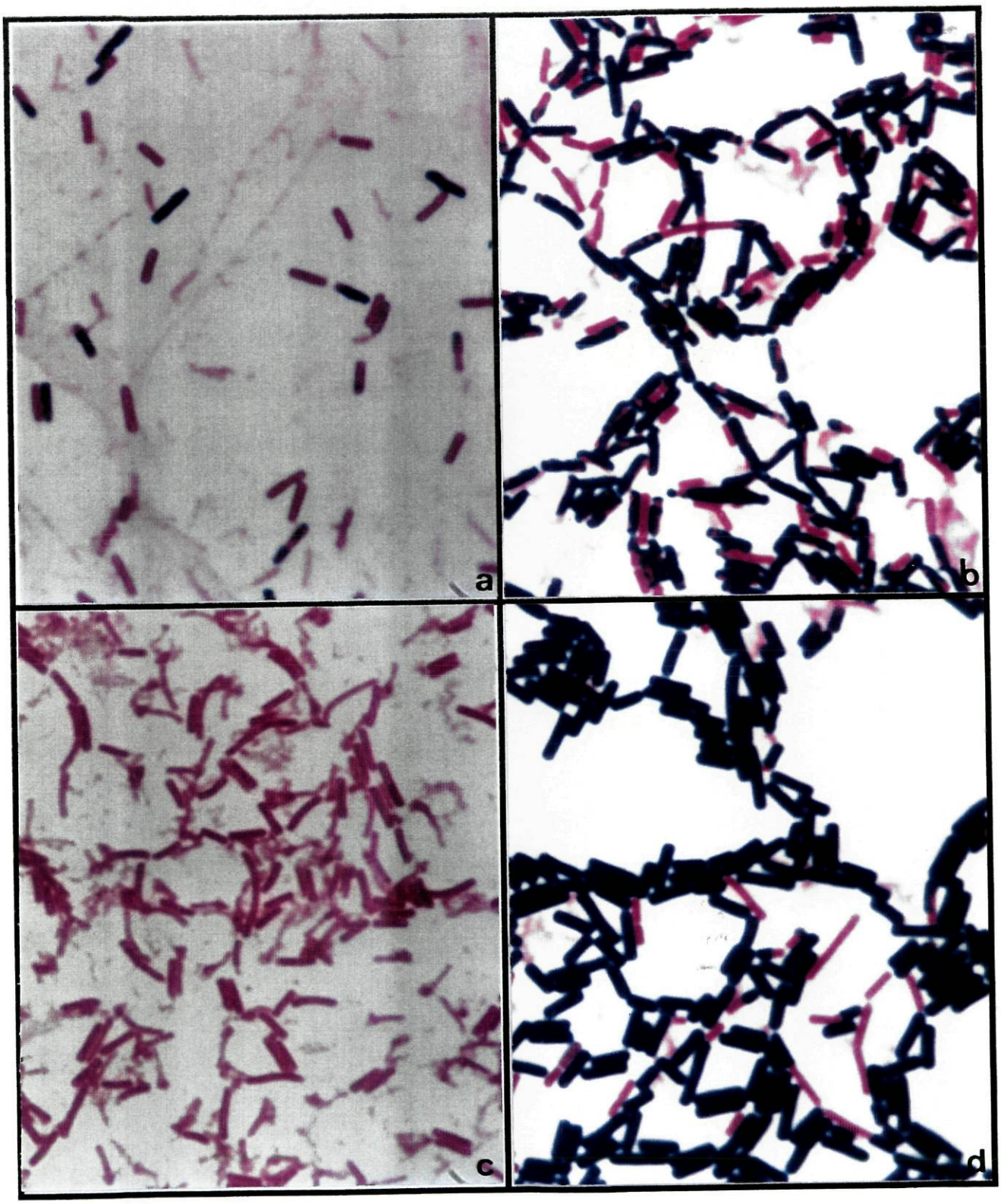


Figura 85 - Microfotografias ópticas de células de *B. cereus,* a partir de culturas exponenciais (TSB PH 7,3), suspensas em tampão Tris-HCl PH 5,0. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo, 30 minutos após suspensão; • **b** - NBS (2 mM), 30 minutos após adição; • **c** - 1000 UI/ml de nisina, 30 minutos após adição; • **d** - NBS (2 mM) 10 minutos + 1000 UI/ml de nisina, 20 minutos após adição.

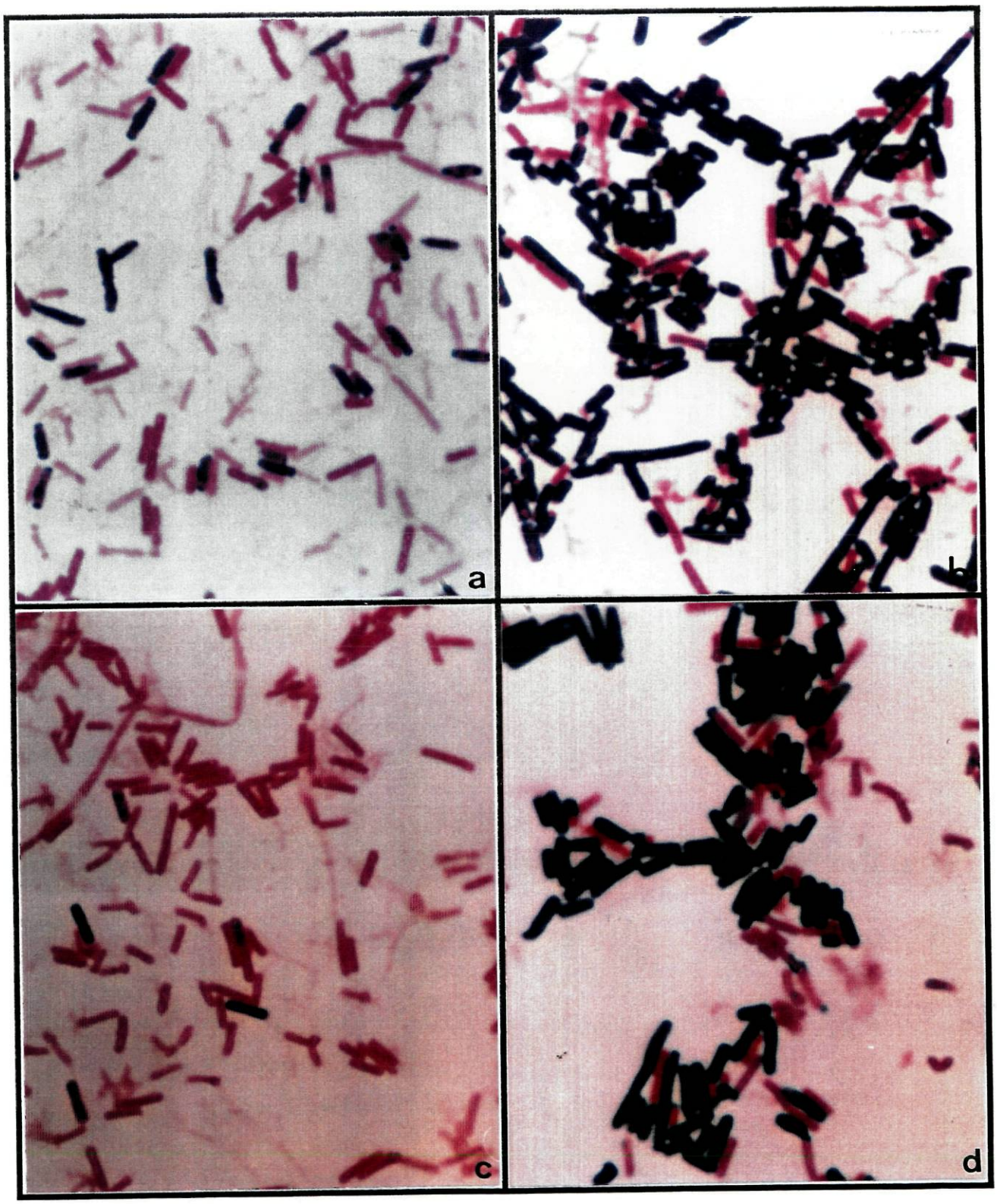


Figura 86 - Microfotografias ópticas de células de *B .cereus,* a partir de culturas exponenciais (TSB PH 7,3), suspensas em tampão Tris-HCl PH 5,0. Coloração de Gram. Ampliação de 2 000 x.

• **a** - Controlo, 60 minutos após suspensão; • **b** - NBS (2 mM), 60 minutos após adição; • **c** - 1000 UI/ml de nisina, 60 minutos após adição; • **d** - NBS (2 mM) 10 minutos + 1000 UI/ml de nisina, 50 minutos após adição.

O estudo dos efeitos resultantes do tratamento com diferentes concentrações de nisina incidiu sobre os seguintes parâmetros: morte celular e inibição do crescimento, alterações morfológicas e, em algumas situações, alterações de permeabilidade da membrana citoplasmática e inibição da actividade respiratória.

Os microrganismos Gram negativo estudados foram *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* rugosa ATCC R4157.

Foram avaliados os parâmetros descritos para as estirpes referidas em culturas exponenciais, obtidas em meio de TSB PH inicial de 7,3.

B - *E. coli*

1 - Efeito da nisina em culturas exponenciais de *E. coli*

1.1 - Inibição do crescimento bacteriano e avaliação do PH das culturas

As culturas exponenciais em meio de TSB PH inicial de (7,3), obtidas como descrito para as espécies bacterianas de Gram positivo, foram tratadas com solução de nisina nas concentrações finais de 25, 600 e 1000 UI/ml. Pudemos observar, através do gráfico representado na figura 87, que a adição de nisina não afectou a densidade óptica das culturas tratadas, relativamente ao controlo. As células continuaram o seu normal desenvolvimento tendo-se verificado que, após 24 horas de incubação, as diferentes linhas se encontravam sobreponíveis.

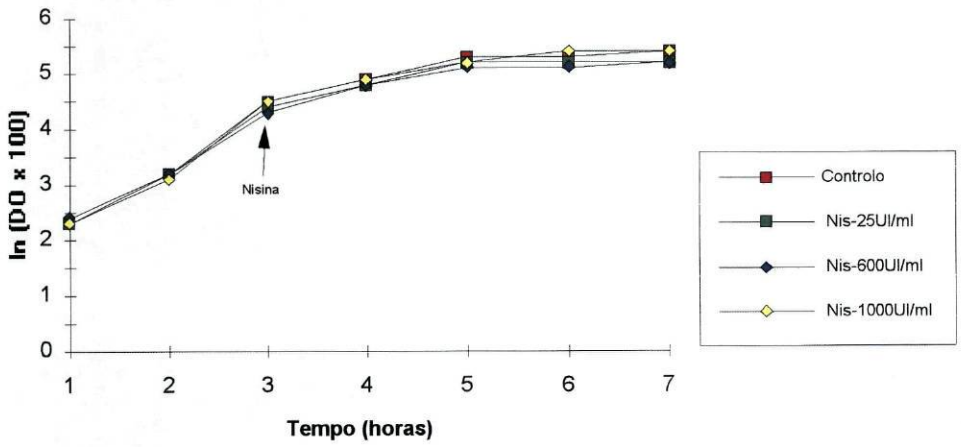


Figura 87 - Curvas de crescimento de *E. coli* (ATCC 25922), na ausência (controlo) ou na presença de nisina nas concentrações indicadas, adicionada às culturas na fase exponencial de crescimento (PH 7,3).
• - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

Durante o período de incubação de 4 horas, usado para as experiências, foi avaliado o efeito do crescimento, da nisina e do EDTA no PH das culturas. Verificamos que o PH se manteve muito próximo de 7 durante toda a incubação, e que os resultados se mostraram muito idênticos para todas as estirpes estudadas bem como para as culturas controlo e tratadas com nisina. As culturas tratadas com EDTA sofreram um decréscimo de 0,5 a 0,6 no valor de PH, relativamente ao controlo.

Verificado que a nisina, na concentração de 1000 UI/ml, não provocou alteração nas curvas de crescimento da bactéria, avaliadas por espectrofotometria, fomos verificar o seu efeito sobre células previamente tratadas com EDTA.

1.2 - Alterações fisiológicas induzidas pela nisina

Uma vez observado que a nisina não afectou significativamente a densidade óptica, nem a viabilidade celular, quando adicionada a culturas exponenciais desta estirpe Gram negativo, efectuamos alguns ensaios, se bem que limitados, de forma a mostrar a ocorrência ou não de alterações de ordem fisiológica. As técnicas usadas foram de determinação do efluxo de potássio e de inibição da actividade respiratória, ambas relacionadas com a funcionalidade da membrana citoplasmática, e já descritas.

1.2.1 - Efluxo de potássio

O método potenciométrico, usado para estudar as movimentações do potássio, após adição de nisina, mostrou-nos que uma concentração de 25 UI/ml ou de 1000 UI/ml originou um salto reduzido no potencial (Fig. 88). Tendo em conta que a solução de nisina contém potássio e, após doseamento do seu teor por fotometria de chama, pudemos concluir que estas alterações de potencial observadas corresponderam unicamente à adição de potássio contido na solução do lantibiótico. De salientar o facto de o potencial base de partida na suspensão bacteriana ser elevado. A estirpe rugosa apresentou resultados sobreponíveis aos da estirpe selvagem.

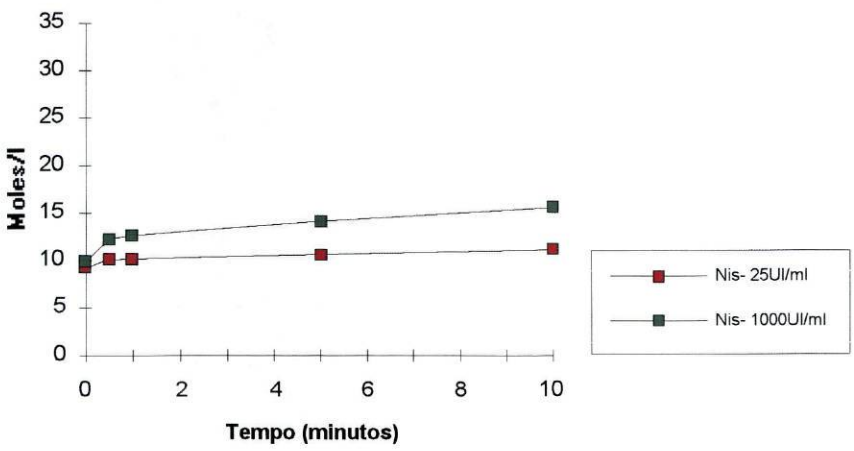


Figura 88 - Efluxo de K^+ observado por adição de nisina a suspensões bacterianas em água de peptona 0,1%, preparadas a partir de culturas exponenciais de *E. coli* ATCC 25922, no meio descrito para o efeito e com uma concentração celular de 3-5 x 10^8 cel/ml. As determinações foram efectuadas por potenciometria directa usando um eléctrodo selectivo de K^+, mergulhado directamente nas suspensões celulares.
A concentração de ião K^+ foi expressa em [Moles/l x 10^{-5}].

1.2.2 - Actividade respiratória

Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3 foram usadas para estudar o efeito da nisina sobre a actividade respiratória em células de *E. coli*.

A inibição da actividade respiratória não teve grande extensão, para as condições estudadas. As estirpes que se mostraram mais sensíveis à acção da nisina foram *E. coli* ATCC 25922 e a estirpe mucóide isolada a partir de *E. coli* ATCC 4157, mas sempre inferior a 50 % (Fig. 89).

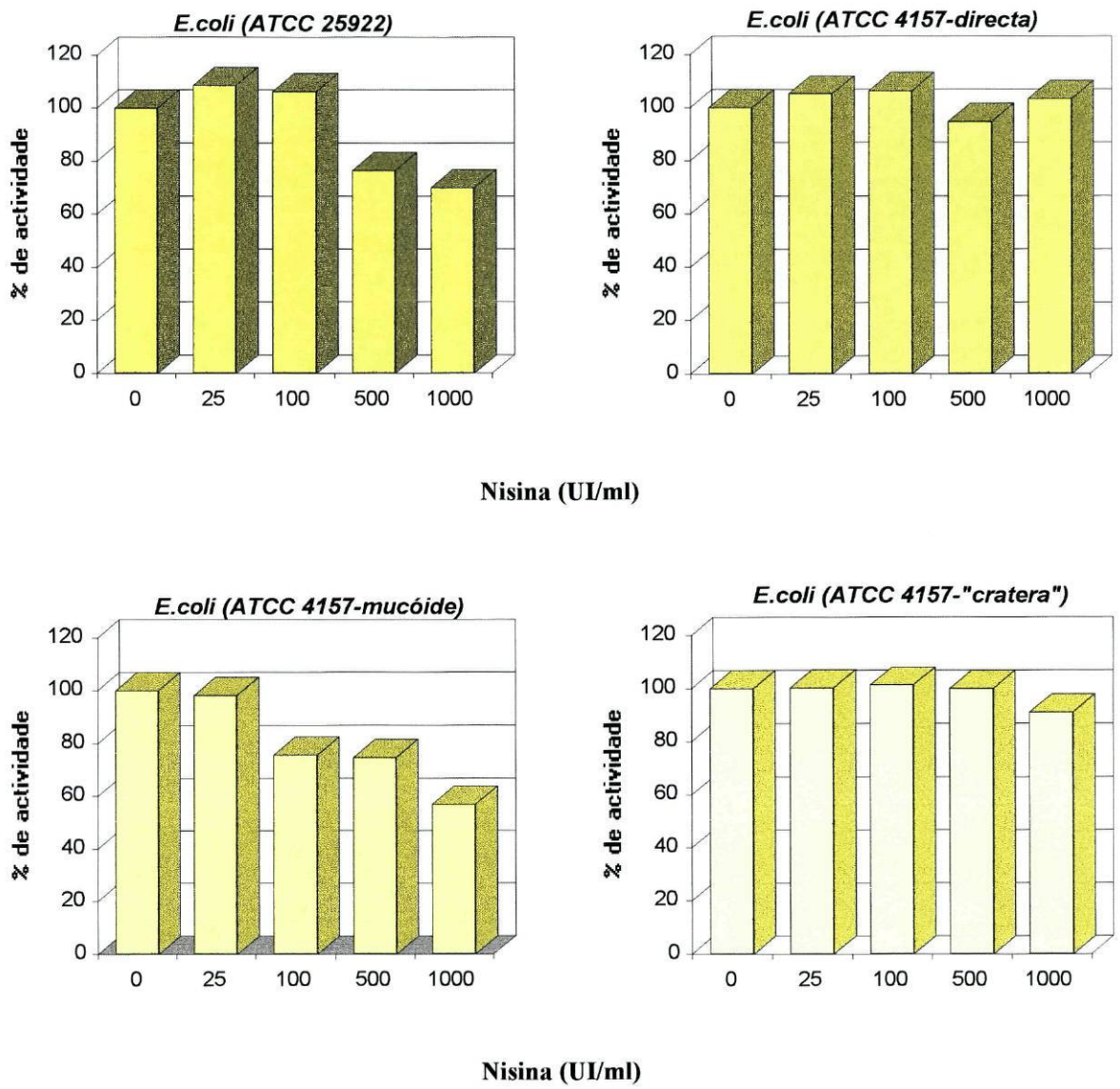


Figura 89 - Actividade respiratória em células bacterianas obtidas de culturas exponenciais em meio de TSB PH (7,3). Inibição da actividade redutora do ião trifenil tetrazólio em função da concentração de nisina adicionada às suspensões celulares das diferentes estirpes. Consideramos como 100% de actividade o valor de Absorvância a 485 nm resultante da redução do trifenil tetrazólio, obtida nas suspensões bacterianas não tratadas.

2 - Efeito da nisina em culturas exponenciais de *E. coli*, tratadas com EDTA

Foi usado um tratamento com este agente quelante de modo a verificar o efeito de lise induzida pela nisina sobre espécies bacterianas de Gram negativo apresentando a sua membrana exterior modificada, por remoção dos catiões divalentes nela presentes (Bayer e Leive, 1977).

Culturas exponenciais em meio de TSB PH 7,3 foram tratadas com EDTA nas concentrações finais de 2,5; 5 e 10 mM. Verificamos que o efeito sobre as curvas de crescimento foi muito reduzido, provocando apenas um ligeiro atraso relativamente ao controlo, e idêntico para as 3 concentrações de EDTA ensaiadas (Fig. 90).

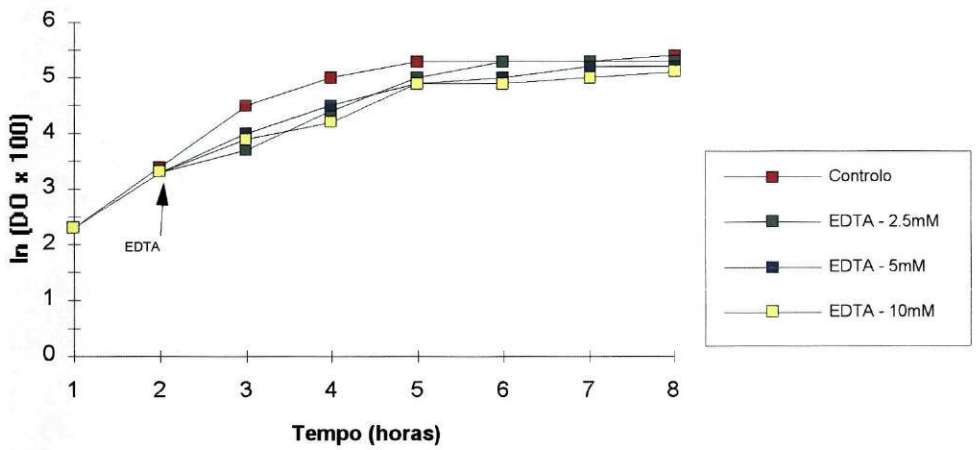


Figura 90 - Curvas de crescimento de *E. coli* (ATCC 25922), na ausência (controlo) ou na presença de EDTA nas concentrações indicadas, adicionado às culturas na fase exponencial de crescimento (PH 7,3).

• - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

Registado o efeito do EDTA sobre as culturas bacterianas fomos avaliar a influência da sua adição na posterior acção da nisina. A nisina foi adicionada às culturas tratadas com EDTA ao fim de 5 minutos e de 60 minutos de incubação. Os resultados não foram significativamente diferentes para as concentrações de nisina e de EDTA ensaiadas. Pela análise dos gráficos pudemos concluir que a adição prévia de EDTA, nas concentrações ensaiadas, 5 ou 60 minutos antes das diferentes concentrações de nisina, levou a uma estabilização dos valores da densidade

óptica para as concentrações de 600 e 1000 UI/ml. Uma intensidade de resposta ligeiramente superior, com ligeira descida dos valores da Absorvância a 550 nm, pôde ser observada quando o tratamento com EDTA antecedeu em 60 minutos o tratamento com nisina. Para a concentração de nisina de 25 UI/ml o acréscimo da densidade óptica apenas sofreu um ligeiro atraso, relativamente ao controlo, em qualquer das situações (Fig. 91a,b). O controlo das amostras tratadas com nisina e com EDTA, isoladamente, foi apresentado nas figuras 87 e 90, respectivamente.

Uma leitura efectuada após 24 horas de incubação das culturas anteriores revelou que os resultados se mantiveram sensivelmente iguais aos observados no final de 7 horas.

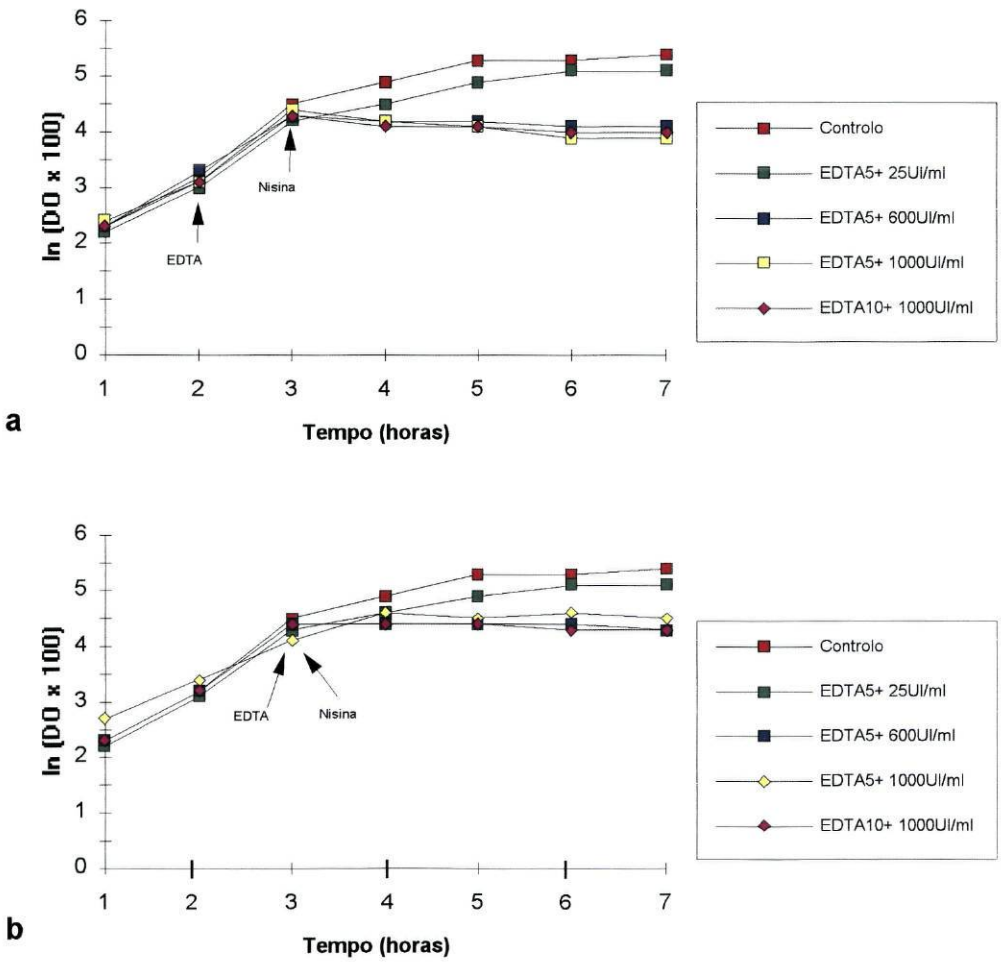


Figura 91 - Curvas de crescimento de *E. coli* (ATCC 25922), na ausência (controlo) ou na presença de EDTA, nas concentrações indicadas, adicionado às culturas na fase exponencial de crescimento (PH 7,3):

- **a** - 60 minutos antes das diferentes concentrações de nisina.
- **b** - 5 minutos antes das diferentes concentrações de nisina.
- - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

3 - Efeito da nisina em culturas exponenciais de uma estirpe rugosa de *E.coli*

Após análise dos resultados anteriormente apresentados efectuamos um estudo comparativo usando uma estirpe rugosa de *E. coli*. O objectivo deste estudo foi mostrar se as alterações que existentes na membrana exterior desta variante, influenciavam a resposta à nisina.

Uma vez que a nisina não mostrou muito efeito sobre *E. coli* ATCC 25922, escolhemos a concentração mais elevada de 1000 UI/ml e, pelo mesmo motivo, a concentração de 10 mM em EDTA, antecedendo em 10 minutos a adição de nisina.

O facto de a estirpe ATCC 4157 apresentar dois tipos distintos de colónias, levou-nos a efectuar um ensaio usando a estirpe directamente e as diferentes colónias separadamente (colónia mucóide e colónia em "cratera").

Os estudos realizados incidiram sobre as alterações turbidimétricas e de viabilidade celular, nas diferentes situações.

3.1 - Estudo espectrofotométrico

Os resultados obtidos neste estudo mostraram-nos que o tratamento de uma cultura exponencial, em meio de TSB PH (7,3), obtida a partir da estirpe rugosa ATCC 4157 ou a partir da estirpe ATCC 25922, levou a alterações semelhantes na densidade óptica quando adicionamos EDTA 10 mM ou 1000 UI/ml de nisina (Fig. 92a,b). Igual resultado não foi observado quando a nisina foi adicionada 10 minutos após o EDTA. Nesta situação, observamos um efeito de redução dos valores da Absorvância a 550 nm, se bem que progressiva, quando tratamos culturas da estirpe rugosa (Fig. 92b). Os gráficos c e d da figura 92 mostraram-nos que o comportamento das culturas obtidas a partir dos dois tipos de colónias, descritos para a estirpe rugosa, não foi muito diferente.

Os resultados registados parecem assim indicar que o efeito da nisina sobre a densidade óptica foi mais acentuado, ocorrendo alguma lise celular, nas culturas da estirpe rugosa, apenas nas tratadas 10 minutos com EDTA 10 mM. Nas culturas de *E. coli* ATCC 25922 verificamos um ligeiro acréscimo nos valores e uma manutenção praticamente constante da densidade óptica até

aos 180 minutos. A nisina, na concentração ensaida e usada isoladamente, não mostrou qualquer efeito significativo sobre esta variante rugosa.

A microscopia óptica das amostras retiradas no final de 120 minutos de incubação revelou que os sinais de lise estiveram presentes unicamente nas culturas tratadas com EDTA e nisina. O EDTA e a nisina isolados não provocaram lise, sendo no entanto visível uma alteração na morfologia das células, com um ligeiro aumento do seu volume.

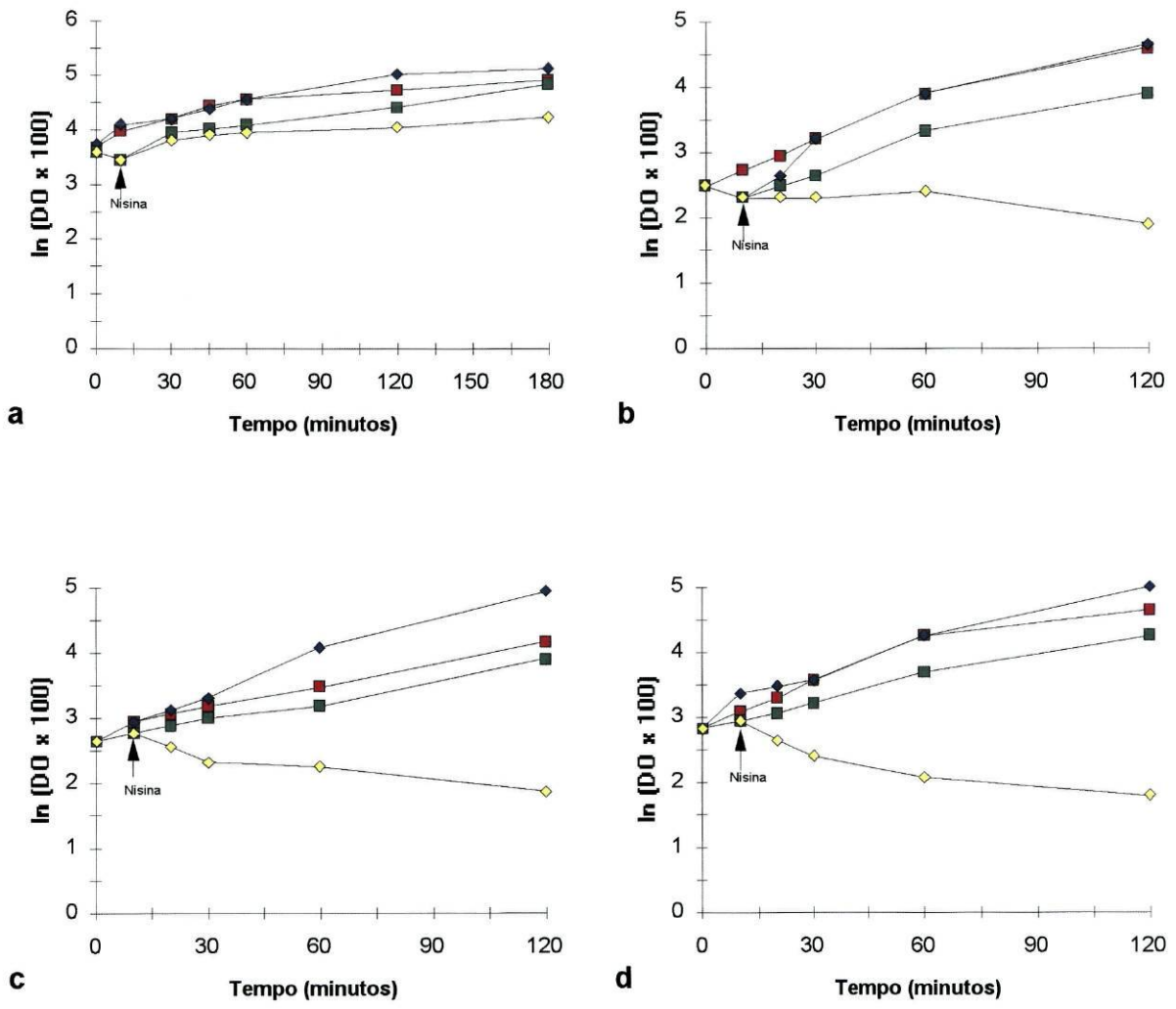


Figura 92 - Culturas de *E. coli*, na fase exponencial de crescimento (TSB PH 7,3), submetidas a diferentes tratamentos: ■ controlo, ■ EDTA 10 mM no tempo zero, ◆ 1000 UI/ml de nisina no tempo zero, ◆ EDTA 10 mM no tempo zero + 1000 UI/ml de nisina no tempo de 10 minutos.

- **a** - Estirpe ATCC 25922.
- **b** - Estirpe rugosa ATCC 4157.
- **c** - Colónias mucóides da estirpe ATCC 4157.
- **d** - Colónias em "cratera" da estirpe ATCC 4157.
- - Efeito avaliado sobre a densidade óptica das culturas, por determinação da Abs a 550 nm.

3.2 - Estudo de viabilidade

Os resultados obtidos, através da contagem do número de células viáveis, revelaram-se concordantes com os anteriormente descritos. Assim, como pudemos verificar através da figura 93, o número de células viáveis decresceu progressivamente para as culturas da variante rugosa tratadas com 1000 UI/ml de nisina, 10 minutos após adição de EDTA 10 mM (Fig. 93b). Tal como descrevemos para o estudo turbidimétrico, não se verificaram diferenças significativas para os dois tipos de colónias (Fig. 93c,d). Relativamente à estirpe ATCC 25922 observamos uma estabilização do número de células viáveis, durante 120 minutos após tratamento (Fig. 93a) mas, também a adição de nisina isolada provocou um atraso no crescimento, de cerca de 60 minutos.

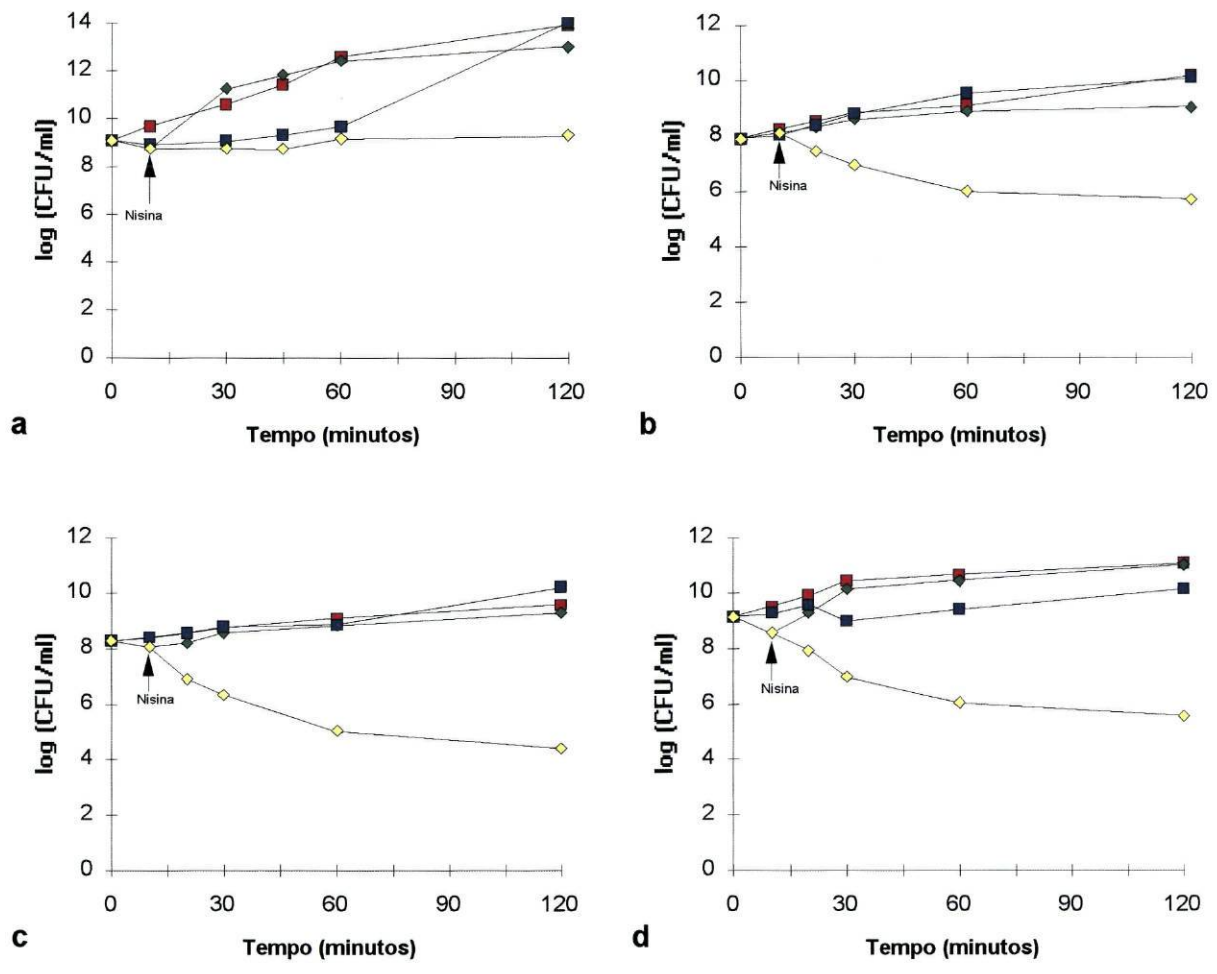


Figura 93 - Culturas de *E. coli*, na fase exponencial de crescimento (TSB PH 7,3), submetidas a diferentes tratamentos: ■ controlo, ◆ EDTA 10 mM no tempo zero, ■ 1000 UI/ml de nisina no tempo zero, ● EDTA 10 mM no tempo zero + 1000 UI/ml de nisina no tempo de 10 minutos.

- **a** - Estirpe ATCC 25922.
- **b** - Estirpe rugosa ATCC 4157.
- **c** - Colónias mucóides da estirpe ATCC 4157.
- **d** - Colónias em "cratera" da estirpe ATCC 4157. / ● - Efeito avaliado sobre a viabilidade celular.

DISCUSSÃO

O facto de a nisina ser largamente utilizada como bioconservante alimentar não equivale a um largo conhecimento sobre o seu mecanismo de acção. Até recentemente, muito pouco era conhecido sobre o mecanismo pelo qual matava as células susceptíveis, sendo por vezes controverso e não inteiramente elucidado (Jack e col., 1995; Okereke e Montville, 1992; Sahl, 1991). Torna-se necessário alargar os conhecimentos sobre as propriedades físicas e químicas, o modo de acção e a relação estrutura/função das bacteriocinas, de modo a tirar partido das suas potencialidades de aplicação na conservação alimentar, quer isoladamente quer em associação com outros métodos físicos ou químicos (Abee e col., 1995). Tendo em conta o interesse deste conhecimento para melhorar a sua utilização, bem como a de compostos similares, propusemo-nos estudar alguns parâmetros celulares influenciados pela adição de nisina, a células de diferentes espécies bacterianas (*B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecium*, *L. monocytogenes* e *E. coli*).

❖

A adsorção física a receptores, específicos ou não específicos localizados no invólucro das células expostas, constitui o primeiro passo na acção de grande parte das bacteriocinas, produzidas por bactérias Gram positivo ou Gram negativo (Tagg e col., 1976).

Em contraste com as colicinas, muitas das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivo, particularmente as produzidas por BAL, parecem exibir muito baixa ou nenhuma adsorção específica a bactérias Gram positivo sensíveis (Sahl e col., 1985; Yang e col., 1992; Zajdel e col., 1985). A nisina foi igualmente descrita como não tendo apresentado o passo da adsorção, ao actuar contra BAL (Ogden e Waites, 1986; Ogden e col., 1988).

Os nossos resultados, ao indicarem uma acção bactericida muito rápida da nisina, sobre todos os modelos bacterianos escolhidos, levaram-nos a concluir que apresentará um efeito directo sobre os seus alvos de acção. A descida acentuada da viabilidade celular pela adição da nisina, ocorrendo em cinco minutos, à qual correspondeu uma alteração muito precoce do perfil da membrana citoplasmática associado a um aumento da sua permeabilidade, verificado pelo rápido e extenso efluxo de potássio em poucos segundos, não é compatível com o mecanismo de adsorção proposto para as colicinas e para outras bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivo.

A ausência de uma membrana exterior apresentando receptores específicos para esta bacteriocina poderá justificar a sua passagem directa através da parede celular (Jack e col., 1995) e o fenómeno de resistência das espécies bacterianas Gram negativo a compostos membranoactivos tendo esta resistência sido associada à presença de uma membrana exterior no seu invólucro. A insensibilidade à nisina foi observada para diferentes espécies bacterianas Gram negativo (Hurst, 1981; Spelhaug e Harlander, 1989) e por nós para *E. coli* tratada com 1000 UI/ml do lantibiótico.

Esta membrana exterior, sendo uma estrutura constituída por fosfolípidos, lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas, e estabilizada por catiões divalentes, funciona como um filtro para a entrada na célula de substâncias estranhas e potencialmente agressivas, particularmente de natureza hidrofóbica, como detergentes e lantibióticos (Leive, 1974; Nikaido e Vaara, 1987). A possibilidade da ausência de receptores específicos para a adsorção da nisina não parece justificação plausível, uma vez que, vesículas membranares citoplasmáticas, obtidas a partir de células de *E. coli* (Kaback, 1972), e bactérias Gram negativo apresentando a sua membrana exterior afectada (Kordel e Sahl, 1986; Kordel e col., 1989; Stevens e col., 1992), ou formas L (Tagg e col., 1976) foram sensíveis à sua acção.

O contacto directo com a membrana citoplasmática parece indispensável à acção desta bacteriocina e o mecanismo da sua ligação ao invólucro bacteriano parece depender da afinidade da molécula policatiónica da nisina para os polímeros aniónicos da sua superfície celular, particularmente os ácidos teicóicos e lipoteicóicos (Bierbaum e Sahl, 1991). A parede celular das bactérias Gram positivo, sendo uma estrutura com uma carga aniónica a PH neutro, conferida principalmente por grupos fosfato e carboxílo (Beveridge e Murray, 1980), predominantemente na sua face externa (Doyle e col., 1975; Sonnenfeld e col., 1985), fornece um local de ligação para os peptídeos catiónicos.

Só um mecanismo tão geral, associado à ausência de receptores específicos na parede celular ou na membrana citoplasmática, poderia justificar os resultados, por nós obtidos, do seu efeito bactericida sobre bactérias Gram positivo de tão diferentes géneros, bem como a acção observada sobre protoplastos das diferentes espécies ensaiadas. Também o facto de a nisina actuar em bicamadas fosfolipídicas artificiais (Abee e col., 1991; Garcerá e col., 1993; Kordel e

col., 1989), bem como o papel apresentado pela carga global dessas estruturas na atracção e acumulação do peptídeo na sua superfície, constituem dados a favor da ausência de um mecanismo específico de adsorção.

Considerando que, a ligação e a actividade da nisina é muito dependente da carga da superfície bacteriana e da carga do próprio peptídeo, que essas características são altamente dependentes do PH e da força iónica do meio, só poderemos comparar resultados usando as mesmas condições.

Se considerarmos que a PH próximo de 8 existem mais grupos fosfato e carboxílo ionizados à superfície da célula que a PH próximo de 5, então a ligação da nisina, por interacção electrostática, e a sua acção, seriam superiores a PH mais elevado, para um peptídeo com a mesma carga. Mas, muitas bacteriocinas foram referidas como tendo uma actividade bactericida superior a baixo PH, o que se pode justificar pelo facto de a carga do peptídeo ser mais positiva para PH inferior a (7,0), facilitando a travessia da parede celular. Foi mostrado um máximo de ligação da nisina a PH (6,0) e um mínimo a PH (2,0) (Yang e col., 1992) e uma influência importante da força iónica do meio, verificando-se com a sua elevação uma menor ligação e actividade da bacteriocina.

A influência verificada por estas variáveis poderá justificar os diferentes resultados que têm sido referidos relativamente ao efeito bactericida e particularmente bacteriólitico em espécies bacterianas sensíveis, quando tratadas com lantibióticos.

A intensidade dos efeitos descritos, sobre as células bacterianas tratadas com nisina, mostrou-se dependente das espécies ou mesmo das estirpes utilizadas, da concentração de nisina, do PH força iónica e composição do meio, do número e estado fisiológico das células e, ainda, da temperatura, tendo alguns destes aspectos sido verificados por nós e por outros autores em BAL (Cortês e col., 1991; Ogden e Waites, 1986; Ogden e col., 1988; Waites e Ogden, 1987), e em diferentes estirpes de *L. monocytogenes* e outras espécies bacterianas Gram positivo (Benkerroum e Sandine, 1988; Bruno e col., 1992; Harris e col., 1989; Hurst, 1981; Tagg e col., 1976).

Morte celular e inibição do crescimento

A nisina foi definida como um polipeptídeo bactericida, sendo particularmente activa contra algumas espécies dos géneros *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Clostridium* (Hurst, 1981; Tagg e col., 1976).

Ao mostrarmos a cinética de morte celular induzida pela nisina verificamos esse efeito bactericida para as estirpes estudadas, confirmando a sua dependência da concentração de nisina usada e uma variabilidade de resposta em função da espécie bacteriana. De um modo geral, para todas as espécies estudadas, a um aumento da concentração de nisina correspondeu uma maior e mais rápida redução no número de células viáveis. *B. cereus* e *E. faecium*, foram as espécies que se mostraram mais sensíveis para uma concentração de nisina de 25 UI/ml. *B. subtilis* e, particularmente, *L. monocytogenes* mostraram-se mais resistentes, tendo sido necessária uma concentração mais elevada para obter uma resposta de idêntica magnitude. Uma diferença de sensibilidade em função das espécies bacterianas foi igualmente verificada na acção dos anestésicos locais e do álcool feniletílico, tendo sido mais intensos os efeitos sobre *B. cereus*, quando em comparação com *B. subtilis*, *B. megaterium* ou *E. faecium* (Silva e col., 1976a; 1976b; 1979). Também Johnson (1984), refere que a nisina é fortemente inibidora contra bactérias do género *Bacillus*. A existência de uma parede celular bastante mais densa e espessa nas células de *B. subtilis*, em comparação com as de *B. cereus*, dificultando o acesso da nisina ao seu alvo de acção, poderia justificar a sua relativa insensibilidade à adição de baixas concentrações de nisina.

Uma vez que as diferentes espécies bacterians apresentam diferente estrutura e composição química em diferentes fases do seu crescimento, bem como em diferentes condições culturais, como as que se referem à composição do meio de cultura e ao PH, era esperada uma diferente resposta ao tratamento com nisina. Esta diferença foi verificada quando usadas culturas obtidas em meio de TSB com PH inicial de (5,0) ou de (7,3), assim como culturas na fase exponencial ou estacionária de crescimento.

A cinética de morte bacteriana não foi significativamente diferente, quando se usaram culturas a diferentes valores de PH. Apenas *E. faecium* se mostrou mais resistente à morte a PH (5,0) que

a PH (7,3), para 25 UI/ml de nisina e, ao contrário, *L. monocytogenes* mais sensível, para as mesmas condições. Para concentrações superiores os efeitos foram mais rápidos e idênticos para todas as estirpes estudadas.

Se a cinética de morte não foi muito diferente nas duas situações, o mesmo não foi observado em relação à tendência para a recuperação do número de células viáveis e de densidade óptica, durante a incubação. O facto de verificarmos que o número de células viáveis volta a subir, particularmente quando usadas concentrações baixas de nisina, 25 e 100 UI/ml, a PH inicial de (7,3), poderá significar que as células que não foram lisadas poderão acabar por recolocar em funcionamento os seus sistemas metabólicos e restabelecer-se, ou que, embora tenham perdido a sua capacidade de crescer, não estejam mortas. Este fenómeno poderia ocorrer em consequência da perda de actividade da nisina durante a incubação a este valor de PH mas, para 1000 UI/ml não foi observada recuperação até às 24 horas de incubação. Uma adaptação das células à nisina, tornando-se resistentes à sua presença, poderia ser outra possibilidade. Esta hipótese de adaptação foi apoiada pelos resultados obtidos para *B. cereus* na acção da nisina sobre células sucessivamente isoladas após recrescimento em meios de TSB PH inicial de (7,3), contendo 100 UI/ml de nisina. Ao fim da terceira passagem em meio adicionado de 100 UI/ml de nisina, na fase exponencial da cultura, as células de *B. cereus* não reagiram a uma nova adição da mesma concentração do lantibiótico. Ao contrário do que foi observado para a estirpe selvagem, a presença de 50 UI/ml de nisina no meio de TSB no início da cultura não mostrou qualquer efeito sobre o normal crescimento deste microrganismo "adaptado". O número de CFU/ml e a densidade óptica, ao fim de 24 horas do tratamento de culturas em meio de TSB PH inicial de (7,3) com baixas concentrações de nisina, aproximam-se dos valores do controlo, podendo resultar de efeitos reversíveis sobre algumas das células. Estas células adaptadas à presença de nisina poderão agora continuar o seu crescimento e divisão normais, o que foi observado ao fim de algumas horas por microscopia óptica ou electrónica. A ausência de recuperação para as culturas tratadas com 1000 UI/ml poderá então resultar de alterações irreversíveis verificadas em todas as células, ou do efeito sobre outras funções vitais. A descida de densidade óptica que foi observada como inferior para a concentração mais elevada de 1000 UI/ml, em *B. cereus*, pode exactamente significar alterações a níveis diferentes na célula. A resistência adquirida à nisina,

resultante da adaptação das células, foi recentemente descrita por Davies e Adams (1994), em *L. monocytogenes*. Estes autores consideram que as adaptações ocorrem ao nível da membrana citoplasmática ou da parede celular, de forma a reduzir a presença ou a acessibilidade dos locais de ligação da nisina e consequentemente impedindo a sua incorporação na célula e a sua morte.

Em culturas obtidas em meio de TSB a PH (5,0), a observação de que as mesmas concentrações de nisina provocavam um efeito bactericida de idêntica intensidade, associado a uma ausência de sinais de lise, com excepção de *E. faecium* para as concentrações de 100 e 1000 UI/ml, foi acompanhada de uma diferente atitude em relação ao rejuvenescimento das células durante a incubação. Durante o tempo de incubação que representamos nos gráficos apresentados nos resultados, não se revelou, de uma maneira geral, qualquer recuperação dos valores de CFU/ml. Leituras efectuadas às 24 horas revelaram, contudo, que a viabilidade aumentou embora para níveis abaixo do controlo e inferiores aos verificados para PH (7,3). Este aumento da viabilidade, ao não ser acompanhado de qualquer alteração na densidade óptica, poderá levar a supôr que a alteração que mata a célula mas não a lisa poderá ser ultrapassada e que a célula poderá recuperar o seu metabolismo, mas não a sua capacidade de multiplicação.

A capacidade de recuperação da viabilidade foi mostrada em células de *B. cereus* apresentando alterações membranares ultraestruturais, da permeabilidade e da actividade enzimática, resultantes de tratamentos membranoactivos. Estas células mostraram-se capazes de retomar o seu comportamento bioquímico e as suas características micromorfológicas normais, não tendo este fenómeno sido possível quando concentrações superiores causaram alterações mais graves e irreversíveis com lise celular extensa (Silva e col., 1976a; 1979). A formação de agregados de células de *Lactobacillus* e *Pediococcus,* bem como de outras espécies bacterianas Gram positivo, após a adição de uma concentração de nisina superior a 100 UI/ml, justificou a perda de viabilidade (descida artificial de CFU/ml), sem sinais de lise, apresentada nesta situação (Ogden, 1986; Ogden e Waites, 1986; Reisinger e col., 1980). A observação de células apresentando formas longas e em cadeia, sem separação, e zonas de adsorção, nas culturas a PH inicial de (5,0), poderiam justificar a diminuição da viabilidade sem alteração da densidade óptica. Mas, os estudos de microscopia óptica e electrónica revelaram que as células se

encontram com alterações a nível da parede celular e da membrana citoplasmática, embora a sua densidade electrónica seja mantida.

Quando comparamos o efeito bactericida da nisina sobre culturas na sua fase exponencial e estacionária de crescimento, a PH inicial de (7,3), concluimos que o efeito sobre o número de CFU/ml foi mais reduzido, mais progressivo, particularmente para *B. subtilis*, *E. faecium* e *L. monocytogenes* e mais dependente da concentração. Para *E. faecium* verificamos descida, lenta e progressiva da viabilidade mas apenas para 1000 UI/ml. Esta diferença, em relação à concentração necessária para provocar idêntico efeito na viabilidade das culturas exponenciais ou estacionárias, poderia dever-se ao maior número de células, bem como a alterações ocorridas na sua estrutura durante o envelhecimento que as tornem com menor afinidade para a nisina. A condição de baixa actividade metabólica apresentada pelas células nestas condições, poderá igualmente levar a que as alterações não afectem a sua função. Se a descida de células viáveis foi menos drástica nesta situação, a densidade óptica não sofreu alterações significativas, com excepção para *E. faecium* e a concentração de 1000 UI/ml, à semelhança com o verificado para culturas exponenciais a PH inicial (5,0). A viabilidade também apresenta recuperação às 24 horas de incubação, mantendo-se a densidade óptica, o que poderia indicar um rejuvenescimento de algumas células, sem aumento do seu número total.

Sendo o invólucro das espécies bacterianas Gram positivo o alvo de acção de muitos compostos antibacterianos, e porque era proposto como alvo da acção da nisina, foi o seleccionado para avaliar do efeito bactericida sobre as diferentes espécies bacterianas.

Nestas bactérias, este invólucro é constituído pela parede celular e pela membrana citoplasmática. Estabelecendo-se uma ligação entre elas, e funcionando num sistema dinâmico e integrado que inclui também os outros componentes celulares (Rogers, 1987), estas estruturas são de extrema importância para a manutenção da integridade da célula e do seu funcionamento.

A parede celular

Esta estrutura dinâmica, permitindo o crescimento e a divisão celular (Koch, 1985), é responsável pela forma e resistência mecânica apresentada pela célula bacteriana (Beveridge, 1981). De facto, a camada espessa de peptidoglicano, componente principal da parede celular das bactérias Gram positivo, é, quando se encontre intacta, capaz de suportar uma pressão osmótica interna de 20 atmosferas (Shockman e Barrett, 1983). Embora constituindo uma barreira física à entrada e ao efeito de alguns agentes potencialmente nocivos para a célula, é, no entanto, muito permeável permitindo a penetração a moléculas com um peso molecular relativamente elevado (Scherrer e Gerhardt, 1971).

Para além do peptidoglicano e seus componentes carboxílicos, outros polímeros aniónicos, como os ácidos teicóicos ou os ácidos teicurónicos e/ou outros polissacarídeos acídicos ou neutros, encontram-se na parede celular das bactérias Gram positivo, provavelmente covalentemente ligados ao ácido N-acetilmurâmico do peptidoglicano e, por isso, provavelmente localizados na sua superfície, ou perto dela (Doyle e col., 1975; Fiedler, 1988; Shockman e Barrett, 1983; Ward, 1981). A composição e a localização destes polímeros acessórios é considerada como variável, conforme as espécies bacterianas e as suas condições de crescimento (Forsberg e col., 1973). Estes componentes da parede celular, através dos seus grupos fosfato e carboxílo, contribuem para a sua superfície negativamente carregada, facto que se apresenta de importância fundamental em vários processos biológicos, incluindo o crescimento celular (Beveridge, 1981; Graham e Beveridge, 1994; Sonnenfeld e col., 1985). Assim, os ácidos teicóicos ou teicurónicos e outros polímeros de natureza aniónica, apresentam uma elevada afinidade para os iões metálicos e, por esse facto, desempenham um importante papel na acção de enzimas membranares cuja actividade seja dependente de catiões (Beveridge, 1981; Beveridge e Murray, 1980; Doyle e col., 1980). Para além desta função, estes componentes estão igualmente implicados na ligação de moléculas de natureza catiónica e de algumas enzimas autolíticas ao seu substrato, a parede celular (Brown e col., 1970), controlando a sua importante actividade em várias funções biológicas entre as quais se incluem o crescimento e a divisão celular, bem como a autólise bacteriana (Beveridge, 1981; Fan, 1970; Fan e Beckman, 1971; Forsberg e Rogers, 1971).

A nisina foi referida, por alguns autores, como um agente inibidor de algumas enzimas associadas à membrana citoplasmática e responsáveis pela biossíntese do peptidoglicano. O mecanismo pelo qual esta inibição ocorre parece basear-se no impedimento da síntese do lípido intermediário, decorrente da formação de complexos entre a bacteriocina e o undecaprenilpirofosfato activado (Linnett e Strominger, 1973; Reisinger e col., 1980). No entanto, as concentrações de nisina que mostraram inibir esta síntese foram várias vezes superiores às necessárias para inviabilizar as bactérias (Reisinger e col., 1980). As elevadas concentrações e o longo tempo necessários para o efeito, levaram vários autores a considerarem que este mecanismo de acção não corresponderia ao mecanismo primário de morte das células bacterianas susceptíveis tendo, por isso, sido considerado como um mecanismo secundário na acção desta bacteriocina (Henning e col., 1986; Ruhr e Sahl, 1985; Sahl, 1991). Os resultados por nós obtidos mostraram que concentrações de 25 UI/ml a 100 UI/ml de nisina, conforme as espécies, foram suficientes para inibir significativamente o número de células viáveis em apenas 5 minutos de tratamento, tempo para o qual a Absorvância a 550 nm não sofreu ainda alterações e a microscopia electrónica revela, de um modo geral, células com a parede celular praticamente intacta. As células ou se apresentam praticamente intactas ou, se em lise, ainda não é observada alteração da forma nem da estrutura da parede celular, mesmo que a membrana se mostre já muito dissolvida. Nas situações estudadas, o efeito bactericida da nisina não parece resultar de um efeito primário sobre a parede celular. As alterações a este nível parecem ocorrer mais tardiamente.

Segundo Ruhr e Sahl (1985), a inibição da síntese do peptidoglicano poderia resultar, não de uma acção directa sobre este componente do invólucro mas sim como uma consequência da deplecção da célula no seu potencial electroquímico, com a consequente paragem de qualquer síntese, incluíndo a do peptidoglicano.

Mas, deveremos considerar que, de algum modo, a parede celular se encontra alterada, pelo menos no que respeita à sua integridade e rigidez, conferidas pelo peptidoglicano, propriedades essas que caracterizam as bactérias Gram positivo frente à coloração de Gram (Beveridge, 1990). Ao verificarmos que as bactérias que mantêm a sua forma e uma certa integridade, pelo menos numa fase muito inicial do tratamento e para concentrações mais baixas, se apresentam

com uma reacção negativa a esta coloração, leva-nos a pensar que a parede celular mesmo presente e com um aspecto aparentemente intacto se apresente fragilizada. Esta situação é particularmente observada para as bactérias que se desenvolveram em meio de TSB a um PH inicial de (5,0), para as quais verificamos que concentrações idênticas às referidas para as culturas a PH (7,3) provocaram um efeito bactericida de intensidade semelhante, não sendo observada lise mesmo ao fim de muito tempo de actuação. Ao serem observados os resultados perante a coloração de Gram, mesmo para um tempo de 5 minutos após a adição de uma dose bacteriólitica para culturas em PH (7,3), as bactérias apresentaram-se invariavelmente negativas ao Gram. Embora com um aspecto morfológico aparentemente normal, a parede celular encontra-se sem dúvida fragilizada, apresentando mesmo muitos sinais de ruptura, diminuição de espessura e de densidade electrónica, no género *Bacillus,* e presença de protoplastos em *E. faecium.*

A membrana citoplasmática

A membrana citoplasmática, de fundamental importância fisiológica, mostrou-se o alvo primário de acção de numerosos tratamentos e compostos antibacterianos.

Após Ramseier (1960) ter sugerido que a nisina, devido à sua natureza catiónica e PI básico, actuasse como um detergente catiónico, sobre a superfície celular, induzindo a libertação de material com absorção em UV (260 nm), por alteração da barreira de permeabilidade constituída pela membrana citoplasmática, vários foram os autores que, mais recentemente, concluíram ser a membrana citoplasmática o alvo primário de acção da nisina (Hurst, 1981; Ruhr e Sahl, 1985; Sahl e col., 1995). Efeitos membranoactivos foram igualmente descritos para numerosas outras bacteriocinas (Bruno e Montville, 1993; Chikindas e col., 1993; Klaenhammer, 1993; Schüller e col., 1989).

Sendo a sua principal função a de barreira de permeabilidade, separando a célula do seu meio ambiente, controlando o tráfico de nutrientes e catabolitos, esta estrutura é, nas células procariótas de muitas espécies bacterianas Gram positivo, de uma importância acrescida pelo facto de constituir a única estrutura membranar (Silva, 1980). Por isso, encontra-se envolvida na síntese da parede celular e em numerosos fenómenos biológicos de importância vital para a

célula, entre os quais se destacam o transporte de aminoácidos, de açucares e iões, a biossíntese de fosfolípidos, a fosforilação oxidativa, o transporte de electrões e os quais se baseiam, em grande parte, em numerosas actividades enzimáticas a esta estrutura associadas e à qual corresponde uma elevada concentração proteica (Kaback, 1970; Machtiger e Fox, 1973).

Segundo o modelo de Singer e Nicolson (1972), a membrana citoplasmática é constituída por uma bicamada fosfolipídica na qual são inseridas proteínas integrais e associadas proteínas periféricas e de cuja interacção resultam as suas propriedades vitais. A membrana citoplasmática bacteriana é assim composta, predominantemente, de proteínas e de lípidos sendo dentro deste grupo os fosfolípidos os mais representativos (Kaback, 1970). Os fosfolípidos são, aliás, componentes quase exclusivos da membrana citoplasmática (Salton, 1971), pelo que poderão ser considerados como marcadores satisfatórios destas estruturas.

A composição em fosfolípidos das membranas citoplasmáticas de bactérias Gram positivo é bastante variável com as espécies bacterianas mas, de uma maneira geral, para além de fosfatidiletanolamina possuem quantidades apreciáveis de fosfolípidos acídicos (Lang e Lundgren, 1970; Rothman e Kennedy, 1977; Santos-Mota e col., 1970). Além das variações observadas em função das espécies bacterianas, quer selvagens quer manipuladas geneticamente, as diferenças na composição fosfolipídica são, dentro da mesma estirpe bacteriana, resultantes de diferentes condições de crescimento das células e do seu estado fisiológico (Joyce e col., 1970; Santos-Mota e col., 1972; Silva, 1975; Vorbeck e Marinetti, 1965), sendo por isso possível, dentro de certos limites, alterar e controlar a composição das membranas citoplasmáticas em lípidos e proteínas (Machtiger e Fox, 1973) e, consequentemente, a sua fluidez e viscosidade. Em diferentes espécies de bactérias Gram positivo foi observado que a acidificação das culturas, quer resultante da produção de ácido láctico a partir de glucose presente no meio, quer da utilização de um meio acidificado, foi acompanhada de um aumento na quantidade de fosfolípidos neutros (fosfatidiletanolamina) e carregados positivamente (derivados aminoacil do fosfatidilglicerol), com a consequente diminuição da proporção de fosfolípidos acídicos (fosfatidilglicerol e cardiolipina) (Bishop e col., 1977; Houtsmuller e Van Deenen, 1964; Op den Kamp e col., 1967; Santos-Mota e col., 1970 e 1972; Silva, 1979).

A fase de crescimento celular mostrou influenciar igualmente, e de um modo significativo, a composição fosfolipídica da membrana citoplasmática de algumas espécies bacterianas (Joyce e col., 1970; Op den Kamp e col., 1967). De um modo geral, parece possível dizer-se que a um aumento da idade fisiológica das culturas corresponde um aumento da quantidade de derivados aminoacil do fosfatidilglicerol (Vorbeck e Marinetti, 1965).

Muitos dos agentes que agridem as células bacterianas causam alterações estruturais e funcionais nos sistemas membranares, por interacção com os lípidos e/ou as proteínas.
Considerando que os compostos membranoactivos produzem os seus efeitos nas membranas biológicas, como resultado da sua inserção no interior hidrofóbico da bicamada fosfolipídica, diminuindo a fluidez e viscosidade das cadeias lipídicas, e alterando desse modo a sua permeabilidade com possível dissolução (Cerbón, 1972; Feinstein e col., 1975; Pache e Chapman, 1972; Silva e col., 1979), parece importante o estabelecimento de uma interacção inicial entre essas moléculas (de natureza anfipática), através dos seus grupos polares, e os grupos polares dos componentes membranares (Cerbón, 1972; Fernández e Cerbón, 1973). Assim sendo, serão os fosfolípidos acídicos os responsáveis pela interacção iónica inicial, quando os compostos anfipáticos apresentam características catiónicas (Silva, 1975; Silva e col., 1979), mostrando maior eficácia nessa ligação as membranas das células que cresceram a PH mais elevado e em culturas na sua fase exponencial de crescimento.

O efeito de agentes membranoactivos pode ser observado numa fase inicial pela alteração do perfil da membrana, através de estudos ultraestruturais, e pelo efluxo de potássio, através de estudos espectrofotométricos. Realizamos estes estudos, nas espécies bacterianas que nos propusemos estudar, a fim de avaliarmos as alterações induzidas pela nisina sobre esses parâmetros. Os estudos morfológicos de ultraestrutura, por microscopia electrónica de transmissão, revelam-se de grande importância para o conhecimento pormenorizado da actuação, sobre a célula bacteriana, de um agente químico agressor. Os estudos morfológicos por microscopia óptica podem ser complementares permitindo observar o efeito do tratamento

sobre a célula, evitando o possível efeito agressivo induzido por compostos usados durante a preparação das amostras para microscopia electrónica, particularmente a fixação.

Tagg e col. (1976), referem que está ainda pouco esclarecida a relação entre a estrutura e a função das membranas biológicas e que existem muito poucos estudos de natureza morfológica dos efeitos produzidos por tratamentos com bacteriocinas em bactérias susceptíveis. As referências a estudos morfológicos, quer por microscopia óptica, quer particularmente por microscopia electrónica, continuam a ser muito reduzidas e existentes apenas para algumas bacteriocinas.

Uma vez que a utilização de culturas a diferentes valores de PH ou em diferentes fases de desenvolvimento não reflectem as mesmas características estruturais e moleculares, estudamos as duas situações, para as diferentes espécies bacterianas.

Alterações ultraestruturais

A esta variável composição fosfolipídica da membrana citoplasmática está ainda associada uma distribuição assimétrica desses fosfolípidos através dos dois folhetos da bicamada, sendo variável com os géneros e as espécies bacterianas (Barsukov e col., 1976; Bishop e col., 1977; Paton e col., 1978; Rothman e Kennedy, 1977).

A assimétrica distribuição dos fosfolípidos e proteínas pelos dois folhetos da membrana citoplasmática não parece contudo responsável, pelo menos unicamente, pelo perfil trilamelar assimétrico que as membranas das bactérias Gram positivo apresentam quando observadas por microscopia electrónica de transmissão em cortes ultrafinos. De facto, nas espécies bacterianas Gram positivo a membrana citoplasmática, quando devidamente fixada e contrastada, apresenta um perfil assimétrico. Este perfil corresponde, do ponto de vista molecular, a duas camadas electrodensas e hidrofílicas, compostas pelos grupos polares dos fosfolípidos e das proteínas integrais e pelas proteínas periféricas, em que a camada exterior é mais espessa e densa aos electrões que a interior. Estas duas camadas estão separadas por uma zona electrotransparente e hidrofóbica, constituída pelas cadeias de ácidos gordos dos fosfolípidos e pelas zonas hidrofóbicas das proteínas integrais (Silva, 1979; Silva, 1984). Esta assimetria parece devida à

presença de moléculas anfifílicas, as quais se encontram ancoradas unicamente na camada exterior da membrana citoplasmática (Silva, 1984). Estas moléculas anfifílicas são predominantemente representadas, nas estirpes estudadas, pelos ácidos lipoteicóicos (Fiedler, 1988; Huff, 1982; Lambert e col., 1977; Silva, 1984; Wicken e Knox, 1975).

Considerando que o perfil ultraestrutural assimétrico da membrana citoplasmática apenas se verifica enquanto a célula mantém o seu estado homeostático intacto, qualquer alteração que ocorra (lise bacteriana, qualquer que seja o mecanismo que lhe dê origem; lesões provocadas sobre a membrana e alteração da sua permeabilidade; desordem dos lípidos membranares com consequente aumento da fluidez e da permeabilidade (Silva, 1975), resulta numa alteração precoce desse perfil para simétrico (Silva, 1979; Silva, 1984). A este estado parece corresponder uma perda das moléculas anfifílicas do folheto externo da membrana citoplasmática, com a consequente diminuição da sua espessura e aumento da espessura e densidade electrónica do folheto interno (Silva, 1984). A perda de fosfolípidos ou a sua hidrólise também foi observada quando as células de bactérias Gram positivo foram sujeitas a tratamentos membranoactivos, como o calor húmido (Silva e Sousa, 1972; Sousa e col., 1972).

São vários os tratamentos físicos ou químicos, considerados como membranoactivos, que implicam uma alteração precoce deste perfil assimétrico, com alterações progressivamente mais graves com o tempo e a concentração, como sejam as fracturas e dissolução em larga extensão, o aumento do espaço periplasmático, o aparecimento de estruturas tipo mesossoma complexas e o desaparecimento de ribossomas. A parede celular, em muitas das situações referidas, não apresenta alterações visíveis significativas. As alterações ultraestruturais observadas são muito dependentes dos géneros e espécies bacterianas, do agente agressor, da sua concentração e do tempo de actuação, sendo destacados os tratamentos com o alcoól feniletílico (Silva e col., 1976 a); calor húmido (Silva e Sousa, 1972; Sousa e col., 1972); anestésicos locais (Silva e col., 1979); solventes orgânicos (Silva e col., 1978) e detergentes catiónicos (Cabral, 1992; Parente, 1984). Os agentes químicos membranoactivos apresentados são compostos de natureza anfipática, com características hidrofóbicas e a sua interacção com as membranas é fundamentalmente de natureza hidrofóbica (Roth e Seeman, 1972), podendo considerar-se que a nisina possa ter um efeito semelhante.

Foi de facto por nós verificado que o perfil assimétrico da membrana, normalmente apresentado pelos diferentes modelos bacterianos escolhidos, foi imediatamente modificado após a adição de nisina, mesmo para baixas concentrações. As alterações foram bastante mais intensas e precoces para *B. cereus,* e mais dependentes da concentração e do tempo para *B. subtilis*, *E. faecium* e *L. monocytogenes*. Estes resultados confirmam que a nisina altera muito precocemente a membrana citoplasmática, modificando a sua composição molecular.

A alteração da permeabilidade

Em condições normais de integridade estrutural, esta bicamada fosfolipídica é quase totalmente impermeável a moléculas e a iões, sendo responsável pela regulação selectiva do seu fluxo entre a célula e o meio ambiente. Acompanhando as referidas alterações ultraestruturais do perfil membranar, ou mesmo a sua solubilização, ocorrem alterações dessa permeabilidade selectiva. De facto, tem sido observado que a adição de moléculas anfifílicas causa um aumento acentuado da permeabilidade a moléculas e iões. Esta alteração é no entanto selectiva, dependendo do tipo de molécula usada e da sua concentração, sendo que a um aumento de concentração corresponde geralmente um aumento da permeabilidade a moléculas e iões de baixo peso molecular, e uma permeabilidade a moléculas e iões de dimensões crescentes.

As células bacterianas acumulam potássio contra um gradiente de concentração (Epstein e Schultz, 1968), e os elevados níveis internos atingidos são obtidos pelo funcionamento de diversos sistemas de transporte e pela impermeabilidade da membrana citoplasmática (Hughes e Poole, 1989). Segundo Kroll e Anagnostopoulos (1981), o rápido e extensivo efluxo de potássio intracelular constituí a primeira indicação de lesão da permeabilidade selectiva, responsável por esse gradiente de concentração. Efeitos mais extensos na integridade desta estrutura conduzem à saída de componentes intracelulares de maiores dimensões como o ATP, material com absorção na zona UV (260nm) e peptídeos ou produtos resultantes da sua desintegração. Este material é de fácil quantificação em filtrados de suspensões bacterianas (Allwood e Hugo, 1971; Allwood e Russell, 1968; Silva e col., 1976a e 1976b). O extenso e precoce efluxo de potássio intracelular (2 a 3 minutos) mostra que não só as membranas são directamente afectadas mas que também a

sua permeabilidade é primariamente alterada, quando tratadas com um composto membranoactivo (Santos-Mota e col., 1971; Silva e col., 1976a, 1976b e 1979).

O facto de o potássio ser o catião inorgânico mais abundante nas células bacterianas e de apresentar capacidade de estimular muitas das actividades enzimáticas dependentes de catiões monovalentes, levou a propôr-lhe um papel crucial no metabolismo celular bacteriano (Evans e Sorger, 1966). A sua redução acentuada no interior da célula, perturbando o balanço iónico, pode induzir uma inibição quase total da síntese proteíca sem grande prejuízo da síntese de ARN, levando à formação de ribossomas deficientes em proteínas (Ennis e Lubin, 1965), e influenciar a taxa de crescimento celular. Várias foram as situações em que, juntamente com uma lesão da membrana citoplasmática, foi verificada uma deplecção ribossómica (Santos-Mota e col., 1971). A perda simultânea de outros componentes intracelulares terá um efeito de agravamento na desintegração e perda de ribossomas, e na consequente perturbação da actividade metabólica. Será de considerar que o facto de aumentar a permeabilidade membranar poderá, por si só, facilitar a entrada das moléculas agressoras para o interior da célula, onde poderão directamente exercer o seu efeito a outros níveis, como na inibição da síntese proteica.

O catião potássio, sendo o principal responsável pela elevada pressão osmótica apresentada pelas bactérias Gram positivo e pela sua manutenção, desempenha ainda um papel importante na osmorregulação da célula bacteriana. Ao perder potássio a célula reduz a sua pressão osmótica interna, o que poderá levar a uma contracção do citoplasma, por entrada de iões monovalentes do meio, como o sódio, de forma a contrabalançar a saída das cargas positivas, e conduzir à plasmólise (Cabral, 1990). Esta plasmólise é habitualmente observada pelo aumento nos valores da Absorvância e acompanhada por observações de microscopia óptica ou preferencialmente electrónica (Cabral, 1990). O efluxo dos iões potássio poderá ser acompanhado da saída de metabolitos de baixo peso molecular, alguns dos quais aniónicos, de modo a restabeler a carga eléctrica intracelular, como fosfato inorgânico, nucleótidos e moléculas de ARN de pequenas dimensões.

Uma vez que a concentração intracelular de potássio se mostrou tão importante para o bem estar da célula, isso levou vários autores a estudarem o seu efluxo, pelo aumento no meio externo, e a

relacionar esse efeito com a actividade batericida do tratamento com diferentes compostos, mesmo sem ocorrência de lise.

O método frequentemente usado para avaliar o fluxo de potássio através de membranas bacterianas, baseou-se na determinação por fotometria de chama da concentração de potássio libertado da célula quando da sua agressão, efectuada nos filtrados de suspensões bacterianas (Zajdel e col., 1985). Este método, igualmente utilizado por nós, mostrou-se limitado nas situações em que se verifique um efluxo muito precoce e rápido, em aproximadamente 2 minutos, como o que ocorreu em *B. cereus*. Exigindo esta técnica uma filtragem da suspensão bacteriana, não sendo exequível para um só operador processar amostras sem que ocorram alguns minutos de intervalo, tornou-se particularmente complicado estudar uma cinética que ocorre num máximo de tempo de aproximadamente 5 minutos e, por isso, exigindo o processamento de amostras a intervalos mínimos de um minuto. A possibilidade de realização de vários ensaios a partir de uma suspensão bacteriana, e em simultâneo a realização de um ensaio para determinação da concentração total de potássio livre, após a destruição das células, constitui uma vantagem deste método. De facto, idealmente, o efluxo de potássio deve ser comparado com o total do catião da célula ensaiada, já que, este teor é variável com a espécie ou a estirpe bacteriana, as condições culturais e o estado fisiológico das células. Foi verificada uma tendência para a descida do teor de potássio intracelular com a passagem da fase exponencial para a fase estacionária na qual a concentração interna é apenas ligeiramente superior à externa (Schultz e Solomon, 1961). Para *E. faecium*, os valores do total de potássio interno são superiores ao verificado em *B. cereus* e ainda superiores para *Listeria*, tendo sido verificado um fenómeno de tudo ou nada, para as concentrações adequadas de nisina.

De forma a obtermos um estudo mais pormenorizado e mais real, particularmente no tempo, usamos o método potenciométrico descrito, recorrendo a um eléctrodo selectivo para o catião potássio, resolvendo assim a principal desvantagem apresentada pelo método anteriormente referido. Este método tornou possível estudar a cinética de efluxo do potássio de uma forma mais precisa, permitindo uma determinação contínua deste catião directamente na suspensão bacteriana. As vantagens da utilização de um eléctrodo selectivo no estudo do efluxo de potássio, induzido por agentes químicos, foram referidas por Kroll e Anagnostopoulos (1981), e

foi usado por vários autores, embora em condições diferentes (Abee e col., 1994; Cabral, 1991). Contudo, os ensaios ao serem efectuados separadamente exigem a preparação de suspensões para a sua realização, uma vez que o tempo que medeia entre a realização de dois ensaios pode ser de aproximadamente 30 minutos, tempo esse que pode resultar em alterações espontâneas nos teores de potássio das células em suspensão. Esta técnica não permite igualmente a realização de um controlo, nas mesmas condições das amostras tratadas, mas a avaliação do total de potássio é contudo possível. Esta técnica permitiu-nos verificar que uma elevada % de potássio deixou a célula em 30 segundos, para as estirpes mais sensíveis.

A dinâmica de saída de potássio, que verificamos, é a favor da existência de uma alteração directa da permeabilidade da membrana citoplasmática. Na verdade, se a nisina actuasse como um inibidor metabólico geral, ou como inibidor da actividade ATPásica da membrana (como a azida sódica), o efluxo ocorreria mas a resposta seria muito mais gradual (Rosenthal e Mathson, 1973). Tal como nós, Abee e col. (1994) verificaram que o efluxo de potássio foi muito rápido em *L. monocytogenes*, para concentrações muito baixas, embora não chegando a zero, e igualmente dependente do PH.

O efluxo de potássio mostrou uma maior intensidade quando se trataram suspensões celulares de bactérias que cresceram a PH (5,0). Esta diferença em relação às bactérias a PH (7,3) foi mais acentuada para *B. subtilis*.

Outros autores ao usarem a nisina, bem como outros lantibióticos, contra diferentes microrganismos (Ogden e Waites, 1986; Ruhr e Sahl, 1985; Sahl e Brandis, 1983), verificaram que ao afectar a permeabilidade selectiva desta bicamada lipídica provocavam, como consequência, o efluxo de componentes intracelulares, com uma rápida saída de compostos de baixo peso molecular (potássio, aminoácidos e ATP). A observação de que a velocidade de efluxo era idêntica para o catião potássio e para moléculas maiores como aniões fosfato, ATP, aminoácidos carregados positiva ou negativamente, e em diferentes espécies bacterianas, levaram a pensar não se tratar de um mecanismo específico nem em relação ao tamanho da molécula nem à sua carga (Ruhr e Sahl, 1985; Sahl e Brandis, 1983). Este fenómeno de alteração da integridade da membrana citoplasmática, por inserção do peptídeo na bicamada fosfolipídica e a formação de canais aquosos permeáveis aos iões, foi associado com uma

drástica e rápida (cerca de um minuto) dissipação do seu potencial, formado por um gradiente electroquímico de protões ($\Delta\psi$ e ΔPH), e dos gradientes de solutos através da membrana citoplasmática, (Abee e col., 1991; Abee e col., 1994; Bruno e Montville, 1993; Kordel e col., 1988; Montville e Bruno, 1994; Ruhr e Sahl, 1985; Sahl e col., 1985; Schüller e col., 1989).

Efeito sobre protoplastos

De modo a confirmarmos que, de facto, a nisina afecta directa e rapidamente a membrana citoplasmática, sem interferência da parede celular, estudamos o seu efeito, por microscopia electrónica, para uma baixa concentração e um tempo de apenas cinco minutos, sobre protoplastos obtidos das diferentes espécies bacterianas.

Se os tratamentos membranoactivos, que perturbam a organização molecular da membrana citoplasmática dos protoplastos, podem originar a sua lise, os resultados obtidos levaram-nos a concluir, como outros autores, que a nisina apresenta um mecanismo de acção bactericida e que este efeito se exerce primariamente a nível da membrana citoplasmática. Os protoplastos lisaram com o tratamento, tendo a concentração e o tempo sido inferiores em relação ao necessário para a lise das bactérias intactas. Assim, talvez seja de admitir que as diferenças que se observaram em relação à sensibilidade para as diferentes espécies bacterianas estudadas resulte, não de uma diferença de sensibilidade do alvo de acção, para as mesmas condições, mas de uma diferença de acesso a esse alvo, por maior resistência ou menor afinidade da superfície.

Perante estes dado, poderemos concluir que as alterações responsáveis pela morte da célula se exercem ao nível da membrana, independentemente da parede celular, mas que esta altera a velocidade com que o efeito é atingido, e influencia a concentração de nisina necessária para esse efeito. A rápida lise observada nos protoplastos está de acordo com uma rápida e extensa alteração da permeabilidade membranar, não existindo qualquer outra barreira à saída dos componentes intracelulares. A lise nas células intactas, com o seu esvaziamento, ocorre quando surgem alterações na parede, o que é variável com as espécies e as condições. Nas células de *B. cereus*, podemos observar que com o tempo de actuação da nisina a parede celular se torna mais fina, aparecendo fantasmas com parede celular mas de morfologia completamente alterada e com pontos de dissolução (Figs. 42 e 44).

Segundo a teoria de dependência da energia da membrana, a acção da nisina é exercida de uma forma dependente de potencial membranar, e o limiar necessário dependente do PH do meio, sendo inferior para meios acídicos por aumento do gradiente de protões entre um interior alcalino e um exterior ácido (Abee e col., 1994; Garcerá e col., 1993). Encontrando-se o tampão da suspensão dos protoplastos a PH (8,0), podemos supôr, à luz desta teoria, não ser uma condição muito favorável para a acção da nisina. No entanto, a sacarose presente no meio poderá manter as células num estado suficientemente energizado para que a nisina possa exercer a sua acção. Estes resultados encontram-se em desacordo com o descrito por Jolliffe e col. (1981), não tendo observado lise quando tratou protoplastos com agentes indutores de lise, como a azida.

Efeito sobre a actividade enzimática

Os compostos membranoactivos poderão, para além de alterar a membrana citoplasmática e a sua permeabilidade, ao interactuarem com os fosfolípidos membranares, interferir com as proteínas nela localizadas, afectando especificamente a sua função por desnaturação, ou afectando as enzimas cuja acção é dependente de fosfolípidos, ou seja, lipoproteínas por dissociação dos fosfolípidos dos quais dependem (Silva e col., 1979).

A redução da viabilidade celular, associada a alterações ultraestruturais e de permeabilidade da membrana citoplasmática, tem sido relacionada com a redução da actividade enzimática de enzimas nela localizadas (Silva, 1980). De um modo geral, poderemos então estabelecer uma relação entre a alteração do metabolismo e a viabilidade celular. De facto, a célula ao inibir determinados sistemas enzimáticos poderá, como consequência, inibir determinadas vias metabólicas, entre as quais a respiração de diversos substratos.

De forma a avaliarmos a interferência da nisina nestes sistemas enzimáticos, realizamos dois tipos de ensaio que nos permitiram quantificar o seu efeito quer na actividade respiratória de células intactas, usando o succinato como substrato, quer na actividade da desidrogenase succínica em membranas isoladas a partir das diferentes espécies bacterianas.

Os nossos resultados indicaram-nos que a actividade respiratória, avaliada pela capacidade redutora do ião trifenil tetrazólio a diformazan, pela desidrogenase succínica (Nachlas e col.,

1960), foi fortemente inibida quando adicionada nisina, mesmo em baixas concentrações, a células que cresceram em meio de TSB com PH inicial de (7,3). Uma concentração de 5 UI/ml de nisina mostrou-se suficiente para inibir aproximadamente 90% do total da actividade respiratória, em *B. cereus*. Esta foi, contudo, a espécie bacteriana que se mostrou mais sensível, o que aliás tinha acontecido em relação aos restantes parâmetros. A actividade respiratória foi igualmente inibida para *B. subtilis*, mas apenas para 25 UI/ml de nisina se verificou uma inibição superior a 50%. Assim, associado a um rápido e extenso efluxo de potássio intracelular e a uma rápida perda de viabilidade, esteve associada uma inibição da actividade respiratória, mesmo para concentrações que afectaram com pouca amplitude os parâmetros referidos. Assim, concentrações inferiores às que causam a morte celular são potentes inibidores da actividade respiratória da bactéria. Poderemos pensar que a depleção das células em potássio e a inibição da respiração estão provavelmente envolvidas na morte celular destas bactérias.

Como referimos no capítulo dos resultados, os valores obtidos para *E. faecium* e *L. monocytogenes* não poderam ser directamente comparados com os apresentados para *B. cereus* e *B. subtilis*. A reacção usada para avaliar a actividade respiratória é baseada na competição do trifenil tetrazólio com o oxigénio, como aceitador artificial de electrões. O poder redutor gerado pela cadeia de transporte de electrões converte o trifenil tetrazólio em formazan, o qual se acumula nas bactérias metabolicamente activas. Esta reacção terá significado principalmente para as bactérias aeróbicas, como as do género *Bacillus*. Os baixos valores de Absorvância, observados para *L. monocytogenes* e *E. faecium*, devem-se à baixa produção de formazanos. Uma vez que aos *Enterococcus*, aerotolerantes, faltam citocromos, dependendo da glicólise para gerar ATP, a reduzida acção verificada na inibição da actividade respiratória, usando como substrato o succinato, poderia ser justificada por tal facto. Esta reduzida inibição, verificada para esta espécie, foi igualmente mostrada por tratamento com compostos membranoactivos, como os anestésicos locais (Silva e col., 1976a). *E. faecium*, e ao contrário de *E. faecalis*, reduz o tetrazólio a uma cor muito pálida ou nenhuma (Mundt, 1986), existindo mesmo algumas estirpes estritamente anaeróbias, isoladas do tracto alimentar de bovinos. *L. monocytogenes*, apresentou igualmente uma baixa actividade redutora do tetrazólio, o que provavelmente será resultado de um metabolismo anaeróbio facultativo. No entanto, e ao contrário do *E. faecium*, esta bactéria

possui citocromos, sendo observada inibição dessa actividade respiratória em aproximadamente 50%, para uma concentração de nisina de 25 UI/ml.

Estudos paralelos efectuados em suspensões de células que cresceram em meio de TSB PH (5,0), mostraram que a actividade respiratória foi mais intensamente inibida, particularmente para *B. subtilis,* sendo superior a 90% para uma concentração de nisina de 5 UI/ml. *L. monocytogenes* apresentou igualmente maior sensibilidade nestas condições.

Esta diferença verificada na inibição da actividade respiratória para as bactérias que cresceram a diferente valor de PH, mas suspensas no mesmo tampão a (PH 7,0), deverá resultar de diferenças moleculares nas suas membranas e não do PH do meio de reacção. A maior sensibilidade das bactérias que se desenvolveram a PH (5,0) poderá ser o resultado de uma adaptação do microrganismo para crescer a este valor de PH, o qual se verificou mais desfavorável para o seu desenvolvimento.

Gao e col. (1991) e Kordel e Sahl (1986), referem que a nisina parece inibir a actividade da citocromo oxidase, com inibição do consumo de oxigénio, em *Staphylococcus cohnii*, sugerindo que pode ter um efeito adicional nos componentes da cadeia transportadora de electrões, o qual pode anteceder a formação de poros.

O efeito sobre a actividade respiratória não poderá ser responsabilizado, pelo menos isoladamente, pela morte de todas as células, considerando que a nisina se mostrou activa contra bactérias anaeróbias obrigatórias como *Clostridium*. Okereke e Montville (1992), mostraram a relação entre a inibição de crescimento e o efeito de dissipação do potencial de membrana ao tratarem com nisina células de *Clostridium sporogens.*

A desidrogenase succínica, uma enzima localizada na membrana bacteriana (de Vrij e col., 1988; Machtiger e Fox, 1973; Pollock e col., 1971), apresenta uma actividade enzimática dependente, pelo menos em parte, da presença e da associação a determinados fosfolípidos da membrana, como acontece para outros sistemas enzimáticos (Coleman, 1973; Machtiger e Fox, 1973; Sandermann, 1978). A sua actividade poderá ser quantitativamente estudada em membranas isoladas pelo método usado por Konings e col. (1973), para *B. subtilis*.

A observação da inibição de enzimas ligadas à membrana, por anestésicos locais, foi interpretada como o resultado da perturbação do componente lipídico das biomembranas (Silva e col., 1979). Ao analisarmos os nossos resultados, verificamos uma actividade da desidrogenase succínica para vesículas membranares isoladas a partir de culturas exponênciais em meio de TSB PH inicial de (7,3) ou (5,0), usando como substrato o succinato de sódio. Esta actividade foi observada para vesículas membranares de *B. cereus* e *B. subtilis*, muito reduzida para *L. monocytogenes* e ausente para *E. faecium*. Estes resultados parecem reflectir o metabolismo respiratório da bactéria. Verificamos também que os resultados não foram muito diferentes em membranas de células que cresceram a PH (7,3) ou (5,0), excepto para *B. subtilis*, o qual mostrou uma actividade mais intensa desta enzima em vesículas de células que cresceram a baixo PH. O tratamento das vesículas membranares com uma concentração elevada de nisina, 1000 UI/ml, não resultou em alterações significativas na actividade desta enzima, relativamente ao controlo, para as condições de ensaio usadas. Esta insensibilidade da enzima à nisina poderá resultar da sua ligação a uma estrutura lipídica modificada, a qual não se mostre sensível à sua actuação. De facto, as membranas das estruturas assim obtidas apresentam um perfil simétrico (Konings e col., 1973), nas quais provavelmente ocorreu uma perda de moléculas anfifílicas e de fosfolípidos aniónicos, reduzindo os locais de ligação e de interacção para a nisina. Uma outra explicação possível baseia-se na teoria do limiar de potencial membranar.

Usando células bacterianas intactas, vesículas membranares isoladas de diferentes espécies bacterianas, vesículas lipídicas artificiais de diferentes composições (lipossomas) e sistemas membranares artificiais (BLM) foi verificada uma dependência da energia membranar para a formação de canais permeáveis aos componentes intracelulares responsáveis pela manutenção da integridade e viabilidade celular (Abee e col., 1991; Benz e col., 1991; Gao e col., 1991; Garcerá e col., 1993; Kordel e col., 1989; Ruhr e Sahl, 1985; Sahl, 1991; Sahl e col., 1987), sendo estes efeitos dependentes da composição fosfolipídica dos diferentes modelos membranares utilizados. Membranas que perderam total ou parcialmente a sua energia, por acção de protonóforos ou ionóforos, mostraram-se completa ou parcialmente insensíveis à nisina e outros lantibióticos (Bruno e col., 1992; Gao e col., 1991; Montville e Bruno, 1994; Sahl, 1991; Schüller e col., 1989; Van Belkum e col., 1991).

A adição de nisina a membranas não energizadas poderá não permitir que exerça a sua acção sobre a bicamada fosfolipídica não alterando os grupos dos quais depende a actividade da enzima. O sistema ascorbato/fenazina metossulfato, como dador artificial de electrões, é habitualmente usado para criar um potencial de membrana nas vesículas membranares, antes da adição do lantibiótico. No nosso trabalho tratamos as vesículas por 10 minutos com nisina, fornecemos o substrato e só após o período de activação da enzima foi adicionada a fenazina metossulfato. Assim, nas condições usadas a membrana não apresenta um potencial eléctrico e/ou um gradiente de PH suficientes para que a nisina possa exercer a sua acção de inserção na bicamada fosfolipídica.

A molécula de nisina contendo três aminoácidos α,β-insaturados, apresenta uma capacidade de ligação a grupos sulfidrilo, actuando como aceitadores electrofílicos. Esta mesma reacção é a que ocorre entre os desidroaminoácidos e grupos sulfidrilo da cisteína, para formar as pontes dissulfureto e dar origem à lantionina e β-metil-lantionina, da molécula de nisina.

Esta capacidade reactiva está na base do mecanismo proposto para a acção desta molécula contra esporos de diferentes bactérias. A inibição do desenvolvimento de esporos, de *Bacillus* e de *Clostridium*, não parece ocorrer pelos mecanismos propostos para as células vegetativas, mas sim pela modificação dos grupos sulfidrilo vitais nas membranas dos invólucros dos esporos germinativos, por reacção com a desidroalanina e desidrobutirina (Liu e Hansen, 1990; Liu e Hansen, 1993; Morris e col., 1984).

Apresentando muitas das enzimas e proteínas da membrana grupos sulfidrilo livre, como a desidrogenase succínica (Pollock e col., 1971), poderiam estas moléculas constituir alvos de acção para a nisina, por inactivação desses resíduos estruturais ou catalíticos, levando à inactivação de enzimas ligadas com o metabolismo energético e outras funções vitais para a célula. Gross e Morell (1970), verificaram que a coenzimaA, apresentando um grupo sulfidrilo numa extremidade, oferece um local de acção para os lantibióticos, o que explicaria o seu efeito antimalárico em ratos. Contudo, a actividade bactericida sobre células vegetativas de *Bacillus* e *Clostridium* mostrou-se independente da presença dos resíduos desidro na molécula de nisina (Liu e Hansen, 1992). O conhecimento mais preciso da relação estrutura/função poderá vir a

esclarecer alguns dos aspectos relacionados com a implicação destes grupos reactivos no mecanismo de acção da molécula da nisina.

Esta reactividade da nisina para moléculas contendo grupos sulfidrilo activos levou-nos a pensar na possibilidade da sua acção contra toxinas contendo esses grupos. A listeriolisina, uma hemolisina produzida por estirpes patogénicas de *L. monocytogenes* (Farber e Peterkin, 1991), apresenta um grupo sulfidrilo activo. A sua inactivação pela nisina poderia inibir a sua acção lítica nas células do hospedeiro e assim tornar a estirpe menos virulenta. Mas, se uma inactivação da molécula de listeriolisina pode ocorrer, igualmente poderá ter lugar uma inactivação da molécula da nisina, ou pelo menos uma redução da sua actividade. Uma ligação da nisina a esta enzima poderia resultar numa redução de composto capaz de interactuar com a membrana citoplasmática e assim justificar a necessidade de concentrações mais elevadas para atingir efeitos bactericidas, na estirpe bacteriana estudada.

Actividade bacteriolítica da nisina

Para além do efeito bactericida descrito, o qual ocorreu geralmente nos cinco minutos iniciais da adição da nisina, foi observado um efeito bacteriolítico cuja intensidade foi variável com as espécies bacterianas, a concentração de nisina, as condições culturais e o estado fisiológico das células. Este efeito bacteriolítico, observado por descida dos valores da Absorvância a 550 nm, foi iniciado após um tempo mínimo de quinze minutos e, por tal facto, considerado como um efeito secundário da acção da nisina, resultante das modificações a nível da célula responsáveis pela sua perda de viabilidade. Assim, as células das diferentes espécies bacterianas ensaiadas não morrem por lise celular, sendo este apenas um efeito decorrente das condições criadas na célula durante a sua morte. Estes dados espectrofotométricos foram concordantes com dados de microcopia óptica e electrónica, sendo visível um grau de destruição da célula com o aparecimento de material intracitoplasmático no seu exterior e fantasmas de células completamente desprovidas de conteúdo. Embora os resultados referidos para a lise celular sejam bastante discordantes, vários autores são da opinião que a lise não constituirá o mecanismo primário de morte dos microrganismos (Jack e col., 1995; Montville e Bruno, 1994).

A lise celular induzida pela nisina nos diferentes microrganismos em crescimento e em condições de PH inicial de (7,3), poderá implicar a participação da actividade enzimática das autolisinas.

As autolisinas são importantes proteínas catiónicas, endógenas, com actividade enzimática, apresentando capacidade de hidrolisar especificamente determinadas ligações do peptidoglicano do invólucro bacteriano das bactérias Gram positivo (Giesbrecht e col., 1976). O controlo deste sistema enzimático deverá ser efectuado com muito rigor, permitindo o crescimento, a divisão celular e o funcionamento normal da célula, verificando-se que uma alteração que provoque um descontrolo da sua actividade potencialmente suicida, leva à lise celular (Rogers e col., 1980).

As autolisinas de diferentes espécies bacterianas Gram positivo em crescimento activo, num meio de baixa força iónica, encontram-se na célula provavelmente ligadas por interacções do tipo iónico a polímeros aniónicos anfifílicos do invólucro celular. Polímeros como o ácido lipoteicóico, ácidos teicóicos ou teicurónicos, e lípidos acídicos da membrana citoplasmática como a cardiolipina e o fosfatidilglicerol, são compostos considerados como inibidores não competitivos da actividade autolítica, funcionando como seus potenciais reguladores, e uma libertação destes componentes para o meio ou uma alteração das suas características resultará então numa desrepressão das enzimas tornando-as livres para a destruição celular (Cleveland e col., 1976a e 1976b; Fischer e col., 1881; Höltje e Tomasz, 1975; Meyer e Wouters, 1987; Rogers e col., 1984).

Se uma relação entre as autolisinas, a parede celular, a membrana citoplasmática, associada à mobilidade dos lípidos nas membranas, parece providenciar um rápido e preciso controlo das autolisinas, então, qualquer alteração deste equilíbrio poderá desencadear um processo descontrolado. Os mecanismos de controlo das funções fisiológicas das autolisinas não são inteiramente conhecidos podendo ser diversos nas diferentes espécies Gram positivo (Doyle e Koch, 1987; Rogers e col., 1980). Também a actividade autolítica mediada por estas enzimas pode ser inibida ou induzida em diferentes condições experimentais.

A indução da actividade enzimática autolítica associada ao tratamento pela nisina, nas condições descritas, poderá ser o resultado de uma alteração dos processos reguladores dessa actividade. A indução da lise, por aumento da produção de autolisinas, não parece justificável para as células tratadas com nisina pelo facto de, como aliás já foi referido, o metabolismo estar afectado e a

síntese proteica não se encontrar estimulada. A possibilidade de uma parede celular alterada, mais sensível à acção das autolisinas, também não justifica o facto de a lise não ocorrer a PH inicial (5,0). Células da fase exponencial em TSB a PH inicial de (5,0), mostraram alterações da parede celular e da membrana citoplasmática, observadas por microscopia óptica e electrónica. Uma coloração de Gram, obtida das culturas tratadas com nisina, mostrou células com uma reacção negativa. Se considerarmos que a parede celular é a estrutura responsável pela resposta obtida perante esta coloração (Beveridge, 1990), podemos admitir que embora sem sinais de lise celular, esta estrutura do invólucro se encontra fragilizada, reflectindo uma alteração de estrutura. A microscopia electrónica mostrou, para as mesmas condições, células apresentando uma parede com algumas zonas danificadas, parecendo mais fina e electrotransparente, podendo mesmo estar ausente como acontece para o *E. faecium* pela observação de protoplastos. Nestas situações verificamos que a morfologia das células é mantida sensivelmente intacta e que a Absorvância a 550 nm não sofre alteração a partir da adição da nisina.

Estes resultados talvez se possam justificar por uma precipitação proteica na célula. Assim, a célula mantém a sua electrodensidade, ou até a aumenta ligeiramente, e as autolisinas, por protecção da ligação com o invólucro, podem continuar a funcionar. Quando o citoplasma da célula precipita, o seu esvaziamento não ocorre mesmo que as alterações membranares e de parede se verifiquem. Este fenómeno, ocorrendo apenas nas culturas ou suspensões celulares a PH (5,0), poderá relacionar-se com o facto de as proteinas precipitarem a um PH inferior ao do seu ponto isoeléctrico. A precipitação da nisina, como uma proteina, não é provável mesmo a PH baixo, uma vez que apresenta elevada estabilidade e solubilidade para PH acídico.

A ocorrência de lise sem degradação da parede celular pode ocorrer. Sinais da sua degradação, dependendo da concentração e da espécie bacteriana, só foram visíveis, mesmo para PH inicial (7,3), a partir de um mínimo de 15 minutos, ainda que na presença de células com extensos sinais de lise. Para *E. faecium* e *L. monocytogenes* verificamos que uma concentração de 100 UI/ml de nisina causa uma degradação da parede celular, a qual se observa por fracturas particularmente junto dos septos de divisão.

Após termos verificado, por microscopia electrónica, que nos primeiros minutos de actuação da nisina a membrana citoplasmática perde a natural assimetria dos seus dois folhetos electrodensos e, como já referimos, ter sido descrito que tal fenómeno poderia dever-se a uma perda de moléculas anfifílicas, particularmente dos ácidos lipoteicóicos a partir do folheto externo (Silva, 1984), poderemos de facto supôr que este poderá ser o mecanismo pelo qual a nisina desencadeia a lise. As células em lise apresentam um perfil membranar invariavelmente simétrico, podendo ser responsável pelo descontrolo do sistema autolítico endógeno, com a sua activação e consequente lise bacteriana (Joseph e Shockman, 1975). A nisina, pelas suas propriedades catiónicas, tem assim a capacidade de neutralizar os inibidores da actividade autolítica, por estabelecimento com eles de uma interacção iónica, podendo levar à lise celular extensa com degradação da parede celular, se as condições do meio no qual a expressão autolítica é observada forem adequadas. A libertação de autolisinas por este processo tipo troca iónica foi descrito para *Staphylococcus simulans*22, por tratamento com nisina (Bierbaum e Sahl, 1985, 1987 e 1991). É igualmente possível que as alterações ocorridas na membrana citoplasmática possam levar à libertação de enzimas autolíticas com ela associada (Bierbaum e Sahl, 1985).

Como já tivemos oportunidade de referir, a alteração da composição lipídica da membrana poderá afectar o controlo das autolisinas, a função de algumas lipoproteinas com actividade enzimática dependente da porção fosfolipídica, a sua propriedade de barreira com libertação de potássio indinpensável ao funcionamento de algumas enzimas e, consequentemente, o metabolismo celular. Situações que perturbem drasticamente o metabolismo celular, como a presença de um agente exógeno ou endógeno capaz de interferir com a fonte de energia, ou com a sua utilização, necessárias à manutenção da integridade celular, pode induzir o processo autolítico (Welsch, 1958). O gradiente electroquímico da membrana citoplasmática pode controlar a regulação de numerosas enzimas e a sua falha implicar uma inibição contínua dos processos metabólicos, por exemplo, de síntese do peptidoglicano, podendo levar, por este processo, à lise celular. A possibilidade de indução da autólise por tratamentos que alterem o gradiente eléctrico e/ou de PH, ou seja o estado de energização da membrana citoplasmática, foi mostrado para *B. subtilis* (Jolliffe e col., 1981), sendo o estado de energia da membrana um mecanismo de regulação das autolisinas nesta bactéria. Foi verificada a possibilidade da

ocorrência deste fenómeno para *E. faecium* (Carvalho, 1987), e para outras espécies possuindo polímeros aniónicos na parede celular (Mera e col., 1992). A possibilidade de a nisina actuar de uma forma dependente da existência de um potencial de membrana, sendo capaz de provocar a depleção em energia, poderia justificar o seu efeito autolítico. No entanto, Bierbaum e Sahl (1985), mostraram que uma concentração de nisina de 10 μg/ml causou uma forte lise em suspensões de *Staphylococcus simulans22* e que, essa lise, não foi influenciada pela pré-incubação das células com glucose, valinomicina ou CCCP. Assim, a lise resultante da acção da nisina parece mais devida à libertação de enzimas líticas do que à inibição de enzimas sintetizadoras (Bierbaum e Sahl, 1991). No nosso estudo, a lise celular por adição de nisina verificou-se em suspensões de células da fase exponencial, quer em meio de cultura quer em tampão. Assim, se a lise ocorre em células lavadas, não parece depender, pelo menos unicamente, do potencial de membrana.

O PH óptimo de acção para as diferentes autolisina é bastante variável, sendo igualmente variável, para cada uma delas, com a composição e força iónica do meio no qual a expressão da sua actividade é verificada. Para *B. subtilis*, Rogers e Wright (1986) mostraram uma reduzida actividade da glucosaminidase de suspensões celulares em tampão de autólise acídico. A expressão da actividade do sistema autolítico em *E. faecium* mostrou-se muito dependente da natureza do tampão, particularmente para PH elevado e, de um modo geral, a acção foi mais intensa para PH 6,8 e com pouco significado para PH (8,0) (Carvalho, 1987; Sayare e col., 1972; Shockman e col., 1967). A observação de autólise espontânea em suspensões celulares de *B. cereus* em tampão a PH (8,0), contraria a ideia de que um PH desta ordem não é apropriado para a actividade destas enzimas. Esta mesma autólise não ocorreu para valores de PH (5,0), para as condições de ensaio usadas. No entanto, para as restantes espécies bacterianas não foi observada autólise nessas mesmas condições. A PH (5,0), a única espécie bacteriana que mostrou sinais de autólise celular foi o *E. faecium*, quer em meio de cultura, quer em tampão, quer espontânea em tampão de fosfatos, quer induzida pela nisina, mas bastante lenta e progressiva.

Os dados da lise em diferentes tampões e a diferentes valores de PH, mostram que as características do meio onde se exprime a lise influenciam o seu resultado, uma vez que não se trata de respostas diferentes por diferente estrutura ou composição de membrana, já que as células obtidas de culturas exponenciais em meio de TSB PH (7,3) é que são suspensas em tampão de diferente PH.

De um modo geral, podemos dizer que as autolisinas implicadas na autólise das culturas exponenciais bacterianas estudadas são mais activas a um PH próximo de 6,5 (PH do meio de TSB (7,3) no momento da adição da nisina), que a PH (4,5 a 5,0) (PH do meio de TSB (5,0) no momento da adição da nisina).

Os resultados obtidos em culturas na fase exponencial ou na fase estacionária de crescimento, das diferentes espécies bacterianas, mostraram-nos que os efeitos, quer bacteriolíticos quer bactericidas, são bastante mais acentuados quando a nisina é adicionada a culturas em crescimento activo, comparativamente com culturas em condições idênticas mas no início da fase estacionária. Não foi observada descida da densidade óptica nem lise da maioria das células por microscopia electrónica, nas culturas tratadas na fase estacionária. Esta conclusão foi igualmente referida para outras condições de autólise quer espontânea, quer induzida por agentes exógenos, quer mesmo para a nisina em *Clostridium* (Carvalho, 1987; Ramseier, 1960; Rogers e Wright, 1986). O facto de nas células metabolicamente activas existirem maiores alterações ao nível da membrana citoplasmática, o que se deduz pelo maior poder bactericida, poderá resultar num maior descontrolo da regulação das enzimas do sistema autolítico do que nas células da fase estacionária.

A quantidade e a actividade de certas autolisinas foi verificada como máxima na fase exponencial de crescimento e decrescente com o envelhecimento da cultura estando este fenómeno de acordo com o seu envolvimento no crescimento e na divisão celulares, podendo justificar o seu efeito principalmente junto das porções mais recentemente formadas, ou seja, mais precisamente junto dos septos de divisão, de *E. faecium* (Joseph e Shockman, 1976; Shockman e col., 1958). A ausência de crescimento e divisão celular associada a uma baixa actividade enzimática das células, na fase estacionária, podem contribuir para este resultado.

A falha do gradiente electroquímico nas culturas estacionárias poderia igualmente justificar uma menor actividade nesta situação. A possibilidade de o PH estar implicado na ausência de descida da absorvância não é evidente, uma vez que nas culturas na fase estacionária, obtidas em meio com PH inicial de (7,3) não se verifica um PH inferior a (6,0), com excepção para *E. faecium*.

De forma a avaliar, *in vitro*, a participação das enzimas do sistema autolítico endógeno, no processo de lise celular, vários estudos são possíveis, nomeadamente a utilização de mutantes deficientes nas enzimas autolíticas; o tratamento das culturas bacterianas em crescimento exponencial com antibióticos inibidores da síntese proteica; a inibição da actividade autolítica presente.

Neste trabalho, tentamos mostrar o efeito de um composto inibidor das autolisinas na lise celular induzida pela nisina. A N- bromossuccinimida (NBS) é um composto capaz de inibir a actividade das autolisinas de bactérias Gram positivo e negativo (Parente e Silva, 1984), por estabelecimento de ligações à enzima, através de alguns dos seus aminoácidos como a histidina, triptofano e tirosina (Ramachandran e Witkop, 1967), inibindo a sua acção.

O tratamento com NBS, como inibidor das enzimas autolíticas, não é contudo isento de efeitos para a célula bacteriana. De facto, ao verificarmos que a adição isolada de NBS (2mM) às diferentes culturas exponenciais resultou numa estabilização dos valores da Absorvância, que não ocorreu qualquer crescimento nas culturas em TSB durante o tempo de tratamento e, efectuado um isolamento a partir destas culturas não verificarmos crescimento, levou-nos a concluir que as células tratadas com este composto são por ele profundamente afectadas. Os dados da microscopia óptica indicaram-nos que, de facto, as células mantêm a sua morfologia sensivelmente intacta, uma reacção positiva ou negativa ao Gram mantida durante toda a incubação, não sendo observados sinais de lise celular com o tempo e observado um aumento, se bem que ligeiro, do volume celular. As culturas celulares em TSB PH inicial (7,3) ou suspensões bacterianas em tampão (8,0), as quais revelam sinais espectrofotométricos e de microscopia óptica indicativos de ocorrência de lise induzida pela nisina, mostraram um efeito inibidor dessa bacteriólise quando tratadas por 10 minutos com NBS (2mM) ou (5mM), antes da adição de diferentes concentrações de nisina. Os resultados obtidos nesta situação foram sobreponíveis aos obtidos pelo tratamento com NBS isolada. Assim, a nisina é incapaz de actuar sobre uma célula

altamente danificada, provavelmente por precipitação química das proteinas em geral, incluindo as enzimas autolíticas. A NBS mostrou inibir igualmente a autólise espontânea que foi observada nas células de *B. cereus* suspensas em tampão a PH (8,0).

Sendo a nisina um polipeptídeo que contém na sua molécula histidina, colocou-se o problema de a NBS se ligar igualmente à nisina inviabilizando a sua acção. Com o objectivo de verificar se a lise foi inibida devido à inactivação da nisina em suspensão com a NBS, ou das autolisinas, efectuamos um estudo paralelo em que a nisina foi adicionada a células lavadas com tampão após o tratamento com NBS. Uma vez que os resultados se mostraram perfeitamente equivalentes, levaram-nos a concluir que esta inibição não foi devida à inactivação da nisina.

A microscopia electrónica de células de *B. subtilis* e *E. faecium*, tratadas com NBS (1-2 mM/10 minutos), revelou alterações ultraestruturais características, quer ao nível do citoplasma quer do invólucro, destacando-se uma mudança de perfil membranar ou a sua dissolução, a desorganização dos ribossomas, a presença de zonas electrodensas, a manutenção de uma parede celular sem sinais de degradação e a ausência de lise (Carvalho, 1987). Sinais de plasmólise foram observados em células de *Pseudomonas* (Cabral, 1990). Embora não tenham sido realizados por nós estudos de microscopia electrónica, será contudo de prever que o mesmo fenómeno ocorra para os modelos bacterianos ensaiados apoiando os dados que obtivemos por micoscopia óptica e espectrofotometria. Esta precipitação é, aliás, uma característica a favor da subida de Absorvância verificada quando da adição de NBS às suspensões, particularmente as obtidas em Tampão Tris-HCl 0,05M a PH (5,0). A preservação da parede celular justificará o aparecimento da maioria das células apresentando uma reacção positiva ao Gram.

A observação de que a lise bacteriana é inferior e mais lenta quando usada a concentração de nisina de 1000 UI/ml, em relação à obtida para a concentração de 25 e 100 UI/ml, poderia resultar de um fenómeno idêntico ao que foi descrito para a dodina (acetato de n-dodecil guanidina) e o CTAB (brometo de cetil trimetil amónio), em diferentes espécies bacterianas, em que se verificou que uma elevada concentração destes compostos anfipáticos de natureza catiónica não mostrava efeito lítico sobre as estirpes ensaiadas (Cabral, 1992; Parente, 1984). Este efeito poderia resultar de uma desnaturação e modificação do estado físico das proteínas

citoplasmáticas, com uma possível coagulação do citoplasma, mesmo mantendo funcionais as autolisinas, e para concentrações ainda superiores poderia resultar mesmo numa inibição ou destruição progressiva dessas enzimas (Cabral, 1992; Parente, 1984). Este fenómeno foi contudo observado por nós, exclusivamente para *B. cereus*, que se mostrou mais sensível (em intensidade e velocidade) ao efeito lítico da nisina. Para *Staphylococcus*, a activação das autolisinas por adição de baixas concentrações de policatiões e a sua inibição por altas concentrações, em particular dos mais carregados positivamente, foi sugerida como resultado de um possível impedimento estérico quando a parede celular se encontre completamente coberta de peptídeo (Bierbaum e Sahl, 1991). Jack e col. (1995) concluem ainda que concentrações muito elevadas de grandes peptídeos, em relação com a concentração de parede celular, poderão converter a activação das autolisinas em inibição, possivelmente por interferência com o acesso da enzima ao substrato.

Os nossos resultados, e tal como Giesbrecht e col. (1976), demonstram que a indução da lise bacteriana é um processo complexo, o qual dependerá da cooperação de fenómenos bioquímicos e estruturais. A participação do sistema autolítico endógeno, na indução da lise por nisina, parece contudo fazer parte desse processo, para as diferentes espécies bacterianas. São motivo de tal afirmação o facto de se observar a sua inibição em presença de NBS; a sua activação ser induzida para valores de PH mais elevados (TSB PH 7,3 e tampão PH 8,0), sendo igualmente a estes valores de PH que normalmente se observa maior intensidade de autólise; a sua activação ser induzida unicamente para as células tratadas na sua fase logarítmica de crescimento; a observação de alterações na parede principalmente junto do septo de divisão, para *E. faecium* e *L. monocytogenes*. O aparecimento de formas bacilares muito longas, verificada em *Bacillus* a PH (5,0), poderá igualmente resultar de uma inibição de enzimas autolíticas implicadas no processo de separação das células após a sua divisão.

No entanto, outros autores apontam a hipótese de a lise ocorrer como uma consequência directa dos danos membranares e da perda da energia membranar, uma vez que, afectado o metabolismo celular, qualquer rompimento do peptidoglicano pelas autolisinas deixa de poder ser reparado (Bierbaum e Sahl, 1991; Reisinger e col., 1980). Por outro lado, a abertura de poros na membrana poderá levar a um influxo de água, quando em meio com baixa força iónica, com o

consequente aumento de pressão osmótica, o qual pode, na presença de uma parede celular fragilizada, levar ao rebentamento da célula. Assim, quer a actividade de ruptura da membrana citoplasmática, quer a ligação do peptídeo aos ácidos teicóicos ou teicurónicos da parede celular parecem necessários para a efectiva indução da autólise (Bierbaum e Sahl, 1991).

Efeito da nisina sobre *E. coli*

A insensibilidade que verificamos em culturas exponenciais de *E. coli* tratadas com 1000 UI/ml de nisina, associada à presença de uma membrana exterior no invólucro dos Gram negativos, foi avaliada por estudo turbidimétrico e confirmada por estudos de efluxo de potássio e de actividade respiratória, tendo-se verificado um valor constante de potássio após a adição da nisina e uma inibição da actividade respiratória inferior a 50%, apenas para algumas das situações estudadas. Mutantes rugosos, apresentando uma camada de LPS deficiente no antigénio O e também em resíduos açucarados do core oligossacarídico (Hancock, 1984; Nikaido e Vaara, 1987; Vaara, 1992), têm sido úteis no estudo do papel destas moléculas na funcionalidade desta estrutura. Um baixo teor de proteínas pode estar associado a esta deficiência, por falta dos locais de interacção altamente carregados do LPS, podendo esta perda de proteínas ser compensada, nestas variantes, por fosfolípidos vindos do folheto interno da membrana exterior ou da membrana citoplasmática (Jones e Osborn, 1977), podendo a membrana exterior de um variante rugoso apresentar-se como uma bicamada fosfolipídica semelhante à membrana citoplasmática. O mecanismo pelo qual a permeabilidade da membrana exterior é aumentada nestas estirpes não é bem conhecido, tendo Nikaido e Vaara (1987) sugerido que a combinação das interacções do LPS enfraquecidas com o aumento do conteúdo de fosfolípidos no seu folheto externo, fosse por isso responsável. Stevens e col. (1992), estudaram o efeito da nisina numa estirpe rugosa de *Salmonella tiphymurium* LT2 e associaram o aumento de sensibilidade ao core oligossacarídico do LPS, o qual representará um importante papel na resistência à nisina, verificada em espécies bacterianas Gram negativo. Os mutantes apresentam uma resposta variável conforme o grau e o tipo de mutação. Apenas uma estirpe profundamente rugosa foi afectada pela nisina, sendo o grau de inibição dependente da concentração e das condições. O nosso estudo, em *E. coli* rugosa ATCC 4157, revelou que a

nisina isoladamente e na concentração de 1000 UI/ml não afectou significativamente o seu crescimento, em comparação com a estirpe selvagem ATCC 25922. A possibilidade de se tratar de uma estirpe apenas ligeiramente rugosa (colónias lisas e rugosas), cujo grau de alteração do LPS não fosse suficiente para manifestar inibição quando do tratamento, ou a utilização de uma concentração de nisina insuficiente, poderiam justificar esta diferença. De facto, a estirpe profundamente rugosa de *Salmonella*, mostrou inibição pela nisina para uma concentração dupla da por nós usada. Contudo, as concentrações que mostram algum efeito são várias vezes superiores às necessárias para obter um efeito de muito maior intensidade em espécies Gram positivo. Nestes variantes, que apresentam uma membrana exterior com uma estrutura molecular próxima da membrana citoplasmática, a necessidade de usar concentrações elevadas de nisina para obter efeito inibidor no crescimento e lise celular, talvez se possa dever a uma composição fosfolipídica menos adaptada à interacção da nisina, como um teor inferior em fosfolípidos acídicos.

A manutenção da integridade dos LPS, contendo muitos grupos aniónicos, é feita à custa de catiões divalentes como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} (Leive, 1974), diminuindo as repulsões electrostáticas e aumentando a associação LPS-LPS. Estas fortes associações entre as moléculas de LPS podem estar na base da exclusão de grandes moléculas hidrofílicas e de muitas moléculas hidrofóbicas e anfipáticas, e a remoção dos catiões estabilizadores, quer por adição de um agente quelante, quer por competição para o local por policatiões, resulta num aumento da permeabilidade (Hancock, 1984; Nikaido e Vaara, 1987). O aumento de permeabilidade à nisina, com diminuição do número de células viáveis, foi mostrado em células de *E. coli* apresentando uma membrana exterior alterada por choque osmótico (Kordel e Sahl, 1986; Kordel e col., 1989). O tratamento de células de diferentes espécies Gram negativo com um agente quelante como o EDTA, capaz de se ligar aos catiões indispensáveis à integridade do LPS, resultou em células susceptíveis à nisina. Este efeito resulta da perda parcial do LPS, 30 a 40% e de pequenas quantidades de proteínas e fosfolípidos, com um aumento da permeabilidade, o que facilita a acção bactericida da nisina sobre a membrana citoplasmática (Nikaido e Vaara, 1987; Stevens e col., 1991). Resultados semelhantes aos obtidos por Stevens e col. (1991), relativamente a células de *E. coli* e *Salmonella* tratadas com EDTA e nisina, foram por nós

encontrados para a estirpe de *E. coli* 25922 e *E. coli* R4157. De facto, 1000 UI/ml de nisina e 5 ou 10 mM de EDTA, adicionados às culturas isoladamente, não tiveram qualquer efeito significativo sobre a viabilidade celular ou a densidade óptica. No entanto, culturas tratadas com EDTA antes da adição da nisina mostraram sinais de inibição de crescimento e de lise celular. Estes efeitos, embora se tenham mostrado independentes da concentração de EDTA, revelaram-se mais intensos quando este tratamento antecedeu em 60 minutos a adição da nisina. Se para a estirpe selvagem o efeito se reduziu a uma estabilização dos valores da Absorvância e do número de células viáveis, para a estirpe rugosa verificamos maior grau de morte e lise celular. Estes resultados levam-nos a pensar que as alterações ocorridas pela adição do EDTA na estirpe selvagem foram menores que na estirpe rugosa. A alteração pré-existente do LPS na estirpe rugosa terá tornado a célula mais sensível aos efeitos do EDTA.

❖

Actuando a nisina sobre os diferentes modelos bacterianos escolhidos, os quais se apresentam como potencialmente nocivos na indústria alimentar e saúde pública, de uma forma dependente da concentração, do estado fisiológico da célula, e do PH do meio, será necessário estabelecer muito bem as regras da sua utilização como bioconservante e adaptá-las a cada sistema alimentar, de forma a obter os efeitos desejáveis e, particularmente, o de segurança na utilização dos alimentos. A natureza dos alimentos é também uma forte condicionante na sua utilização, não sendo possível generalizar sobre a sua eficácia para produtos alimentares de características muito diversas, sendo igualmente importante considerar a sua temperatura de conservação.

Se considerarmos que estas bacteriocinas, usadas como conservantes naturais, dependem de energia para a sua acção inibidora, segundo a teoria já referida, podemos concluir da possibilidade da sua total eficácia sobre agentes patogénicos de origem alimentar nos quais são verificados óptimos níveis de actividade metabólica durante o seu desenvolvimento no alimento. No entanto, e se nos basearmos nesta dependência da energia, a sua aplicação a superfícies das áreas de fabrico para a sua higienização poderá não resultar na eliminação das formas vegetativas de bactérias sensíveis, mas apenas de esporos aí presentes. Sendo o mecanismo de destruição de esporos diferente e não influenciado pela energia da membrana, a nisina poderia actuar sobre estas estruturas de resistência resolvendo um dos grandes problemas de

contaminação, particularmente no processamento e posterior armazenamento, mas deixaria viáveis células vegetativas. Nestas situações parece preferível a utilização de bacteriocinas cuja acção não dependa do estado energético da célula e capazes de destruir em simulâneo as formas vegetativas e esporuladas.

O PH ácido ao qual são habitualmente aplicadas as bacteriocinas constituí também um factor a favor de um estado energético adequado da membrana citoplasmática. A nisina encontra-se sempre associada a alimentos com características ácidas. O facto de apresentar uma estabilidade e solubilidade superior para PH ácido podem ser disso o motivo. O crescimento mais reduzido de muitas espécies bacterianas a baixo PH pode igualmente participar neste efeito. A um PH mais próximo da neutralidade a bactéria pode apresentar um metabolismo mais favorável, correspondendo a um potencial de membrana mais elevado. O PH ácido, sendo associado a uma diminuição no teor de fosfolípidos aniónicos da superfície celular, seria responsável por uma menor ligação de moléculas catiónicas. A carga deste policatião é tanto mais elevada quanto mais baixo o PH, favorecendo assim a sua ligação. Embora tendo observado um efeito bactericida para as culturas quer a PH inicial de (7,3) quer (5,0), verificamos a ocorrência de um efeito bacteriólito para as culturas a PH mais elevado e, pelo contrário, um efeito mais intenso de efluxo de potássio e de inibição da actividade respiratória nas culturas a PH mais baixo. Parece-nos contudo que a nisina é eficáz para as culturas a PH próximo da neutralidade. Esta possibilidade de aplicação para sistemas alimentares com uma gama de PH compreendida entre 6 e 8, poderia ser muito útil, e principalmente para variantes mais resistentes a baixo PH, uma vez que muitos microrganismos se desenvolvem abundantemente nestas condições. Considerando nestas condições a possibilidade de um recrescimento de alguns microrganismos, e particularmente para baixas concentrações de nisina, justifica-se que as doses sejam criteriosamente adaptadas.

Stevens e col. (1991), referem que a nisina sendo bactericida contra *Salmonella* e outras espécies bacterianas Gram negativo, quando usada juntamente com o EDTA, poderia ser aplicada no controlo destes microrganismos, em produtos alimentares. Mas, verificamos que mesmo nestas condições serão necessárias concentrações bastante elevadas para obter um efeito bastante mais reduzido e lento, em relação a condições idênticas para espécies Gram positivo.

RESUMO e CONCLUSÕES

- A nisina ao apresentar um efeito bactericida muito rápido, com uma diminuição drástica da viabilidade celular em cinco minutos, levou-nos a concluir que, para os modelos bacterianos escolhidos, o seu efeito se exerce de uma forma directa sobre os alvos de acção, e que a afinidade da sua molécula catiónica para a célula parece depender da carga global do seu invólucro e não da presença de receptores específicos. Este mecanismo geral de ligação da nisina à superfície celular, para o atingimento dos alvos de acção, pode justificar o seu efeito sobre bactérias Gram positivo de tão diferentes géneros e espécies (*Bacillus cereus* e *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*). O efeito da nisina sobre protoplastos, obtidos destas diferentes estirpes bacterianas, é igualmente a favor de uma acção directa da nisina, sem ocorrência de adsorção a receptores específicos na parede celular.

- O efeito da nisina sobre as diferentes estirpes, e para os parâmetros ensaiados, mostrou-se dependente da sua concentração, da estirpe bacteriana, do PH do meio ou tampão e do estado fisiológico das células no momento da sua adição.

- Relativamente ao efeito sobre a viabilidade celular pudemos concluir que:
- De um modo geral, para todas as espécies estudadas, a um aumento da concentração de nisina correspondeu uma maior e mais rápida redução do número de células viáveis.
- *B. cereus* e *E. faecium*, foram as espécies que revelaram maior sensibilidade para uma concentração de nisina de 25 UI/ml e que para *B. subtilis* e, particularmente, *L. monocytogenes* foi necessária uma concentração mais elevada para obter um efeito de idêntica magnitude.
- Para estudar o efeito do PH na acção da nisina, e porque a nisina é fundamentalmente aconselhada para aplicação a alimentos de características ácidas, realizamos culturas em meio de TSB a PH inicial de (7,3) e de (5,0). A cinética de morte não se mostrou muito diferente para as duas situações.
- Quando comparamos o efeito bactericida da nisina sobre culturas em diferentes fases de crescimento, verificamos que o efeito de redução do número de CFU/ml se mostrou memos intenso, mais progressivo e mais dependente da concentração de nisina, quando a cultura foi tratada na sua fase estacionária de crescimento, e em comparação com a fase exponencial.

- Em todas as situações foi verificado um recrescimento posterior de células bacterianas, o que poderá significar que as células que perderam a capacidade de crescimento, mas não lisaram, poderão recolocar em funcionamento sistemas metabólicos afectados e, assim, restabelecer-se dos efeitos da nisina, recuperando a viabilidade. Este efeito foi verificado para as concentrações de 25 e 100 UI/ml, e ausente para 1000 UI/ml de nisina, nas 24 horas que se seguiram ao tratamento. Mais intenso para as culturas exponenciais a PH inicial (7,3), foi iniciado em média nos 60 a 180 minutos após o tratamento, dependendo da concentração e da estirpe bacteriana. O tratamento de culturas exponenciais a PH inicial (5,0), não resultou em qualquer aumento da viabilidade celular, nas horas que se seguiram, mas ao fim de 24 horas o número de CFU/ml aumentou ligeiramente, sem efeito sobre a densidade óptica.
- A possibidade de uma adaptação das células à presença deste lantibiótico foi avaliada usando o *B. cereus* sucessivamente isolado de culturas com 24 horas de incubação tratadas na sua fase exponencial com 100 UI/ml de nisina. Este estudo turbidimétrico revelou que a sensibilidade à adição de 100 UI/ml vai diminuindo progressivamente e que no final da terceira passagem já não é verificado qualquer efeito da nisina sobre esta estirpe. Esta mesma estirpe cresce indifente à presença de 50 UI/ml de nisina no meio, no início da cultura, sendo sobreponíveis as curvas de crescimento da estirpe selvagem e da "adaptada".
- As alterações ocorridas nas células, e que justificam a descida de viabilidade, poderão ser consideradas diferentes ou de diferente intensidade quando se tratam culturas a diferente valor de PH ou com diferentes concentrações de nisina.

- O estudo sobre os diferentes parâmetros apresentados foi realizado com o objectivo de esclarecer qual o mecanismo pelo qual a nisina mata as células, tendo em conta a pressuposta acção sobre a membrana citoplasmática:
- O efeito de uma concentração de nisina de 25 a 100 UI/ml sobre a parede celular mostrou-se como secundário, tendo em conta que para estas concentrações era observada uma inibição do número de células viáveis em cinco minutos, e que para o mesmo tempo e concentração a densidade óptica ainda se mantinha praticamente constante e, observadas do ponto de vista ultraestrutural, as paredes celulares ainda não apresentavam sinais de destruição, embora as membranas citoplasmáticas apresentassem pontos de dissolução. O efeito sobre a parede celular parece ser posterior ao efeito responsável pela inibição do crescimento bacteriano ou morte da célula. A integridade desta parede estará contudo comprometida justificando a

reacção negativa à coloração de Gram que estas células apresentam. Esta fragilidade da parede celular é particularmente observada para as células em cultura exponencial em meio a PH inicial de (5,0), situação para a qual é observada descida acentuada da viabilidade acompahada de uma estabilização dos valores da Absorvância, e da presença de células de morfologia sensivelmente intacta, sem ocorrência de sinais de lise, mas que por ultraestrutura revelam a parede com locais danificados e de uma espessura mais reduzida.

- Ao contrário da parede celular, a membrana citoplasmática mostrou-se como o alvo primário da acção de inibição e morte pela nisina. Do ponto de vista ultraestrutural, avaliamos o efeito da nisina sobre a membrana citoplasmática das diferentes estirpes bacterianas. Embora a intensidade desse efeito se tenha mostrado dependente da estirpe, da concentração de nisina, do PH da cultura e da fase de crescimento em que ocorreu o tratamento, foi por nós verificado que o perfil assimétrico da membrana, normalmente apresentado pelos diferentes modelos bacterianos escolhidos, foi imediatamente modificado após a adição de nisina, mesmo para baixas concentrações. As alterações foram mais intensas e precoces para *B. cereus*. Estes resultados confirmam que a nisina altera muito precocemente esta estrutura de importância vital para a viabilidade celular.
- Acompanhando esta precoce alteração do perfil membranar registamos uma rápida alteração da permeabilidade selectiva naturalmente apresentada por esta estrutura do invólucro celular. O estudo da cinética de efluxo de potássio por tratamento de suspensões celulares com nisina, e utilizando um método potenciométrico, permitiu-nos observar que o potássio que deixa a célula o faz de uma forma quase imediata, e ao fim de 30 segundos uma grande % é encontrada fora da célula, e aos dois minutos quase todo o potássio é extracelular, segundo um fenómeno de "tudo-ou-nada". A resposta foi variável com as estirpes e a concentração, tendo sido observado um efeito mais intenso para o tratamento de suspensões de células cultivadas a PH inicial de (5,0), particularmente para *B. subtilis*.
- O efeito directo e rápido sobre a membrana citoplasmática foi igualmente confirmado ao verificarmos que protoplastos, das diferentes espécies bacterianas, lisaram muito rapidamente, amostras colhidas com 5 minutos de tratamento, e para concentrações baixas de nisina, 25 UI/ml. O alvo primário da acção da nisina mostrou idêntica sensibilidade para todas as estirpes, o mesmo tempo de actuação e a mesma concentração do lantibiótico. As diferenças observadas em relação às células intactas poderia justificar-se por uma diferente acessibilidade à membrana ou uma diferente afinidade da parede celular para a nisina.

Podemos assim dizer que as alterações responsáveis pela morte da célula se exercem ao nível da membrana, independentemente da parede celular, mas que esta altera a velocidade com que o efeito é atingido e influência a concentração de nisina necessária para esse efeito.

- A acção da nisina foi avaliada sobre a actividade enzimática de enzimas localizadas na membrana citoplasmática. Uma forte inibição da actividade respiratória foi verificada quando células bacterianas de *B. cereus* foram tratadas com concentrações tão baixas como 5 UI/ml de nisina. *B. cereus* foi contudo a espécie que se mostrou mais sensível, o que aliás tinha sido verificado em relação aos restantes parâmetros. *B. subtilis* foi igualmente inibido mas para concentrações mais elevadas e com menor intensidade, embora tenha mostrado uma sensibilidade sensivelmente igual à de *B. cereus* quando as células cresceram a PH inicial (5,0). Estas observações levam-nos a concluir que concentrações inferiores às que causam a morte celular são potentes inibidores da actividade respiratória da bactéria e que este fenómeno, juntamente com a deplecção das células em potássio, está provavelmente envolvido na alteração do seu metabolismo e na inibição do seu crescimento. Contudo, este mecanismo de inibição da actividade metabólica, por redução da actividade respiratória, não poderá justificar o efeito verificado para a nisina sobre células de bactérias anaeróbias obrigatórias. A actividade enzimática da desidrogenase succínica foi avaliada nas membranas bacterianas isoladas, não tendo sido observado qualquer efeito inibitório significativo quando do seu tratamento com nisina, mesmo para concentrações tão elevadas como 1000 UI/ml.

- Para além do estudo efectuado sobre a morte celular, inibição do crescimento e parâmetros com ela associados, realizamos igualmente um estudo sobre os efeitos autolíticos da nisina para as diferentes espécies bacterianas e as diferentes condições de PH e fase de crescimento bacteriano.
- Uma redução drástica da densidade óptica das culturas, em meio de PH inicial (7,3) e na fase exponencial, ocorreu, em média, cerca de 15 minutos após a adição da nisina. Este tempo, necessário para tornar visível a lise celular, indica que este não será o mecanismo primário da acção da nisina mas que poderá ocorrer em consequência das modificações celulares responsáveis pela morte. Este fenómeno de lise celular, com redução da densidade óptica da cultura e sinais morfológicos de lise por microscopia óptica ou electrónica, não foi observado quando as culturas tratadas se apresentavam na fase estacionária, ou foram obtidas em meio com PH inicial de (5,0). Uma precipitação proteíca dos componentes

celulares poderia justificar a inibição do crescimento e a manutenção da turvação, mantendo a célula o seu conteúdo e a sua forma pouco alterados, embora a sua parede celular e membrana citoplasmática apresentem sinais evidentes de alteração. Perante estes resultados podemos concluir que o mecanismo de inibição bacteriana da nisina será diferente para bactérias com desenvolvimento a PH (5,0) ou (7,3).

- Os resultados de lise bacteriana obtidos em diferentes tampões e a diferentes valores de PH mostraram-nos que, para além das diferenças em relação à composição molecular das células cultivadas a diferentes valores de PH ou em diferentes fases de crescimento, também as características do meio no qual se exprime, influenciam o seu resultado.
- Com o objectivo de estudarmos a participação das enzimas do sistema autolítico endógeno neste fenómeno, como consequência de possíveis alterações dos processos responsáveis pela sua regulação, estudamos o efeito da NBS, como inibidor da sua actividade. Verificamos que uma adição de (2mM) deste composto, 10 minutos antes da adição de diferentes concentrações de nisina capazes de provocarem a lise celular, levou a uma estabilização dos valores da Absorvância e à presença de células com uma morfologia sensivelmente intacta e uma reacção positiva ao Gram, mas que não apresentam viabilidade. A NBS mostrou assim inibir a actividade bacteriolítica da nisina e ainda a autólise espontânea que foi observada para células de *B. cereus* suspensas em tampão a PH (8,0). A inibição pela NBS, uma maior activação do sistema autolítico verificado para as culturas a PH inicial (7,3) ou suspensões a PH (8,0), a activação induzida em células na sua fase logarítmica de crescimento, a observação de alterações de parede ao nível do septo de divisão (*E. faecium* e *L. monocytogenes*) e o aparecimento de formas bacilares muito longas, são dados a favor de uma participação destas enzimas na lise celular induzida pela nisina.

- Sendo a composição da membrana citoplasmática de elevada importância no funcionamento da célula, e actuando a nisina primariamente a este nível, será muito importante conhecer bem a sua composição para estabelecer uma relação com a estrutura da molécula do lantibiótico, de modo a compreender, do ponto de vista molecular, a interacção estabelecida entre células bacterianas e estes compostos, e responsável pelo seu mecanismo de acção. Após termos observado diferentes efeitos sobre esta estrutura e conhecendo o papel desempenhado pelos fosfolípidos membranares em muitas das suas funções, propusemo-nos estudar a composição da membrana das diferentes espécies estudadas e para as diferentes

condições de PH e de fase de crescimento. O conhecimento das proporções relativas dos diferentes fosfolípidos acídicos poderia ajudar na interpretação dos efeitos verificados sobre esta estrutura. Esta parte do projecto não foi contudo ainda concretizada, embora tenha sido inicializada para a escolha dos métodos mais adaptados à extracção, quantificação e identificação dos diferente componentes.

- Experiências realizadas com uma estirpe de *E. coli* confirmaram uma insensibilidade descrita para as espécies bacterianas Gram negativo. Uma concentração de nisina de 1000 UI/ml não afectou o seu normal crescimento nem alterou a permeabilidade da sua membrana citoplasmática ao potássio. Com a finalidade de avaliar a participação da membrana exterior nesta resistência ao lantibiótico, e porque a sua utilização pode ser útil como bioconservante activo não só contra Gram positivos mas também Gram negativos num mesmo produto alimentar, foram efectuados alguns ensaios em células apresentando a integridade desta estrutura comprometida.
- Uma estirpe rugosa ATCC 4157, apresentando o seu LPS alterado, foi usada e efeitos de inibição pela nisina não foram evidentes. É contudo possível que o grau de mutação deste variante rugoso não seja suficiente para que as alterações da permeabilidade desta membrana exterior permitam a penetração e a acção da nisina junto da membrana citoplasmática.
- O tratamento com EDTA de células de *E. coli* selvagem e rugosa, antes da adição da nisina, resultou numa inibição do crescimento e da lise celular. A estirpe rugosa tratada com EDTA mostrou-se mais sensível que a estirpe selvagem o que pode resultar do facto de a membrana apresentar um LPS alterado e por isso mais sensível aos efeitos do EDTA.

BIBLIOGRAFIA

Abdul-Raouf, U. M., Beuchat, L. R. e Ammar, M. S. (1993). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. **Appl. Environ. Microbiol., 59:** 2364-2368.

Abee, T., Gao, F. H. e Konings, W. N. (1991). The mechanism of action of the lantibiotic nisin in artificial membranes, pg. 373-385. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Abee, T., Krockel, L. e Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. Food Microbiol., 28:** 169-185.

Abee, T., Rombouts, F. M., Hugenholtz, J., Guihard, G. e Letellier, L. (1994). Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* scott A grown at high and low temperatures. **Appl. Environ. Microbiol., 60:** 1962-1968.

Aguirre, M. e Collins, M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. **J. Appl. Bacteriol., 75:** 95-107.

Ahmed, A. A. -H., Moustafa, M. K. e Marth, E. H. (1983). Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. **J. Food Prot., 46:** 126-128.

Allwood, M. C. e Hugo, W. B. (1971). The leakage of cations and amino acids from *Staphylococcus aureus* exposed to moist heat, phenol and dinitrophenol. **J. Appl. Bacteriol., 34:** 369-375.

Allwood, M. C. e Russell, A. D. (1968). Thermally induced ribonucleic acid degradation and leakage of substances from the metabolic pool in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol., 95:** 345-349.

Andersson, A., Rönner, U. e Granum, P. E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **Int. J. Food Microbiol., 28:** 145-155.

Anonymous (1959). Food standards committee report on preservatives in food, pg. 49. HMSO, London. Citado por Hurst (1981).

Barsukov, L. I., Kulilov, V. I. e Bergelson, L. D. (1976). A lipid transfer protein as a tool in the study of membrane structure. Inside-outside distribution of the phospholipids in the protoplasmic membrane of *Micrococcus lysodeikticus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun., 7:** 704-711.

Batish, V. K., Chander, H. e Ranganathan, B. (1985). Factors affecting enterotoxin production by thermonuclease positive *Streptococcus faecium* IF-100 isolated from infant food. **J. Food Sci., 50:** 1513-1514, 1521.

Becker, H., Schaller, G., Von Wiese, W. e Terplan, G. (1994). *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **Int. J. Food Microbiol., 23:** 1-15.

Beecher, D. J. e Wong, A. C. L. (1994). Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassays kits. **Appl. Environ. Microbiol., 60:** 4614-4616.

Benkerroum, N. e Sandine, W. E. (1988). Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. **J. Dairy Sci., 71:** 3237-3245.

Benz, R., Jung, G. e Sahl, H. -G. (1991). Mechanism of channel-formation by lantibiotics in black lipid membranes, pg. 359-372. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Berridge, N. J., Newton, G. G. F. e Abraham, E. P. (1952). Purification and nature of the antibiotic nisin. **Biochem. J., 52:** 529-535.

Beveridge, T. J. (1981). Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. **Int. Rev. Cytol., 72:** 229-317.

Beveridge, T. J. (1990). Mechanism of Gram variability in select bacteria. **J. Bacteriol., 172:** 1609-1620.

Beveridge, T. J. e Murray, R. G. E. (1980). Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol., 141:** 876-887.

Bierbaum, G. e Sahl, H. -G. (1985). Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. **Arch. Microbiol., 141:** 249-254.

Bierbaum, G. e Sahl, H. -G. (1987). Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. **J. Bacteriol., 169:** 5452-5458.

Bierbaum, G. e Sahl, H. -G. (1991). Induction of autolysis of *Staphylococcus simulans* 22 by pep5 and nisin and influence of the cationic peptides on the activity of the autolytic enzymes, pg. 386-396. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Bierbaum, G. e Sahl, H. -G. (1993). Lantibiotics-unusually modified bacteriocin-like peptides from gram-positive bacteria. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A, 278:** 1-22. Citado por Sahl e col. (1995).

Bishop, D. J., Op den Kamp, J. A. F. e Van Deenen, L. L. M. (1977). The distribution of lipids in the protoplast membranes of *Bacillus subtilis*. **Eur. J. Biochem., 80:** 381-391.

Bower, C. K., McGuire, J. e Daeschel, M. A. (1995). Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. **Appl. Environ. Microbiol., 61:** 992-997.

Brackett, R. E. (1988). Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technol., 42:** 162-164.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem., 72:** 248-254.

Broadbent, J. R., Chou, Y. C., Gillies, K. e Kondo, J. K. (1989). Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. **J. Dairy Sci., 72:** 3342-3345.

Brown, W. C., Fraser, D. K. e Young, F. E. (1970). Problems in purification of a *Bacillus subtilis* autolytic enzyme caused by association with teichoic acid. **Biochim. Biophys. Acta, 198:** 308-315.

Bruno, M. E. C. e Montville, T. J. (1993). Common mechanistic of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol., 59:** 3003-3010.

Bruno, M. E. C., Kaiser, A. e Montville, T. J. (1992). Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol., 58:** 2255-2259.

Buchman, G. W., Banerjee, S. e Hansen, J. N. (1988). Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. **J. Biol. Chem., 263:** 16260-16266.

Cabral, J. P. S. (1990). Plasmolysis induced by very low concentrations of Cu^{2+} in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271, and its relation with cation fluxes. **J. Gen. Microbiol., 136:** 2481-2487.

Cabral, J. P. S. (1991). The antibacterial action of cupric ions in *Pseudomonas syringae*. **FEMS Microbiol., Lett., 79:** 303-308.

Cabral, J. P. S. (1992). Mode of antibacterial action of dodine (dodecylguanidine monoacetate) in *Pseudomonas syringae*. **Can. J. Microbiol., 38:** 115-123.

Campbell, L. L. e Sniff, E. E. (1959). Effect of subtilin and nisin on the spores of *Bacillus coagulans*. **J. Bacteriol., 77:** 766-770.

Campbell, L. L., Sniff, E. E. e O'Brien, R. T. (1959). Subtilin and nisin as additives that lower the heat-process requirements of canned foods. **Food Technol., 13:** 462-464.

Carminati, D., Giraffa, G. e Bossi, M. G. (1989). Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot., 52:** 614-617.

Carter, A. O., Borczyk, A. A., Carlson, J. A. K., Harvey, B., Hockin, J. C., karmali, M. A., Krishnan, C., Korn, D. A. e Lior, H. (1987). A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. **New Engl. J. Med., 317:** 1496-1500.

Carvalho, M. E. S. B. (1987). Autólise e Heterólise de *Streptococcus faecium*. **Tese de doutoramento.** Universidade do Porto.

Cerbón, J. (1972). NMR evidence for the hydrophobic interaction of local anaesthetics. Possible relation to their potency. **Biochim. Biophys. Acta, 290:** 51-57.

Chikindas, M. L., Garcerá, M. J. G., Driessen, A. J. M., Ledeboer, A. M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Abee, T., Konings, W. N. e Venema, G. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. **Appl. Environ. Microbiol., 59:** 3577-3584.

Christiansson, A., Naidu, A. S., Nilsson, I., Wadström, T. e Pettersson, H. -E. (1989). Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. **Appl. Environ. Microbiol., 55:** 2595-2600.

Chung, K. -T., Dickson, J. S. e Crouse, J. D. (1989). Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. **Appl. Environ. Microbiol., 55:** 1329-1333.

Cleveland, R. F., Daneo-Moore, L., Wicken, A. J. e Shockman, G. D. (1976a). Effect of lipoteichoic acid and lipids on lysis of intact cells of *Streptococcus faecalis*. **J. Bacteriol., 127:** 1582-1584.

Cleveland, R. F., Wicken, A. J., Daneo-Moore, L. e Shockman, G. D. (1976b). Inhibition of wall autolysis in *Streptococcus faecalis* by lipoteichoic acid and lipids. **J. Bacteriol., 126:** 192-197.

Coleman, R. (1973). Membrane-bound enzymes and membrane ultrastructure. **Biochim. Biophys. Acta, 300:** 1-30.

Conner, D. E., Brackett, R. E. e Beuchat, L. R. (1986). Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. **Appl. Environ. Microbiol., 52:** 59-63.

Cortês I., Mendes-Faia, A., Pinto, M. E. e Sousa, J. C. F. (1991). Efeito da nisina sobre bactérias lácticas isoladas de vinhos portugueses. **Rev. Portug. Farm., XLI:** 13-15.

Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technol., 43:** 164-167.

Daeschel, M. A., Jung, D. -S. e Watson, B. T. (1991). Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. **Appl. Environ. Microbiol., 57:** 601-603.

Daeschel, M. A., McGuire, J. e Al-Makhlafi, H. (1992). Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrofobic silicon surfaces. **J. Food Prot., 55:** 731-735.

Davies, E. A. e Adams, M. R. (1994). Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin. **Int. J. Food Microbiol., 21:** 341-347.

de Vos, W. M., Mulders, J. W. M., Siezen, R. J., Hugenholtz, J. e Kuipers, O. P. (1993). Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol., 59:** 213-218.

de Vrij, W., Bulthuis, R. A. e Konings, W. N. (1988). Comparative study of energy-transducing properties of cytoplasmic membranes from mesophilic and thermophilic *Bacillus* species. **J. Bacteriol., 170:** 2359-2366.

Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. **Food Technol., 44:** 100-117.

Devriese, L. A., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K. e Haesebrouck, F. (1995). Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. **Int. J. Food Microbiol., 26:** 187-197.

Dilton, R. M. e Patel, T. R. (1992). *Listeria* in seafoods: a review. **J. Food Prot., 55:** 1009-1015.

Dodd, H. M., Horn, N. e Gasson, M. J. (1990). Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. **J. Gen. Microbiol., 136:** 555-566.

Dodd, H. M., Horn, N., Swindell, S. e Gasson, M. J. (1991). Physical and genetic analysis of the chromosomally located transposon *Tn5301*, responsible for nisin biosynthesis, pg. 231-242. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Doyle, M. P. (1988a). Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Technol., 42:** 169-171.

Doyle, M. P. (1988b). *Bacillus cereus*. **Food Technol., 42:** 187-188.

Doyle, M. P. (1991). *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **Int. J. Food Microbiol., 12:** 289-302.

Doyle, M. P. e Schoeni, J. L. (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Appl. Environ. Microbiol., 53:** 2394-2396.

Doyle, M. P., Glass, K. A., Beery, J. T., Garcia, G. A., Pollard, D. J. e Schultz, R. D. (1987). Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. **Appl. Environ. Microbiol., 53:** 1433-1438.

Doyle, R. J. e Koch, A. L. (1987). The functions of autolysins in the growth and division of *Bacillus subtilis*. **Crit. Rev. Microbiol., 15:** 169-222.

Doyle, R. J., Matthews, T. H. e Streips, U. N. (1980). Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. **J. Bacteriol., 143:** 471-480.

Doyle, R. J., McDannel, M. L., Helman, J. R. e Streips, U. N. (1975). Distribution of teichoic acid in the cell wall of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol., 122:** 152-158.

Dufrenne, J., Bijwaard, M., te Giffel, M., Beumer, R. e Notermans, S. (1995). Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. **Int. J. Food Microbiol., 27:** 175-183.

Einarsson, H. e Lauzon, H. L. (1995). Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol., 61:** 669-676.

Embarek, P. K. B. (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. **Int. J. Food Microbiol., 23:** 17-34.

Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelmann, M. e Entian, K. -D. (1992). Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein. **Appl. Environ. Microbiol., 58:** 3730-3743.

Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelmann, M. e Entian, K. -D. (1994). Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. **Appl. Environ. Microbiol., 60:** 814-825.

Ennis, H. L. e Lubin, M. (1965). Pre-ribosomal particles formed in potassium-depleted cells. Studies on degradation and stabilization. **Biochim. Biophys. Acta, 95:** 605-623.

Epstein, W. e Schultz, S. G. (1968). Ion transport and osmoregulation in bacteria, pg. 186-193. ***In*** L. B. Guze (ed.), Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms. Williams e Wilkins. Baltimore.

Evans, H. J. e Sorger, G. J. (1966). Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. **Ann. Rev. Plant Physiol., 17:** 47-76.

Fan, D. P. (1970). Autolysin(s) of *Bacillus subtilis* as dechaining enzyme. **J. Bacteriol., 103:** 494-499.

Fan, D. P. e Beckman, M. M. (1971). Mutant of *Bacillus subtilis* demonstrating the requirement of lysis for growth. **J. Bacteriol., 105:** 629-636.

Farber, J. M. (1989). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. **Int. J. Food Microbiol., 8:** 285-291.

Farber, J. M. (1993). Current research on *Listeria monocytogenes* in foods: an overview. **J. Food Prot., 56:** 640-643.

Farber, J. M. e Daley, E. (1994). Presence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally-contaminated meats. **Int. J. Food Microbiol., 22:** 33-42.

Farber, J. M. e Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiol. Rev., 55:** 476-511.

Farber, J. M., Sanders, G. W., Dunfield, S. e Prescott, R. (1989a). The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol., 9:** 181-183.

Farber, J. M., Sanders, G. W. e Johnston, M. A. (1989b). A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **J. Food Prot., 52:** 456-458.

Farber, J. M., Sanders, G. W., Speirs, J. I., D'Aoust, J. -Y., Emmons, D. B. e McKellar, R. (1988). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. **Int. J. Food Microbiol., 7:** 277-286.

Feinstein, M. B., Fernandez, S. M. e Sha'Afi, R. I. (1975). Fluidity of natural membranes and phosphatidylserine and ganglioside dispersions. Effects of local anesthetics, cholesterol and protein. **Biochim. Biophys. Acta, 413:** 354-370.

Fernández, M. S. e Cerbón, J. (1973). The importance of the hydrophobic interactions of local anesthetics in the displacement of polyvalent cations from artificial lipid membranes. **Biochim. Biophys. Acta, 298:** 8-14.

Fiedler, F. (1988). Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view. **Infection 16(supl.2):** S92-S94.

Fischer, W., Rösel, P. e Koch, H. U. (1981). Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol., 146:** 467-475.

Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. e Reingold, A. L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New Engl. J. Med., 312:** 404-407.

Food and Drug Administration (FDA) (1988). Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. **Federal Register, 53:** 11247-11251.

Forsberg, C. W. e Rogers, H. J. (1971). Autolytic enzymes in growth of bacteria. **Nature, 229:** 272-273.

Forsberg, C. W., Wyrick, P. B., Ward, J. B. e Rogers, H. J. (1973). Effect of phosphate limitation on the morphology and wall composition of *Bacillus licheniformis* and its phosphoglucomutase-deficient mutants. **J. Bacteriol., 113:** 969-984.

Gao, F. H., Abee, T. e Konings, W. N. (1991). Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome *c* oxidase-containing proteoliposomes. **Appl. Environ. Microbiol., 57:** 2164-2170.

Garcerá, M. J. G., Elferink, M. G. L., Driessen, A. J. M. e Konings, W. N. (1993). In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin, role of protonmotive force and lipid composition. **Eur. J. Biochem., 212:** 417-422.

Gasson, M. J. (1984). Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production into *Streptococcus lactis* 712. **FEMS Microbiol. Lett., 21:** 7-10.

Giesbrecht, P., Wecke, J. e Reinicke, B. (1976). On the morphogenesis of the cell wall of staphylococci. **Int. Rev. Cytol., 44:** 225-318.

Gilbert, R. J. e Kramer, J. M. (1986). *Bacillus cereus* food poisoning, pg. 85-93. ***In*** D. O. Cliver e B. A. Cochrane (eds.), Progress in food safety. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, Wi.

Glass, K. A. e Doyle, M. P. (1989). Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. **Appl. Environ. Microbiol., 55:** 1565-1569.

Gonzalez, C. F. e Kunka, B. S. (1985). Transfer of sucrose-fermenting ability and nisin production phenotype among lactic streptococci. **Appl. Environ. Microbiol., 49:** 627-633.

Goodson, M. e Rowbury, R. J. (1989). Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. **Lett. Appl. Microbiol., 8:** 77-79.

Graeffe, T., Rintala, H., Paulin, L., e Saris, P. (1991). A natural nisin variant, pg. 260-268. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Graham, L. L. e Beveridge, T. J. (1994). Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall. **J. Bacteriol., 176:** 1413-1421.

Granum, P. E. (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. **J. Appl. Bacteriol., 76:** 61S-66S.

Granum, P. E., Brynestad, S. e Kramer, J. M. (1993). Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. **Int. J. Food Microbiol., 17:** 269-279.

Griffiths, M. W. (1989). *Listeria monocytogenes*: its importance in the dairy industry. **J. Sci. Food Agric., 47:** 133-158.

Gross, E. e Morell, J. L. (1970). Nisin. The assignment of sulfide bridges of β-methyllanthionine to a novel bicyclic structure of identical ring size.**J. Am. Chem. Soc., 92:** 2919-2920.

Gross, E. e Morell, J. L. (1971). The structure of nisin. **J. Am. Chem. Soc., 93:** 4634-4635.

Hancock, R. E. W. (1984). Alterations in outer membrane permeability. **Ann. Rev. Microbiol., 38:** 237-264.

Harris L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E. e Klaenhammer, T. R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot., 52:** 384-387.

Harris, L. J., Fleming, H. P. e Klaenhammer, T. R. (1991). Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin. **J. Food Prot., 54:** 836-840.

Harris, L. J., Fleming, H. P. e Klaenhammer, T. R. (1992). Novel paired starter culture system for sauerkraut, consisting of a nisin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* strain and a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain. **Appl. Environ. Microbiol., 58:** 1484-1489.

Hayes, P. S., Feeley, J. C., Graves, L. M., Ajello, G. W. e Fleming, D. W. (1986). Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. **Appl. Environ. Microbiol., 51:** 438-440.

Heisick, J. E., Wagner, D. E., Nierman, M. L. e Peeler, J. T. (1989). *Listeria* spp. found on fresh market produce. **Appl. Environ. Microbiol., 55:** 1925-1927.

Henning, S., Metz, R. e Hammes, W. (1986). Studies on the mode of action of nisin. **Int. J. Food Microbiol., 3:** 121-134.

Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H. R. e Mattick, A. T. R. (1951). A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss type cheese by a nisin producing *Streptococcus*. **J. Dairy Res., 18:** 205-206.

Hof, H., Nichterlein, T. e Kretschmar, M. (1994). When are *Listeria* in foods a health risk? **Trends Food Sci. Technol., 5:** 185-190.

Höltje, J. V. e Tomasz, A. (1975). Biological effects of lipoteichoic acids. **J. Bacteriol., 124:** 1023-1027.

Holzapfel, W. H., Geisen, R. e Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **Int. J. Food Microbiol., 24:** 343-362.

Houtsmuller, U. M. T. e Van Deenen, L. L. M. (1964). On the accumulation of amino acid derivatives of phosphatidylglycerol in bacteria. **Biochim. Biophys. Acta, 84:** 96-98.

Huff, E. (1982). Lipoteichoic acid, a major amphiphile of gram-positive bacteria that is not readily extractable. **J. Bacteriol., 149:** 399-402.

Hugenholtz, J. e de Veer, G. J. C. M. (1991). Application of nisin A and nisin Z in dairy technology, pg. 440-447. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Hughes, M. N. e Poole, R. K. (1989). Metals and micro-organisms, Chapman e Hall, London.

Hurst, A. (1981). Nisin. **Advances Appl. Microbiol., 27:** 85-123.

Hurst, A. e Paterson, G. M. (1971). Observations on the conversion of an inactive precursor protein to the antibiotic nisin. **Can. J. Microbiol., 17:** 1379-1384.

Ingram, L. C. (1969). Synthesis of the antibiotic nisin: formation of lanthionine and β-methyl-lanthionine. **Biochim. Biophys. Acta, 184:** 216-219.

Ingram, L. C. (1970). A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. **Biochim. Biophys. Acta, 224:** 263-265.

Jack, R. W., Tagg, J. R. e Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev., 59:** 171-200.

Jarvis, B. (1967). Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzyme by several *Bacillus* species. **J. Gen. Microbiol., 47:** 33-48.

Jarvis, B. e Farr, J. (1971). Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*. **Biochim. Biophys. Acta, 227:** 232-240.

Johnson, J. L., Doyle, M. P. e Cassens, R. G. (1990). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products: a review. **J. Food Prot., 53:** 81-91.

Johnson, K. M. (1984). *Bacillus cereus* foodborne illness-an update. **J. Food Prot., 47:** 145-153.

Jolliffe, L. K., Doyle, R. J. e Streips, U. N. (1981). The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. **Cell, 25:** 753-763.

Jones, N. C. e Osborn, M. J. (1977). Translocation of phospholipids between the outer and inner membranes of *Salmonella typhimurium*. **J. Biol. Chem., 252:** 7405-7412.

Jones, T. P. (1993). Nitrate/nitrite. **In Pract., 15:** 146-147. Citado por Oliveira e col. (1995).

Joseph, R. e Shockman, G. D. (1975). Cellular localization of lipoteichoic acid in *Streptococcus faecalis*. **J. Bacteriol., 122:** 1375-1386.

Joseph, R. e Shockman, G. D. (1976). Autolytic formation of protoplasts (autoplasts) of *Streptococcus faecalis*: location of active and latent autolysin. **J. Bacteriol., 127:** 1482-1493.

Joyce, G. H., Hammond, R. K. e White, D. C. (1970). Changes in membrane lipid composition in exponentially growing *Staphylococcus aureus* during the shift from 37 to 25 C. **J. Bacteriol., 104:** 323- 330.

Jung, G. (1991a). Lantibiotics-ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulphide bridges and α,β-didehydro amino acids. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 30:** 1051-1068.

Jung, G. (1991b). Lantibiotics: a survey, pg. 1-34. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Kaback, H. R. (1970). Preparation and characterization of bacterial membranes. **Meth. Enzymol., 22:** 99-120.

Kaback, H. R. (1972). Transport across isolated bacterial cytoplasmic membranes. **Biochim. Biophys. Acta, 265:** 367-416.

Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C. P. e Ray, B. (1994). Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. **Appl. Environ. Microbiol., 60:** 4174-4177.

Kaletta, C. e Entian, K. -D. (1989). Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nis A* gene and posttranslational processing of its peptide product. **J. Bacteriol., 171:** 1597-1601.

Kerr, K., Birkenhead, D., Seale, K., Major, J. e Hawkey, P. (1993). Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of food workers. **J. Food Prot., 56:** 525-527.

Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie, 70:** 337-349.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev., 12:** 39-86.

Klein, C. e Entian, K. -D. (1994). Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Appl. Environ. Microbiol., 60:** 2793-2801

Kleinkauf, H. e Von Döhren, H. (1990). Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. **Eur. J. Biochem., 192:** 1-15.

Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. **Food Technol., 47:** 156-161.

Knudtson, L. M. e Hartman, P. A. (1993). Enterococci in pork processing. **J. Food Prot., 56:** 6-9.

Koch, A. L. (1985). How bacteria grow and divide in spite of internal hydrostatic pressure. **Can. J. Microbiol., 31:** 1071-1084.

Konings, W. N., Bisschop, A., Veenhuis, M. e Vermeulen, C. A. (1973). New procedure for the isolation of membrane vesicles of *Bacillus subtilis* and an electron microscopy study of their ultrastructure. **J. Bacteriol., 116:** 1456-1465.

Kordel, M. e Sahl, H. -G., (1986). Susceptibility of bacterial, eucaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. **FEMS Microbiol. Lett., 34:** 139-144.

Kordel, M., Benz, R. e Sahl, H. -G. (1988). Mode of action of the staphylococcin-like peptide Pep 5: voltage-dependent depolarization of bacterial and artificial membranes. **J. Bacteriol., 170:** 84-88.

Kordel, M., Schüller, F. e Sahl, H. -G. (1989). Interaction of the pore forming-peptide antibiotics Pep 5, nisin and subtilin with non-energized liposomes. **FEBS Lett., 244:** 99-102.

Kramer, J. M. e Gilbert, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other species, pg. 21-70. ***In*** M. P. Doyle (ed.), Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc. (N. Y).

Kroll, R. G. e Anagnostopoulos, G. D. (1981). Potassium leakage as a lethality index of phenol and the effect of solute and water activity. **J. Appl. Bacteriol., 50:** 139-147.

Kuhn, M., Kathariou, S. e Goebel, W. (1988). Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun., 56:** 79-82.

Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J. e de Vos, W. M. (1993). Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*, requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. **Eur. J. Biochem., 216:** 281-292.

Kuipers, O. P., Rollema, H. S., Yap, W. M. G. J., Boot, H. J., Siezen, R. J. e de Vos, W. M. (1992). Engineering dehydrated aminoacid residues in the antimicrobial peptide nisin. **J. Biol. Chem., 267:** 24340-24346.

Kuipers, O. P., Yap, W. M. G. J., Rollema, H. S., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J. e de Vos, W. M. (1991). Expression of wild-type and mutant nisin genes in *Lactococcus lactis*, pg. 250-259. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Lambert, P. A., Hancock, I. C. e Baddiley, J. (1977). Occurrence and function of membrane teichoic acids. **Biochim. Biophys. Acta, 472:** 1-12.

Lang, D. R. e Lundgren, D. G. (1970). Lipid composition of *Bacillus cereus* during growth and sporulation. **J. Bacteriol., 101:** 483-489.

Lapa, R. A. S., Lima, J. L. F. C. e Reis, M. S. H. (1993). Ion selective electrodes for potassium and calcium with a summing operational amplifier. An assessment of their analytical usefulness in determination of parenteral and haemodialysis solutions. **Il Farmaco, 48:** 1605-1616.

Lawrence, L. M. e Gilmour, A. (1994). Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. **Appl. Environ. Microbiol., 60:** 4600-4604.

Lechowich, R. V. (1988). Microbiological challenges of refrigerated foods. **Food Technol., 42:** 84-85,89.

Leisner, J. J., Greer, G. G., Dilts, B. D. e Stiles, M. E. (1995). Effect of growth of selected lactic acid bacteria on storage life of beef stored under vacuum and in air. **Int. J. Food Microbiol., 26:** 231-243.

Leive, L. (1974). The barrier function of the gram-negative envelope. **Ann. N. Y. Acad. Sci., 235:** 109-129.

Lewus, C. B., Kaiser, A. e Montville, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol., 57:** 1683-1688.

Lian, L. -Y., Chan, W. C., Morley, S. D., Roberts, G. C. K., Bycroft, B. W. e Jackson, D. (1991). NMR studies of the solution structure of nisin A and related peptides, pg. 43-58. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Lindgren, S. E. e Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonostic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiol. Rev., 87:** 149-163.

Linnett, P. E. e Strominger, J. L. (1973). Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. **Antimicrob. Agents Chemother., 4:** 231-236.

Lipinska, E. (1977). Nisin and its applications, pg. 103-130. ***In*** M. Woodbine (ed.), Antibiotics and antibiosis in agriculture. Butterworth e Co., Publishers, Ltd., London.

Liu, W. e Hansen, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol., 56:** 2551-2558.

Liu, W. e Hansen, J. N. (1992). Enhancement of the chemical and antimicrobial properties of subtilin by site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem., 267:** 25078-25085.

Liu, W. e Hansen, J. N. (1993). The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. **Appl. Environ. Microbiol., 59:** 648-651.

Lovett, J. e Twedt, R. M. (1988). *Listeria*. **Food Technol., 42:** 188-191.

Machtiger, N. A. e Fox, C. F. (1973). Biochemistry of bacterial membranes. **Ann. Rev. Biochem., 42:** 575-600.

Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J. e Savoie, L. (1991). Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. **Appl. Environ. Microbiol., 57:** 1969-1973.

Manual Bergey's (1986). P. H. A., Sneath, N. S. Mair, M. E. Shappe e J. G. Holt (eds.). ***In***: Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams e Wilkins. Baltimore, USA.

Marth, E. H. (1988). Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technol., 42:** 165-168.

Mattick, A. T. R. e Hirsch, A. (1944). A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. **Nature, 28:** 551.

Mattick, A. T. R. e Hirsch, A. (1947). Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. **Lancet, ii:** 5-7.

McClure, P. J., Kelly, T. M. e Roberts, T. A. (1991). The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol., 14:** 77-92.

McGowan, K. L., Wickersham, E. e Strockbine, N. A. (1989). *Escherichia coli* O157:H7 from water. **Lancet, i:** 967-968.

McLauchlin, J. e Low, J. (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. **Veterinary Record, Dec:** 615-617.

Melling, J. e Capel, B. J. (1978). Characteristics of *Bacillus cereus* emetic toxin. **FEMS Microbiol. Lett., 4:** 133-135.

Melling, J., Capel, B. J., Turnbull, P. C. B. e Gilbert, R. J. (1976). Identification of a novel enterotoxigenic activity, associated with *Bacillus cereus*. **J. Clin. Pathol., 29:** 938-940.

Mendes-Faia, A. e Radler, F. (1990). Investigation of the bactericidal effect of nisin on lactic acid bacteria of wine. **Vitis, 29:** 233-238.

Mera, M. U., Kemper, M., Doyle, R. e Beveridge, T. J. (1992). The membrane-induced proton motive force influences the metal binding ability of *Bacillus subtilis* cell walls. **Appl. Environ. Microbiol., 58:** 3837-3844.

Mertens, B. e Knorr, D. (1992). Developments of nonthermal processes for food preservation. **Food Technol., 46:** 124-133.

Meyer, P. D. e Wouters, J. T. M. (1987). Lipoteichoic acid from *Bacillus subtilis* subsp. *niger* WM: isolation and effects on cell wall autolysis and turnover. **J. Bacteriol., 169:** 973-980.

Miller, L. G. e Kaspar, C. W. (1994). *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. **J. Food Prot., 57:** 460-464.

Molitor, E. e Sahl, H. -G. (1991). Applications of nisin: a literature survey, pg. 434-439. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Monsur, K. A., Begum, Y. A., Ahmed, Z. U. e Rahman, S. (1989). Evidence of multiple infections in cases of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis., 159:** 144-145.

Montville, T. J. e Bruno, M. E. C. (1994). Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. **Int. J. Food Microbiol., 24:** 53-74.

Morris, S. L., Walsh, R. C. e Hansen, J. N. (1984). Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. **J. Biol. Chem., 259:** 13590-13594.

Morse, D., de Lorenzo, M. A., Natzke, R. P. e Bray, D. R. (1987). Factors affecting days of discarded milk due to clinical mastitis and subsequent cost of discarded milk. **J. Dairy Sci., 70:** 2411-2418.

Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. e de Vos, W. M. (1991). Identification, and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **Eur. J. Biochem., 201:** 581-584.

Mundt, J. O. (1976). Streptococci in dried and frozen foods. **J. Milk Food Technol., 39:** 413-416.

Mundt, J. O. (1986). Enterococci, pg. 1063. ***In*** P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Shappe e J. G. Holt (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.2. Williams e Wilkins. Baltimore, USA.

Murray, B. E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. **Clin. Microbiol. Rev., 3:** 46-65.

Nachlas, M. M., Margulier, S. I. e Seligman, A. M. (1960). Sites of electron transfer to tetrazolium salts in the succinic oxidase system. **J. Biol. Chem., 235:** 2739-2743.

Nikaido, H. e Vaara, M. (1987). Outer membrane, pg. 7-22. ***In*** F. C. Neidhardt (ed.), *E. coli* and *S. typhimurium*: cellular e molecular biology, Vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Notermans, S. e Hoogenboom-Verdegaal, A. (1992). Existing and emerging foodborne diseases. **Int. J. Food Microbiol., 15:** 197-205.

Notermans, S., Dufrenne, J. e Lund, B. M. (1990). Botulism risk of refrigerated, processed foods of extended durability. **J. Food Prot., 53:** 1020-1024.

Notermans, S., Wernars, K., Soentoro, P. S., Dufrenne, J. e Jansen, W. (1991). DNA hybridization and latex agglutination for detection of heat-labile-and shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in meat. **Int. J. Food Microbiol., 13:** 31-40.

O'Brien, R. T., Titus, D. S., Devlin, K. A., Stumbo, C. R. e Lewis, J. C. (1956). Antibiotics in food preservation. II. Studies on the influence of subtilin and nisin on the thermal resistance of food spoilage bacteria. **Food Technol., 10:** 352-355.

Ogden, K. (1986). Nisin: a bacteriocin with a potential use in brewing. **J. Inst. Brewing, 92:** 379-383.

Ogden, K. (1987). Cleansing contaminated pitching yeast with nisin. **J. Inst. Brewing, 93:** 302-307.

Ogden, K. e Waites, M. J. (1986). The action of nisin on beer spoilage lactic acid bacteria. **J. Inst. Brewing, 92:** 463-467.

Ogden, K., Waites, M. J. e Hammond, J. R. M. (1988). Nisin and brewing. **J. Inst. Brewing, 94:** 233-238.

Okereke, A. e Montville, T. J. (1992). Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679. **Appl. Environ. Microbiol., 58:** 2463-2467.

Oliveira, C. P., Glória, M. B. A., Barbour, J. F. e Scanlan, R. A. (1995). Nitrate, nitrite, and volatile nitrosamines in whey-containing food products. **J. Agric. Food Chem., 43:** 967-969.

Olsvik, Ø., Wasteson, Y., Lund, A. e Hornes, E. (1991). Pathogenic *Escherichia coli* found in food. **Int. J. Food Microbiol., 12:** 103-114.

Op den Kamp, J. A. F., Van Iterson, W. e Van Deenen, L. L. M. (1967). Studies on the phospholipids and morphology of protoplasts of *Bacillus megaterium*. **Biochim. Biophys. Acta, 135:** 862-884.

Pache, W. e Chapman, D. (1972). Interaction of antibiotics with membranes: chlorothricin. **Biochim. Biophys. Acta, 255:** 348-357.

Padhye, N. V. e Doyle, M. P. (1991). Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. **Appl. Environ. Microbiol., 57:** 2693-2698.

Parente, A. M. (1984). Lise de bactérias de gram-negativo. estudo espectrofotométrico e ultrastrutural em *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*. **Tese de doutoramento.** Universidade do Porto.

Parente, A. M. e Silva, M. T. (1984). Ultrastructural aspects of autolysis of *Pseudomonas fluorescens* induced by osmotic shock. **J. Gen. Microbiol., 130:** 1459-1470.

Paton, J. C., May, B. K. e Elliott, W. H. (1978). Membrane phospholipid asymmetry in *Bacillus amyloliquefaciens*. **J. Bacteriol., 135:** 393-401.

Pederson, C. S. (1971). ***In*** Microbiology of food fermentations. AVI, Westport, CT.

Piard, J. C. e Desmazeaud, M. J. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and end-products from catabolism. **Lait, 71:** 525-541.

Piard, J. C. e Desmazeaud, M. J. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. **Lait, 72:** 113-142.

Pollock, J. J., Linder, R. e Salton, M. R. J. (1971). Characterization of the membrane-bound succinic dehydrogenase of *Micrococcus lysodeikticus*. **J. Bacteriol., 107:** 230-238.

Portnoy, D. A., Chakraborty, T., Goebel, W. e Cossart, P. (1992). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun., 60:** 1263-1267.

Portnoy, D. A., Jacks, P. S. e Hinrichs, D. J. (1988). Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. **J. Exp. Med., 167:** 1459-1471.

Pyle, B. H., Broadaway, S. C. e McFeters, G. A. (1995). A rapid, direct method for enumerating respiring enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. **Appl. Environ. Microbiol., 61:** 2614-2619.

Qvist, S., Sehested, K. e Zeuthen, P. (1994). Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. **Int. J. Food Microbiol., 24:** 283-293.

Radler, F. (1990a). Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. **Am. J. Enol.Vitic., 41:** 1-6.

Radler, F. (1990b). Possible use of nisin in winemaking. II. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine. **Am. J. Enol.Vitic., 41:** 7-11.

Ramachandran, L. K. e Witkop, B. (1967). N-bromosuccinimide cleavage of peptides. **Meth. Enzymol., 11:** 283-299.

Ramseier, H. R. (1960). Die wirkung von nisin auf *Clostridium butyricum* Prazm. **Arch. Mikrobiol., 37:** 57-94. Citado por A. Hurst (1981).

Rauch, P. J. G. e de Vos, W. M. (1992). Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon *Tn5276* and its insertion in *Lactococcus lactis*. **J. Bacteriol., 174:** 1280-1287.

Rauch, P. J. G., Beerthuyzen, M. M. e de Vos, W. M. (1991). Molecular analysis and evolution of conjugative transposons encoding nisin production and sucrose fermentation in *Lactococcus lactis*, pg. 243-249. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Ray, B. e Daeschel, M. A. (1992). ***In*** Food biopreservatives of microbiological origin, pg. 177-205. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Rayman, M. K., Aris, B. e Hurst, A. (1981). Nisin: a possible alternative on adjunct to nitrite in the preservation of meats. **Appl. Environ. Microbiol., 41:** 375-380.

Rayman, M. K., Malik, N. e Hurst, A. (1983). Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. **Appl. Environ. Microbiol., 46:** 1450-1452.

Reisinger, P., Seidel, H., Tschesche, H. e Hammes, W. P. (1980). The effect of nisin on murein synthesis. **Arch. Microbiol., 127:** 187-193.

Rodrigues, M. J. R. M. (1994). Avaliação de um método rápido eléctrico na detecção de *Listeria* spp. em queijos. **Tese de doutoramento.** Universidade Católica Portuguesa.

Rogers, H. J. (1987). The bacterial surface. American Society of Microbiology Conference Antib. Inhib. Bacterial Cell Surface Assembly and Function. (Abstracts, VIII. VIII).

Rogers, H. J. e Wright, G. (1986). Effects of ethanol and other 1-alkanols on cell autolysis and macromolecular synthesis by *Bacillus subtilis*. **J. Gen. Microbiol., 132:** 1221-1229.

Rogers, H. J., Perkins, J. R. e Ward, J. B. (1980). ***In*** Microbial cell walls and membranes, pg. 437-460. Chapman e Hall, Ltd., New York.

Rogers, H. J., Taylor, C., Rayter, S. e Ward, J. B. (1984). Purification and properties of autolytic endo-β-N-acetylglucosaminidase and the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Bacillus subtilis* strain 168. **J. Gen. Microbiol., 130:** 2395-2402.

Rogers, L. A. e Whittier, E. O. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Bacteriol., 16:** 221-229; 321-325.

Rollema, H. S., Kuipers, O. P., Both, P., de Vos, W. M. e Siezen, R. J. (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. **Appl. Environ. Microbiol., 61:** 2873-2878.

Rosenthal, S. L. e Mathson, A. (1973). ATPase in isolated membranes of *Bacillus subtilis*. **Biochim. Biophys. Acta, 318:** 252-261.

Roth, S. e Seeman, P. (1972). The membrane concentrations of neutral and positive anesthetics (alcohols, chlorpromazine, morphine) fit the meyer-overton rule of anesthesia; negative narcotics do not. **Biochim. Biophys. Acta, 255:** 207-219.

Rothman, J. E. e Kennedy, E. P. (1977). Asymmetrical distribution of phospholipids in the membrane of *Bacillus megaterium*. **J. Mol. Biol., 110:** 603-618.

Ruhr, E. e Sahl, H. -G. (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. **Antimicrob. Agents Chemother., 27:** 841-845.

Russell, J. B. (1992). Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **J. Appl. Bacteriol., 73:** 363-370.

Sahl, H. -G. (1991). Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics, pg. 347-358. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Sahl, H. -G. (1994). Staphylococcin 1580 is identical to the lantibiotic epidermin: implications for the nature of bacteriocins from gram-positive bacteria. **Appl. Environ. Microbiol., 60:** 752-755.

Sahl, H. -G. e Brandis, H. (1983). Efflux of low-M_r substances from the cytoplasm of sensitive cells caused by the staphylococcin-like agent Pep-5. **FEMS Microbiol. Lett., 16:** 75-79.

Sahl, H. -G., Grossgarten, M., Widger, W. R., Cramer, W. A. e Brandis, H. (1985). Structural similarities of the staphylococcin-like peptide Pep-5 to the peptide antibiotic nisin. **Antimicrob. Agents Chemother., 27:** 836-840.

Sahl, H. -G., Jack, R. W. e Bierbaum, G. (1995). Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. **Eur. J. Biochem., 230:** 827-853.

Sahl, H. -G., Kordel, M. e Benz, R. (1987). Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. **Arch. Microbiol., 149:** 120-124.

Salton, M. R. J. (1971). Bacterial membranes. **CRC Crit. Rev. Microbiol., 1:** 161-197.

Sandermann, H. (1978). Regulation of membrane enzymes by lipids. **Biochim. Biophys. Acta, 515:** 209-237.

Santos-Mota, J. M., Op den Kamp, J. A. F., Verheij, H. M. e Van Deenen, L. L. M. (1970). Phospholipids of *Streptococcus faecalis*. **J. Bacteriol., 104:** 611-619.

Santos-Mota, J. M., Silva, M. T. e Guerra, F. C. (1971). Ultrastructural and chemical alterations induced by dicumarol in *Streptococcus faecalis*. **Biochim. Biophys. Acta, 249:** 114-121.

Santos-Mota, J. M., Silva, M. T. e Guerra, F. C. (1972). Variations in the membranes of *Streptococcus faecalis* related to different cultural conditions. **Arch. Mikrobiol., 83:** 293-302.

Sayare, M., Daneo-Moore, L. e Shockman, G. D. (1972). Influence of macromolecular biosynthesis on cellular autolysis in *Streptococcus faecalis*. **J. Bacteriol., 112:** 337-344.

Scherrer, P. e Gerhardt, P. (1971). Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. **J. Bacteriol., 107:** 718-735.

Schillinger, U., Kaya, M. e Lücke, F. -K. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. **J. Appl. Bacteriol., 70:** 473-478.

Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. e Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. **New Engl. J. Med., 308:** 203-206.

Schnell, N., Entian, K. -D., Schneider, U., Götz, F., Zähner, H., Kellner, R. e Jung, G. (1988). Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. **Nature, 333:** 276-278.

Schüller, F., Benz, R. e Sahl, H. -G. (1989). The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. **Eur. J. Biochem., 182:** 181-186.

Schultz, S. G. e Solomon, A. K. (1961). Cation transport in *Escherichia coli*. I. Intracellular Na^+ e K^+ concentrations and net cation movement. **J. Gen. Physiol., 45:** 355-369.

Schved, F., Henis, Y. e Juven, B. J. (1994). Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. **Int. J. Food Microbiol., 21:** 305-314.

Scott, V. N. e Taylor, S. L. (1981). Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. **J. Food Sci., 46:** 117-120-126.

Seeliger, H. P. R. e Jones, D. (1986). Genus *Listeria*, pg. 1235. ***In*** P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Shappe e J. G. Holt (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.2. Williams e Wilkins. Baltimore, USA.

Senerwa, D., Olsvik, Ø., Mutanda, L.N. (1989). Colonization of neonates in a nursery ward with enteropathogenic *Escherichia coli* and correlation with the clinical history of the children. **J. Clin. Microbiol., 27:** 2539-2543.

Shockman, G. D. e Barrett, J. F. (1983). Structure, function and assembly of cell walls of Gram-positive bacteria. **Ann. Rev. Microbiol., 37:** 501-527.

Shockman, G. D., Kolb, J. J. e Toennies, G. (1958). Relations between bacterial cell wall synthesis, growth phase and autolysis. **J. Biol. Chem., 230:** 961-977.

Shockman, G. D., Thompson, J. S. e Conover, M. J. (1967). The autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. II. Partial characterization of the autolysin and its substrate. **Biochemistry, 6:** 1054-1065.

Siegers, K. e Entian, K. -D. (1995). Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. **Appl. Environ. Microbiol., 61:** 1082-1089.

Silva, M. T. (1975). The ultrastructure of the membranes of gram-positive bacteria as influenced by fixatives and membrane-damaging treatments, pg. 255-289. ***In*** R. M. Burton e L. Packer (eds.), Biomembranes: Lipids, Proteins and Receptors. BI-Science Publ. Div., Webster Groves, Mo., USA.

Silva, M. T. (1979). Características micromorfológicas e funcionais das membranas de bactérias de Gram-positivo. Alterações induzidas por fixadores, substâncias muralíticas e agentes membrano-activos. **Tese de doutoramento.** Universidade do Porto.

Silva, M. T. (1980). Bacterial membranes. **Ciênc. Biol. (Portugal), 5:** 241-244.

Silva, M. T. (1984). The use of transmission electron microscopy of ultrathin sections for the characterization of the ultrastructure of normal and damaged bacterial membranes, pg. 1-36. ***In*** R. M. Burton e F. C. Guerra (eds.), Biomembranes: Dynamics and Biology. Plenum Publishing Corporation, New York.

Silva, M. T., e Sousa, J. C. F. (1972). Ultrastructural alterations induced by moist heat in *Bacillus cereus*. **Appl. Microbiol., 24:** 463-476.

Silva, M. T., Sousa, J. C. F. e Balassa, G. (1978). Ultrastructural effects of chemical agents and moist heat on *Bacillus subtilis*. 1- Effects on vegetative cells. **Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 129 B:** 363-375.

Silva, M. T., Sousa, J. C. F., Macedo, M. A. E., Polónia, J. J. e Parente, A. M. (1976a). Effects of phenethyl alcohol on *Bacillus* e *Streptococcus*. **J. Bacteriol., 127:** 1359-1369.

Silva, M. T., Sousa, J. C. F., Polónia, J. J. e Macedo, P. M. (1979). Effects of local anesthetics on bacterial cells. **J. Bacteriol., 137:** 461-468.

Silva, M. T., Sousa, J. C. F., Polónia, J. J., Macedo, M. A. E. e Parente, A. M. (1976b). Bacterial mesossomes. Real structures or artifacts? **Biochim. Biophys. Acta, 443:** 92-105.

Singer, S. J. e Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science, 175:** 720-731.

Smith, J. L. e Palumbo, S. A. (1981). Microorganisms as food additives. **J. Food Prot., 44:** 936-955.

Somers, E. B. e Taylor, S. L. (1987). Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized process cheese spreads. **J. Food Sci., 46:** 121.

Sonnenfeld, E. M., Beveridge, T. J., Koch, A. L. e Doyle, R. J. (1985). Asymmetric distribution of charge on the cell wall of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol., 163:** 1167-1171.

Sousa, J. C. F., Silva, M. T., Santos-Mota, J. M. e Abreu, M. L. (1972). Membrane alterations induced by moist heat in *Streptococcus faecalis*. **Rev. Microsc. Electron., 1:** 36-37.

Spelhaug, S. R. e Harlander, S. K. (1989). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceous*. **J. Food Prot., 52:** 856-862.

Steele, J. E. e Miles, M. E. (1981). Food poisoning potential of artificially contaminated vacuum packaged sliced ham in sandwiches. **J. Food Prot., 44:** 430-434.

Steele, J. L. e McKay, L. L. (1986). Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *Streptococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol., 51:** 57-64.

Stevens, K. A., Klapes, N. A., Sheldon, B. W. e Klaenhammer, T. R. (1992). Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. **Appl. Environ. Microbiol., 58:** 1786-1788.

Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A. e Klaenhammer, T. R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. **Appl. Environ. Microbiol., 57:** 3613-3615.

Stiles, M. E. e Hastings, J. W. (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends Food Sci. Technol., 2:** 247-251.

Tagg, J. R., Dajani, A. S. e Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev., 40:** 722-756.

Taylor, S. L. e Somers, E. B. (1985). Evaluation of the antibotulinal effectiveness of nisin in bacon. **J. Food Prot., 48:** 949-952.

Tortorello, M. L. e Stewart, D. S. (1994). Antibody-direct epifluorescent filter technique for rapid, direct enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. **Appl. Environ. Microbiol., 60:** 3553-3559.

Tsai, H. -J. e Sandine, W. E. (1987). Conjugal transfer of nisin plasmid genes from *Streptococcus lactis* 7962 to *Leuconostoc dextranicum* 181. **Appl. Environ. Microbiol., 53:** 352-357.

Tsuchido, T., Ahn, Y. -H. e Takano, M. (1987). Lysis of *Bacillus subtilis* cells by glycerol and sucrose esters of fatty acids. **Appl. Environ. Microbiol., 53:** 505-508.

Turnbull, P. C. B., Jorgensen, K., Kramer, J. M., Gilbert, R. J. e Parry, J. M. (1979). Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and apparent involvement of exotoxins. **J. Clin. Pathol., 32:** 289-293.

Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbio. Rev., 56:** 395-411.

Van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N. e Abee, T. (1991). The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeabillity of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. **J. Bacteriol., 173:** 7934-7941.

Van de Ven, F. J. M., Van den Hooven, H. W., Konings, R. N. H. e Hilbers, C. W. (1991). The spatial structure of nisin in aqueous solution, pg. 35-42. ***In*** G. Jung e H. -G. Sahl (eds.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

Van der Meer, J. R., Polman, J., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. e De Vos, W. M. (1993). Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. **J. Bacteriol., 175:** 2578-2588.

Van der Meer, J. R., Rollema, H. S., Siezen, R. J., Beerthuyzen, M. M., Kuipers, O. P. e de Vos, W. M. (1994). Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. **J. Biol. Chem., 269:** 3555-3562.

Van Netten, P., Van de Moosdijk, A., Van Hoensel, P., Mossel, D. A. A.e Perales, I. (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. **J. Appl. Bacteriol., 69:** 73-79.

Vandenbergh, P. A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiol. Rev., 12:** 221-238.

Varnam, A. H. e Evans, M. G. (1991). ***In***: Foodborne pathogens. Wolfe Publishing Ltd.

Vasconcelos, J. A. P. e Deneer, H. G. (1994). Expression of superoxide dismutase in *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol., 60:** 2360-2366.

Vaz-Pato, M. V. (1989). Susceptibilidade aos antibióticos. Manual de laboratório.

Vorbeck, M. L. e Marinetti, G. V. (1965). Intracellular distribution and characterization of the lipids of *Streptococcus faecalis* (ATCC 9790). **Biochemistry, 4:** 296-305.

Waites, M. J. e Ogden, K. (1987). The estimation of nisin using ATP-bioluminometry. **J. Inst. Brewing, 93:** 30-32.

Ward, J. B. (1981). Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly, and location. **Microbiol. Rev., 45:** 211-243.

Welch, D. F. (1987). Role of catalase and superoxide dismutase in the virulence of *Listeria monocytogenes*. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 138:** 265-268.

Welsch, M. (1958). Lysis by agents of microbial origin. **J. Gen. Microbiol., 18:** 491-497.

Wessels, D., Jooste, P. J. e Mostert, J. F. (1990). Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. **Int. J. Food Microbiol., 10:** 349-352.

Wicken, A. J. e Knox, K. W. (1975). Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. **Science, 187:** 1161-1167.

Wong, H. -C. e Chen, Y. -L. (1988). Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol., 54:** 2179-2184.

Wong, H. -C., Chang, M.-H. e Fan, J.-Y. (1988). Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Appl. Environ. Microbiol., 54:** 699-702.

World Health Organization (1969). Specifications for identity and purity of some antibiotics. **WHO/Food Add.,** 69/34: 53-67. Citado por A. Hurst (1981)

Yang, R., Johnson, M. C. e Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol., 58:** 3355-3359.

Zajdel, J. K., Ceglowski, P. e Dobrzanski, W. T. (1985). Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. **Appl. Environ. Microbiol., 49:** 969-974.

Zottola, E. A., Yezzi, T. L., Ajao, D. B. e Roberts, R. F. (1994). Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. **Int. J. Food Microbiol., 24:** 227-238.